



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

ESTUDIOS BÁSICOS SOBRE
BIOFILTRACIÓN: Caracterización
del soporte, estudio microbiológico
y obtención de parámetros cinéticos.

TESIS DE MAESTRÍA EN INGENIERÍA
QUÍMICA.

Asesores: Dr. Sergio Revah M.
Dr. Richard Auria.

Presenta: I.B.Q. Sergio Hernández J.

Agradecimientos

A mis asesores: Dr. Sergio Revah y Richard Auria, por su paciencia y apoyo incondicional a lo largo de este trabajo.

A los sinodales: Dr. Fermín Pérez; Dr. Jaime Vernon; Dr. Sergio Huerta y Dr. Sergio Revah, por sus útiles comentarios que permitieron la elaboración final de este documento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

§	Índice i
§	Resumen iv

§ I MARCO TEÓRICO

§ 1	Introducción 1
§ 1.1	La contaminación en la ciudad de México (Aspectos generales) 2
§ 1.2	Hidrocarburos y compuestos orgánicos volátiles (COVs) 4
§ 1.3	Hidrocarburos y los COVs como precursores de ozono 5
§ 1.4	Tecnologías para el control de COVs 7
§ 1.4.1	Incineración térmica 7
§ 1.4.2	Incineración catalítica 8
§ 1.4.3	Adsorción en carbón activado 8
§ 1.4.4	Lavado químico 9
§ 1.4.5	Sistemas biológicos (Biofiltración) 9
§ 1.4.6	Comparación de tecnologías para el tratamiento de COVs 10
§ 1.5	Sistemas biológicos para el tratamiento de COVs en efluentes gaseosos 13
§ 1.5.1	Clasificación de los diferentes sistemas biológicos 14
§ 1.5.1.1	Biolavadores 14
§ 1.5.1.2	Filtros de escurrimiento 15
§ 1.5.1.3	Biofiltros 16
§ 1.6	Bases de diseño y operación de un biofiltro 17
§ 1.6.1	Microorganismos 17
§ 1.6.2	Material de empaque 19
§ 1.6.3	Control de la humedad 20
§ 1.6.4	Control de pH 21
§ 1.6.5	Caída de presión y consumo de energía 21
§ 1.9	Justificación 22
§ 1.10	Objetivos 23
§ 1.10	Objetivos particulares 23

§ II MARCO EXPERIMENTAL.**Estudio físico-microbiológico del material de empaque.**

§ 2.1	Estudio de la humedad de equilibrio 24
§ 2.2	Estudio de la actividad de agua 25
§ 2.3	Estudio de la caída de presión 26
§ 2.4	Determinación del pH 27
§ 2.5	Cuantificación de cenizas 27
§ 2.6	Contenido de materia orgánica 28
§ 2.7	Determinación de nitrógeno 28
§ 2.8	Fracción mineral de la turba 28
§ 2.8.1	Determinación de fósforo 28
§ 2.8.2	Estudio del contenido de potasio 28
§ 2.8.3	Determinación de la fracción mineral de la turba mediante absorción atómica 28

Análisis microbiológico de la turba

§ 2.9	Determinación de la microflora del material de empaque. 30
§ 2.10	Estudio de la existencia de inhibidores de crecimiento en la turba. 30

Estudio de las microcinéticas

§ 2.11	Medio de cultivo. 31
§ 2.11.1	Composición. 31
§ 2.12	Inóculo. 32
§ 2.12.1	Reactivación. 32
§ 2.12.2	Adaptación del inóculo. 32
§ 2.13	Estudios cinéticos. 34
§ 2.13.1	Cuantificación del solvente 35
§ 2.13.2	Determinación del crecimiento microbiano 35
§ 2.13.3	Determinación de las cantidades de O ₂ y CO ₂ 35

Aislamiento y caracterización de microorganismos

§ 2.14	Aislamiento 37
§ 2.15	Identificación 38
§ 2.15.1	Pruebas primarias 38
§ 2.15.11	Morfología microscópica 38
§ 2.15.12	Prueba de KOH 38
§ 2.15.13	Citocromo oxidasa 39
§ 2.15.14	Catalasa 39
§ 2.15.15	Prueba de glucosa (Oxidación-Fermentación) 39
§ 2.15.2	Pruebas secundarias. 39
§ 2.15.21	Movilidad 40
§ 2.15.22	Detección de fermentadores de glucosa y lactosa en agar triple azúcar hierro 40
§ 2.16	Conservación. 41

§ III RESULTADOS Y DISCUSIONES.

§ 3.0	Caracterización fisicoquímica de la turba 42
§ 3.1	Humedad de equilibrio 42
§ 3.2	Estudio de la actividad de agua (a _w) 44
§ 3.3	pH del material filtrante 46
§ 3.4	Caída de presión 47
§ 3.5	Composición de la turba 48
§ 3.51	Materia orgánica y porcentaje de carbono 49
§ 3.52	Nitrógeno 49
§ 3.53	Cenizas fracción mineral 50
§ 3.54	Flora microbiana de la turba 51
3.6	Inhibidores 52
§ 3.7	Determinación de los parámetros cinéticos 52
§ 3.7.1	Tolueno 53
§ 3.7.2	Balance para el tolueno 61
§ 3.7.3	Isopropanol 64

§ 3.7.4	Balance para el isopropanol 68
§ 3.7.5	Acetato de etilo 69
§ 3.7.6	Balance para el acetato de etilo 74
§ 3.8	Aislamiento e identificación de los microorganismos pertenecientes al consorcio 77
§ 3.8.1	Identificación 77
 § IV CONCLUSIONES		 79
 § V BIBLIOGRAFIA		 81
 § VI ANEXOS		 88
Anexo A: Contenido de materia orgánica	 88
Anexo B: Determinación del contenido de nitrógeno	 89
Anexo C: Determinación de fósforo	 90
Anexo D: Estudio del contenido de potasio	 91
Anexo E: Determinación de proteína (método de Lowry)	 92
Anexo F: Ficha de identificación de microorganismos	 93
Anexo G: Tinción de Gram	 94
Anexo H: Prueba de glucosa (Oxidación-Fermentación)	 95

FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de los compuestos químicos debido a su biodegradabilidad	...2
Figura 1.2 Diagrama de un sistema de biofiltración abierto	...10
Figura 1.3 Eliminación del sustrato, debido a la oxidación microbológica	...13
Figura 1.4 Diagrama de proceso de un biolavador	...15
Figura 1.5 Diagrama de proceso de un lecho de escurrimiento	...16
Figura 1.6 Diagrama de proceso de un biofiltro experimental	...17
Figura 2.1 Sistema experimental para determinar la humedad de equilibrio de la turba	...24
Figura 2.2 Equipo para medir la a_w , Aqua Lab CX-2	...26
Figura 2.3 Sistema experimental para determinar la caída de presión	...27
Figura 2.4 Sistema experimental utilizado en la adaptación y enriquecimiento del cultivo los microorganismos	...33
Figura 2.5 Sistema experimental empleado para cuantificar la degradación del solvente	...34
Figura 2.6 Fotografía del sistema de atmósfera saturada, utilizado en el aislamiento de microorganismos	...37
Figura 3.1 Perfiles axiales de humedad para la turba	...43
Figura 3.2 comparación de las isotermas de adsorción y desorción	...45
Figura 3.3 Isoterma de adsorción, utilizando MM y CaCO_3	...46
Figura 3.4 Comportamiento de pH de la turba como función de la adición de CaCO_3	...47
Figura 3.5 Comportamiento de Δp , como función de la velocidad superficial del gas	...48
Figura 3.6 Evolución de consumo de tolueno, producción de biomasa	...54
Figura 3.8 Curvas de crecimiento del consorcio a diferentes concentraciones iniciales de tolueno	...57
Figura 3.9 Ajuste de los datos experimentales utilizando la ecuación de Andrews, utilizando tolueno como sustrato	...58
Figura 3.10 Perfiles de consumo de tolueno	...60
Figura 3.11 Velocidades de consumo contra las diferentes concentraciones iniciales de tolueno	...61
Figura 3.12 Comportamiento del consumo del isopropanol y biomasa producida	...64
Figura 3.13 Evolución del consumo de sustrato, O_2 y producción de biomasa y CO_2 en mg totales	...65
Figura. 3.14 Correlación de los datos experimentales de velocidad de crecimiento del consorcio mediante la ecuación de Monod, con isopropanol como sustrato	...
Figura 3.15 Comparación de los perfiles de consumo de isopropanol	...68
Figura 3.18 comparación entre de los datos experimentales y los datos obtenidos con el modelo de Andrews	...72
Figura 3.19 comparación de los perfiles de consumo de acetato de etilo	...73
Figura 3.20 Relación entre la velocidad de consumo y la concentración inicial de acetato de etilo.	...74
Figura 3.21 Bacteria identificada como <i>Pseudomonas putida</i> , con el sistema API 20-E	...78

TABLAS

Tabla 1.1. Inventario de emisiones para ZMCM	...3
Tabla 1.2 Algunos COVs	...5
Tabla 1.3 Comparación entre las técnicas disponibles para el control de COVs	...11
Tabla 1.4 Clasificación de los sistemas según el comportamiento de la fase acuosa	...14
Tabla. 2.1 Concentraciones iniciales de solvente en los diferentes experimentos	...35
Tabla 3.1 Características de la turba	...48
Tabla 3.2 Fracción mineral de la turba	...50
Tabla 3.3 Características de la turba analizada	...51
Tabla 3.4 UFC en presencia de diferentes fuentes de carbono	...52
Tabla 3.5 Inhibidores	...52
Tabla 3.6. Parámetros cinéticos para cultivos puros de <i>Pseudomonas</i>	...56
Tabla 3.7 Concentraciones iniciales de tolueno y las μ obtenidas en cada experimento	...57
Tabla 3.8 Parámetros cinéticos para cultivos de bacterias y levaduras crecidas con diferentes alcoholes	...66
Tabla 3.9 Concentraciones iniciales de isopropanol, y las μ obtenidas en cada experimento	...66
Tabla 3.10 Concentraciones iniciales de acetato de etilo, y las μ obtenidas en cada experimento	...66
Tabla 3.11 Resumen de los parámetros cinéticos determinados en este estudio	... 75
Tabla 3.12 Características macroscópicas de las cepas aisladas	...76
Tabla 3.13 Resultados de las pruebas bioquímicas	...77

I MARCO TEÓRICO

§ 1 INTRODUCCIÓN

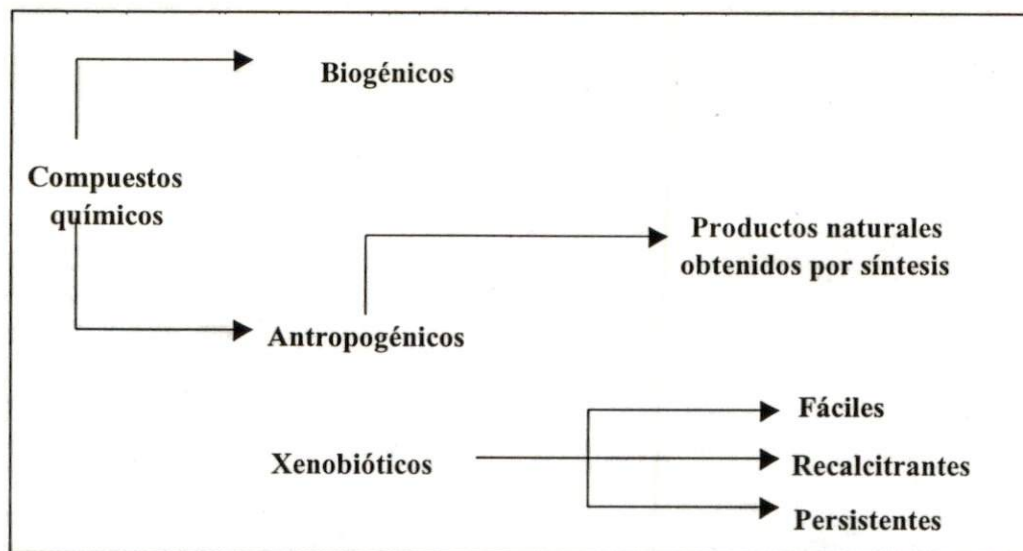
Hoy en día uno de los problemas más graves que enfrenta la humanidad es la contaminación del medio ambiente. Es por esta razón que los gobiernos se han dado a la tarea de crear normas que permitan reglamentar la emisión de contaminantes al medio ambiente, como una medida de prevención. Por otro lado, la comunidad científica trabaja de forma paralela en el desarrollo de nuevas tecnologías, teniendo como metas el desarrollo sustentable y la cero emisión de contaminantes.

En la ciudad de México, una gran parte de la contaminación es generada por la industria, debido a la falta de una legislación y al escaso control sobre las emisiones; a ésta poco a poco se le ha sumado la proveniente de los vehículos automotores, debido a los problemas de tránsito y a la falta de interés de sustituir el parque vehicular, así como a la pobre calidad de los combustibles entre otros. Estas fuentes de contaminantes se pueden clasificar como fuentes fijas y móviles respectivamente. En ambos casos el problema está asociado a la emisión de gases de combustión.

Puntualizando en el caso del aire, éste se encuentra contaminado con diversos compuestos orgánicos volátiles (COVs), tales como solventes, monómeros, hidrocarburos y olores desagradables (compuestos azufrados y materia orgánica en descomposición). Algunos de estos compuestos son generados por diversas industrias, así como por plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), basureros, gasolineras, talleres de pintura, expendios de productos químicos, etc. Actualmente, la emisión de ciertos de estos contaminantes a la atmósfera tienen un papel importante (como precursores) en la formación de ozono, el cual es considerado como primer componente del smog. Además, hay que agregar el efecto toxicológico de algunos de estos compuestos. Un ejemplo es el benceno, el cual ha sido relacionado con efectos negativos sobre la salud incluyendo la leucemia (Romieu y col., 1999) sin olvidar a otros que son considerados cancerígenos y otros desagradables al olfato (aún en pequeñas concentraciones) como el H₂S.

Para el caso de los COVs, Ottengraf en 1987, propone una clasificación en función de su biodegradabilidad, como se muestra en el cuadro 1.1; los compuestos biogénicos, son compuestos de origen natural tales como las cetonas, alcoholes, ésteres etc., mientras que los compuestos antropogénicos, son los sintetizados por el hombre y los compuestos xenobióticos son aquellos que no existen de forma natural como el metil terbutil éter (MTBE), en lo que respecta a este último grupo de compuestos, hay que enfatizar que su incremento ha sido importante, ya que en 1960, se tenía conocimiento de aproximadamente un millón de sustancias, mientras que para 1980, ya se conocían 5 millones de las mismas (Albert, 1990).

La degradación de estos compuestos en la naturaleza se ve afectada por factores físicos, químicos y biológicos, así como la naturaleza del compuesto a degradar.



Cuadro 1.1 Clasificación de los compuestos químicos debido a su biodegradabilidad según Ottengraf (1987).

Actualmente existen varias tecnologías para el tratamiento de efluentes gaseosos contaminados, éstas pueden ser de tipo fisicoquímico, tales como: adsorción en carbón activado, oxidación catalítica, incineración térmica y lavado químico.

Asimismo, hoy en día la oxidación biológica o también llamada “biopurificación” es una alternativa de control y eliminación de COVs; dicha tecnología se basa en la capacidad metabólica de diversos microorganismos para la oxidación de estos compuestos. Esta técnica, es actualmente aplicada en Alemania, Holanda, Japón y más recientemente en los Estados Unidos y se está aplicando a industrias farmacéuticas, de alimentos, de pinturas y PTAR, entre muchas otras.

§ 1.1 Aspectos generales de la contaminación en la ciudad de México

La zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM) es un ejemplo de una ciudad donde el problema de la contaminación del aire ha tenido una importante evolución en muy poco tiempo, causando riesgos de salud a los habitantes.

La población en la ZMCM es de alrededor de 20 millones (aproximadamente una quinta parte de la población total del país); esta ciudad cuenta con 30,000 industrias y 12,000 establecimientos prestadores de servicios. Por otro lado, el parque vehicular es de alrededor de 2.8 millones de vehículos (incluyendo el transporte público), toda esta actividad requiere de 20 millones de litros de gasolina y diesel diarios, 1.8 millones de litros de otros combustibles y 340 millones de pies cúbicos de gas natural (Bravo y col., 1997). Toda esta actividad ha causado un incremento en las emisiones de monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NOx) y COVs.

Un indicador indirecto de la calidad del aire lo constituye el consumo de energéticos empleados en los sectores productivos, transporte y doméstico, ya que en su mayor parte,

los contaminantes emitidos a la atmósfera son el resultado de la combustión de diferentes tipos de combustibles (Comisión Ambiental Metropolitana, Zona Metropolitana de la ciudad de México, 1997).

Lo anterior nos lleva a una identificación de las fuentes que emiten contaminantes a la atmósfera; con este propósito se realizó un inventario de emisiones en 1996. Esta actividad es importante y a la vez compleja, ya que demanda la instrumentación y aplicación de métodos bien definidos que permitan estimar el tipo y la cantidad de contaminantes que se incorporan a la atmósfera. La información recopilada permitirá la toma de decisiones encaminadas a la aplicación de planes y programas de prevención y control de la contaminación del aire, la evaluación del cumplimiento de la normatividad ambiental establecida, el análisis de tecnologías disponibles y el seguimiento de la evolución del aumento o disminución en los volúmenes de emisión de contaminantes.

Tabla 1.1. Inventario de emisiones para ZMCM en toneladas por año. (Bravo y col., 1997)

Sector	Nox	Hidrocarburos	SO ₂	CO	Partículas
Plantas termoeléctricas	17,855	97	19	1,291	163
Almacenaje y Distribución de gasolinas	-----	20,127	-----	-----	-----
Venta y Distribución de gas L.P.	-----	242,272	-----	-----	-----
Industria	13,665	33,002	26,031	7,405	6,195
Servicios	5,339	136,034	7,217	948	1,077
Transporte	91,787	555,321	12,201	2,348,498	18,842

De esta forma, se sabe que en la ZMCM la mayor parte de las emisiones de monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno e hidrocarburos se generan por el consumo de gasolina y diesel en el sector transporte, como se puede observar en la tabla 1.1

A diferencia de las emisiones industriales y vehiculares, recientemente las emisiones biogénicas en la ZMCM empiezan a ser consideradas como una fuente significativa de emisión de hidrocarburos. En otros países se ha reconocido que del total de las emisiones de COV generadas, las fuentes biogénicas contribuyen hasta con cerca del 20%, que además, por el tipo de compuestos que emiten, estos participan en la formación de ozono en las zonas urbanas, en presencia de óxidos de nitrógeno y luz solar. Las emisiones biogénicas obtenidas fueron del orden de las 131 mil toneladas anuales; los valores más altos de las emisiones biogénicas totales se obtienen para el isopreno, seguido por el monopreno y de los demás COVs. Los óxidos de nitrógeno se producen en el suelo como resultado de los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación y por algunos mecanismos químicos que involucran a los nitritos, las emisiones de NO_x fueron de 1,279 toneladas

durante 1996. Por todo lo anterior, se deduce que los hidrocarburos no deben de ser tomados a la ligera ya que son de gran importancia para efectos de contaminación atmosférica, sobre todo como precursores de ozono (Riveros, 1995).

§ 1.2 Hidrocarburos y compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Los hidrocarburos, se pueden clasificar en tres grandes familias de interés: oleofinas, parafinas y aromáticos, mientras que los COVs son considerados un subgrupo de los hidrocarburos. Estos compuestos reaccionan con óxidos de nitrógeno en presencia de luz solar (reacciones fotoquímicas) para formar ozono, el cual es considerado un compuesto primario del smog.

Todas estas sustancias cuando se emiten a la atmósfera reaccionan entre sí formando y destruyendo, en diferentes tiempos y velocidades, especies químicas distintas a las que las originaron. La complejidad de la mezcla de hidrocarburos y COVs existentes en la atmósfera determinan en gran medida los tiempos y velocidades en que se forma el ozono. En dicha formación también influye la naturaleza de los compuestos intermediarios en la secuencia de las reacciones fotoquímicas; entre estos destacan los aldehídos que actúan como iniciadores y que aumentan la velocidad de las foto-oxidaciones.

La presencia y concentración de diferentes especies puede asociarse con las fuentes de procedencia. Así, las oleofinas ligeras (etileno y propileno) provienen principalmente de las emisiones vehiculares; las parafinas (C5) se asocian con las emisiones evaporativas en gasolineras, mientras que el tolueno refleja indudablemente actividades relacionadas con el uso de solventes en la industria y los talleres de pintura.

Por otro lado, uno de los términos más utilizados en la industria de los solventes es el de COV, este se usa en productos tales como tintas, adhesivos, desengrasantes, agentes limpiadores, lubricantes y combustibles entre muchos otros. En la tabla 1.2 se presenta una breve lista de algunos COVs más comunes, aunque cabe resaltar que los últimos tres rubros son categorías básicas de compuestos químicos que abarcan miles de compuestos individuales (Ruddy y Carrol, 1993).

Tabla 1.2 Algunos COVs

Tolueno
VCM
Xileno
Isopropanol
Etilen glicol
Destilados de petróleo
Naftas
Metil etil-cetona
Acetona
Parafinas
Oleofinas
Aromáticos

La producción de estos compuestos se da a gran escala (la producción mundial de tolueno es de alrededor de 10 millones de toneladas; www.gobi.co.uk: 2000) y se sabe que una gran cantidad de estos solventes no se alteran químicamente durante su utilización, así que después de realizar su función, son emitidos a la atmósfera. Las emisiones de COVs al aire son generadas por muy diversas fuentes, algunas de estas son las denominadas TAFDs, que significan Tratamiento, Almacenaje y Facilidades de Disposición. Estas fuentes de emisión incluyen tierras de relleno sanitario, tanques y contenedores abiertos, goteras, equipos de transporte (pipas), así como operaciones de manejo y sistemas de control para la contaminación (Shen y col., 1990).

En el caso de las emisiones de COVs, la legislación de los Estados Unidos postula que las áreas de emisión no deben de exceder el estándar de calidad de aire, que es de 0.12 ppm. Lo anterior está descrito en el apartado I del Acta de Aire Limpio de 1990. Así mismo, el apartado III propone la reducción de emisiones de 189 contaminantes peligrosos para el aire, algunos de los cuales son incluidos bajo la definición de COV (Ruddy y Carrol, 1993).

§ 1.3 Los hidrocarburos y los COVs como precursores de ozono

La producción de ozono en la tropósfera, esta directamente relacionada con la conversión de óxido nítrico (NO) a dióxido de nitrógeno (NO₂). Estas reacciones van acompañadas de radicales peróxido (HO₂ y RO₂) que se producen durante la oxidación de los hidrocarburos y de los COVs.

Los hidrocarburos son eliminados de la atmósfera mediante un sinnúmero de reacciones químicas y fotoquímicas, son fácilmente oxidados ya que son termodinámicamente inestables. Algunas de las principales reacciones involucradas en la oxidación atmosférica de los hidrocarburos pueden ser explicadas tomando al metano como ejemplo, ya que este es el hidrocarburo más común y ampliamente disperso atmosféricamente (Manahan, 1991). Al igual que otros hidrocarburos, éste reacciona con átomos de oxígeno (generalmente producidos por la disociación fotoquímica de NO₂) para generar radicales metil e hidroxilo.



El radical metil reacciona rápidamente con oxígeno molecular para formar radicales peroxi, muy reactivos, que con el metano forman el radical metoxi ($\text{H}_3\text{COO}^\bullet$).



Estos radicales participan en una variedad de reacciones subsecuentes, principalmente las involucradas en la formación del smog. De tal forma que el radical hidroxilo reacciona rápidamente con los hidrocarburos para formar radicales hidrocarbonados muy reactivos (en este caso el radical metilo $\text{H}_3\text{C}^\bullet$). Las siguientes son algunas reacciones involucradas en la oxidación total del metano (Manahan, 1991):



La especie CH_3OONO_2 , es el nitrato de peroxiacetil (PAN), que es un fuerte oxidante.

Estas reacciones son responsables de la formación de los óxidos de nitrógeno (NO_x), siendo estos los principales responsables del ciclo de oxidación para la formación de ozono en la troposfera.

El mecanismo de reacción de diversos COVs, está dado mediante el siguiente ciclo de reacciones (Seinfeld, 1990):



Posteriormente:



Donde $h\nu$ es energía de la radiación ultravioleta.

El potencial neto para la formación de ozono (reactividad de los COVs), depende básicamente de tres factores:

- 1) La velocidad de reacción de los radicales hidroxilo.
- 2) El número de radicales peroxi formados durante la reacción.
- 3) La importancia de los intermediarios formados durante la reacción.

§ 1.4 Tecnologías para el control de emisiones de COVs

Se sabe que las principales fuentes de emisión de COVs son: los vehículos, la evaporación de combustibles durante su manejo, las refinerías, las industrias petroquímicas, las tintorerías, las desgrasadoras, el proceso de asfaltado, establecimientos donde se pintan autos, los basureros y las PTAR (Múgica-Alvarez y col., 1997). Las estrategias para el control de COVs se inician con un inventario de emisiones que proporcione la información necesaria para seleccionar la tecnología de control más adecuada.

Las técnicas (físicoquímicas y biológicas) más utilizadas para el tratamiento de COVs (Rodney y Pennington, 1996), son:

- Incineración térmica.
- Incineración catalítica.
- Adsorción con carbón activado.
- Lavado químico.
- Tecnologías biológicas (biofiltración).

A continuación, se discuten cada una de estas tecnologías poniendo de manifiesto sus principales características de operación y aplicación.

§ 1.4.1 Incineración térmica

La incineración térmica es un proceso simple, que se realiza a altas temperaturas. Los contaminantes se mezclan con gas natural para ser llevados hasta CO_2 y agua mediante la incineración. Parte del calor generado a lo largo de este proceso puede ser recuperado, lo cual constituye una importante alternativa en la recuperación de energía que posteriormente puede ser utilizada en alguna otra operación unitaria (Rodney y Pennington, 1996).

Los parámetros más importantes en la incineración térmica son: el tiempo de residencia en el incinerador, la temperatura de la flama y el grado de mezclado del flujo de gas contaminado con la flama.

El tiempo de residencia determina el grado de combustión y éste depende del mezclado en la flama (Salemink, 1990). Dicho tiempo oscila entre 0.5 y 1.0 segundo, obteniendo eficiencias de más del 95 % (Ruddy y Carrol, 1993). La temperatura utilizada en este proceso depende de los componentes presentes en el gas a tratar, pero suele situarse entre 800 y 900 °C.

Las ventajas de la incineración térmica son una alta eficiencia y una operación simple. Su principal desventaja es que a bajas concentraciones de contaminante es necesario utilizar combustible extra, lo que incrementa los costos de operación. Además, en este proceso se generan grandes cantidades de óxidos de nitrógeno (NO_x) y en la combustión de hidrocarburos clorados se produce HCl.

§ 1.4.2 Incineración catalítica

En la incineración catalítica se realiza el mismo proceso que en la incineración térmica. Pero en presencia de un catalizador que disminuye la energía de activación a fin de que este proceso se efectúe a una menor temperatura, normalmente entre 500 y 600 °C. La cantidad y tipo de catalizador depende del tipo de COV que va a ser oxidado. Cuando se emplean catalizadores de metales nobles, la cantidad de catalizador varía entre 0.025 y 0.035 m³ (lecho) / 1000 m³ (de gas) (Salemink, 1990). Con estas características se obtiene una eficiencia del 95 % (Ruddy y Carrol, 1993).

Su ventaja más importante es la alta eficiencia que se obtiene, sin olvidar la simplicidad del proceso; mientras que su principal desventaja es atribuida a la contaminación de la superficie del catalizador, tendiendo a desactivarse y como consecuencia a ser reemplazado. Por otro lado, no todos los tipos de COVs pueden ser oxidados empleando esta tecnología, en particular los compuestos orgánicos que contienen cadenas halogenadas.

§ 1.4.3 Adsorción en carbón activado

La adsorción es el proceso en que los componentes son retenidos sobre una superficie. En este caso, los contaminantes orgánicos del gas a tratar se adsorben sobre la superficie de gránulos de carbón activado. La cantidad de contaminantes que quedan atrapados depende de la capacidad de adsorción del carbón y del tipo de contaminante. En general puede decirse que la capacidad de adsorción se incrementa con el peso molecular y con la polaridad del compuesto a adsorber; la temperatura y la presión también son parámetros importantes.

En el caso de adsorción regenerativa, el equipo consiste en dos lechos que por turnos son cargados (adsorción) y regenerados (desorción). La regeneración puede realizarse con vapor o con aire caliente. En el caso de regeneración con vapor, éste es condensado y los contaminantes son recolectados en la fase acuosa, la cual debe de ser purificada posteriormente. Como regla, la adsorción regenerativa sólo es usada con concentraciones mayores de 0.5 g/m³ con concentraciones menores se usa solamente adsorción simple (Salemink, 1990).

Las ventajas de esta tecnología son: una eficiencia entre el 90 y 98 % (Salemink, 1990), es una técnica adecuada para un gran número de compuestos muy diferentes y en algunos casos, existe la posibilidad de reutilizar los compuestos adsorbidos.

Los siguientes aspectos pueden ser considerados como desventajas de la adsorción (regenerativa) en carbón activado (Salemink, 1990). Se necesita vapor o aire caliente para el proceso de regeneración, además de generar una corriente líquida con contaminantes, durante este proceso. El influente gaseoso, no podrá tener una temperatura mayor a los

40°C, con una humedad relativa del 60 %. Por lo anterior, en algunos casos es necesario un pretratamiento. Por otro lado, en condiciones secas, el carbón activado es flamable.

Para un cierto número de componentes, el carbón activado no es adecuado como agente adsorbente; es el caso de compuestos difíciles de desorber (hidrocarburos con un alto punto de ebullición) o compuestos que polimerizan o dan origen a enlaces con la superficie del carbón (estireno y peróxidos) y lo más importante es que esta tecnología tiene altos costos de operación (Deviny y col., 1999).

§ 1.4.4 Lavado químico

El lavado químico se realiza empleando un agente oxidante, el cual se adiciona de forma gradual al agua empleada para el lavado. Generalmente, estos agentes son cloro, ozono, hipoclorito o permanganato.

Entre las ventajas de este método se puede mencionar su rapidez. Por ejemplo, cuando se emplea ozono, se requiere un tiempo de reacción de 30 segundos. El lavado químico tiene un 95% de eficiencia para COVs y CIVs biodegradables. Algunas de sus desventajas se refieren a que este método es poco eficiente para hidrocarburos y otros compuestos ligeramente reactivos, además de que los reactivos empleados como agentes oxidantes son corrosivos y peligrosos. En algunos casos, la cantidad de agua utilizada es considerable y entonces los costos de alcantarillado tienen que ser tomados en consideración.

§ 1.4.5 Sistemas biológicos (biofiltración)

La biofiltración es una técnica que combina los principios de la adsorción del carbón activado y del lavado químico. Esta combinación permite tener eficiencias entre un 80 y 99 % para un amplio rango de COVs (Ruddy y Carrol, 1993). Si comparamos el proceso de biofiltración con las demás tecnologías, observaremos que la principal diferencia entre estas oxidaciones estriba en que con la biofiltración, la oxidación se realiza bajo la influencia de un sistema biológico que contiene al menos un catalizador enzimático para cada compuesto, mientras que en los otros casos esto no es posible. Lo anterior, debe a que en la biofiltración se utilizan microorganismos, los cuales se encuentran adheridos a un medio poroso para degradar el contaminante que se encuentra en la fase gaseosa (Deviny y col., 1999).

El biofiltro en su forma más sencilla (fig. 1.2), está constituido por un soporte o material filtrante y una población microbiana, responsable del proceso de oxidación. El tamaño de un biofiltro depende en gran medida de la concentración de los contaminantes del gas a tratar y de la biodegradabilidad de estos. De acuerdo a estos factores y al volumen del material filtrante, el tiempo de residencia se encuentra entre los 5 y 75 segundos. Por otro lado, flujos con concentraciones mayores a 4 ó 5 g/m³ no pueden ser tratados satisfactoriamente con esta tecnología (Salemink, 1990).

El importante desarrollo que ha tenido la microbiología en los últimos años y la experiencia obtenida con la instalación y operación de biofiltros (van Lith, 1989; Jol y Dragt, 1988), nos demuestra que son muy pocos los compuestos contaminantes que no pueden ser degradados por microorganismos bajo condiciones aeróbicas. Al respecto, Leson y Winer, 1991, reportan capacidades de eliminación (CE) de 50 a 100 $\text{g/m}^3\text{h}$ para compuestos fáciles de degradar tales como alcoholes, cetonas y algunos hidrocarburos aromáticos; Weckhuysen y col. (1993), observaron CE de 90 $\text{g/m}^3\text{h}$ para butanol y García-Peña y col. (2001) reportaron CE para el tolueno de 250 $\text{g/m}^3\text{h}$.

Las ventajas de la biofiltración se resumen de la siguiente manera una alta eficiencia de remoción, para un gran grupo de COVs: cetonas, ésteres, alcoholes, compuestos olorosos y compuestos aromáticos entre otros (Leson y winer, 1991); bajos costos de instalación, operación y mantenimiento; caídas de presión mínimas y lo más importante es que no se genera contaminación secundaria, como en el caso de las tecnologías fisicoquímicas (Salemink, 1990; Deviny y col., 1999).

Las principales desventajas de la biofiltración son: que no puede ser utilizada para tratar flujos gaseosos con altas concentraciones de contaminantes y la dificultad en el control de humedad dentro del biofiltro.

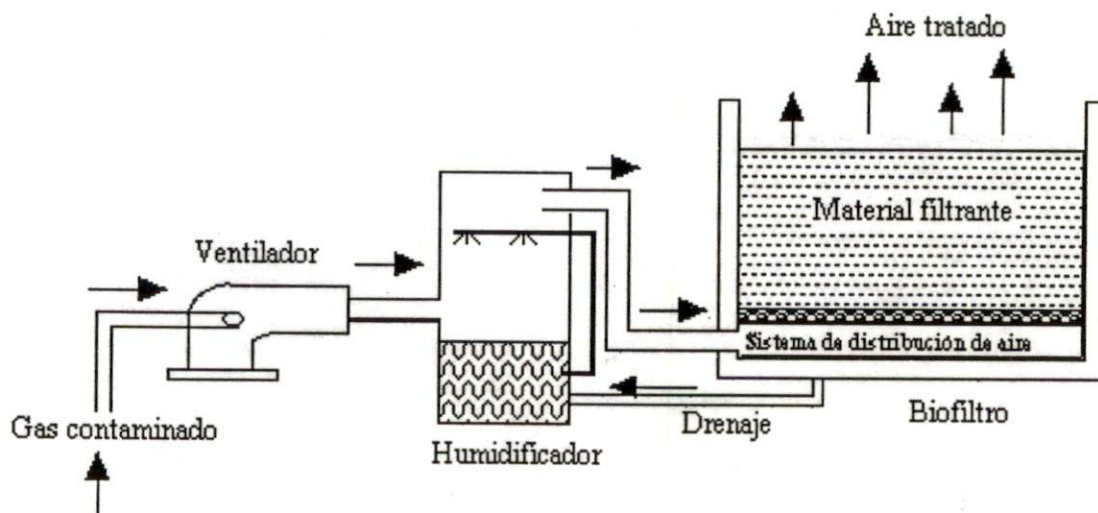


Fig.1.2 Diagrama de un sistema de biofiltración abierto (Leson y Winer, 1991)

§ 1.4.6 Comparación de tecnologías para el tratamiento de COVs

La selección de un método para el control y eliminación de los compuestos contaminantes, implica un profundo análisis de las características del contaminante (concentración y tipo), así como el costo de las tecnologías (Ruddy y Carrol, 1993; Rodney y Pennington, 1996). De esta manera, el factor económico suele ser el punto más importante para elegir alguna de estas tecnologías. A continuación se presenta a manera de resumen una tabla que nos permite analizar cual de estas tecnologías empleadas en el tratamiento de gases suele ser

más económica y cuáles son sus alcances y limitaciones, en lo que al rango de concentraciones de operación se refiere.

Tabla 1.3 Comparación entre las técnicas disponibles para el control de COVs (Ruddy y Carrol, 1993; Van Lith y col., 1997).

Tecnología	Categoría de COVs	Rango de concentración en PPM	% de eficiencia	Costos USD/m ³	Residuos Secundarios
Oxidación térmica	<i>HCA, HCH, A, K</i>	100-2000	95-99	2-9	Productos de combustión
Oxidación catalítica	<i>HCA, HCH, A, K</i>	100-2000	90-95	2-8	Productos de combustión
Adsorción en carbón activado	<i>HCA, HCH, A</i>	20-5000	90-98	9-33	Carbón saturado
Lavado químico				3-4	Agua con agente oxidante
Biofiltración	<i>HCA, HCH*, A, K</i>	< 2000	90-95	0.2-5	Ninguno

HCA= Hidrocarburos Alifáticos y Aromáticos. *HCH*= Hidrocarburos Halogenados.
A= Alcoholes, Glicoles, Éteres, Epóxidos y Fenoles. *K*= Cetonas y Aldehídos
 * Aplicación limitada.

De los datos presentados en la tabla 1.3 y tomando en cuenta el factor económico como un criterio importante al momento de hacer una selección, tenemos que: la adsorción en carbón activado es la tecnología más costosa para el control de emisiones de COVs. En la práctica, esto puede justificarse cuando los compuestos a tratar pueden ser recuperados y posteriormente reutilizados. En el caso de la incineración térmica, esta tecnología es una alternativa costosa para la purificación de gases. Aunque en la práctica, la incineración térmica puede ser la más adecuada cuando se tienen una alta concentración de COVs y grandes requerimientos de calor dentro del proceso, ya que éste último puede ser proporcionado a través del sistema de recuperación, contenido en el mismo incinerador. La incineración catalítica resulta ser un método más económico que la incineración térmica. Sin embargo, en algunos casos esta tecnología no puede ser empleada debido a los posibles envenenamientos del catalizador. La biofiltración, es el método más económico para limpiar gases contaminados con COVs. En este momento la biofiltración parece ser la

tecnología más adecuada y segura, aunque ésta no puede ser empleada en todos los casos, por ejemplo cuando se tienen concentraciones mayores de 5 g/m^3 o flujos con compuestos que no pueden ser degradados biológicamente. En estos casos, las otras tecnologías tienen que ser tomadas en cuenta al momento de realizar una posible selección.

De lo anterior, se concluye que cuando buscamos una solución para el problema de las emisiones de COVs, en primer término, la reutilización o la recuperación de dichos compuestos tiene que ser considerada. Posteriormente, las técnicas de oxidación o destrucción son tomadas en cuenta; entre éstas, se encuentra la biofiltración, que cuando es aplicable puede ser la alternativa económicamente más atractiva, frente a los métodos tradicionales para el tratamiento de COVs, sobre todo si la corriente a tratar contiene bajas concentraciones del contaminante lo que actualmente representa un problema general en la industria donde un biofiltro puede funcionar de manera adecuada.

§ 1.5 Sistemas biológicos, para el tratamiento de COVs en efluentes gaseosos

La nueva era de la biotecnología esta basada en un amplio abanico de conocimientos científicos y técnicos de los sectores químico, farmacéutico, agrícola y ambiental, entre otros.

En materia de medio ambiente, en la última década los aspectos de legislación, respecto a límites de emisión de diversos contaminantes se han hecho más estrictos. Es por esta razón que diversos grupos de investigación trabajan para proponer posibles soluciones a los problemas de contaminación del suelo, agua y aire. Lo anterior, ha llevado a la instalación de diversos sistemas de control más eficientes para disminuir la emisión de sustancias tóxicas al medio ambiente (Ruddy y Carrol, 1993).

Dentro de este marco, tenemos a los procesos de purificación biológica. Estos basan su operación y éxito en la capacidad metabólica de diversos microorganismos de degradar compuestos tóxicos (generalmente bacterias, un reducido grupo de levaduras y algunos hongos filamentosos).

Esta capacidad, se debe a la evolución que los microorganismos han sufrido durante millones de años. Dicho proceso evolutivo ha dado origen a sistemas enzimáticos, que permiten degradar adecuadamente compuestos biogénicos, antropogénicos, así como algunos compuestos xenobióticos (con estructuras no naturales) que presentan una biodegradabilidad pequeña (compuestos recalcitrantes) o nula (compuestos persistentes) (Ottengraf y Disks, 1990).

Debido a que la degradación se realiza en la mayor parte de los casos en condiciones aeróbicas, estos microorganismos oxidan los compuestos hasta CO₂ y H₂O como productos finales del proceso metabólico. Parte de estos compuestos se transforman en nuevo material celular (Fig. 1.3).

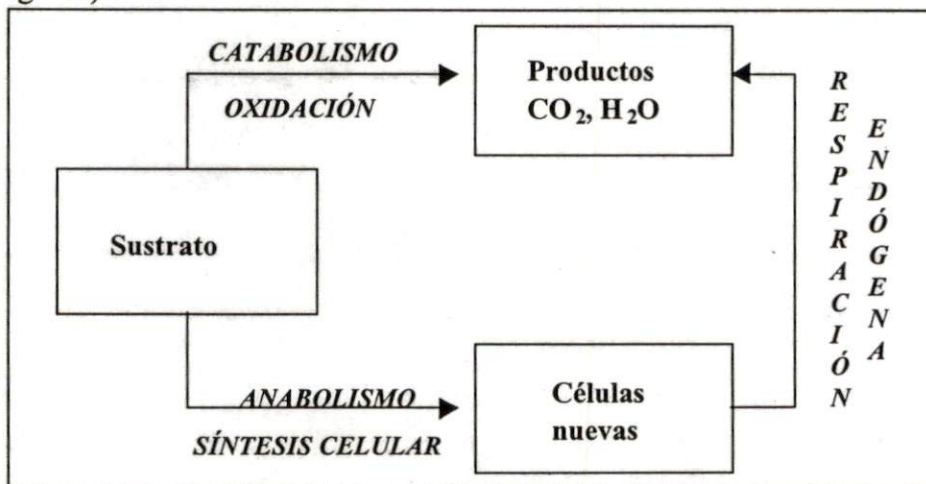


Figura 1.3 Eliminación del sustrato, debido a la oxidación microbiológica.

§ 1.5.1 Clasificación de los diferentes sistemas biológicos

Existen tres tipos de sistemas de purificación biológica de corrientes gaseosas contaminadas, que presentan las condiciones apropiadas para la oxidación de diferentes COVs. Estos son: biolavadores, filtros de escurrimiento y biofiltros (tabla 1.4).

Estos equipos se identifican por el comportamiento de la fase líquida y de la flora microbiana. Dicha fase puede estar en continuo movimiento o estacionaria; los microorganismos, se pueden encontrar libres y dispersos en la fase acuosa, o inmovilizados en un material de empaque.

Tabla 1.4 Clasificación de los sistemas según el comportamiento de la fase acuosa.

		Fase acuosa	
		<i>En movimiento</i>	<i>Fija</i>
Flora Microbiana	<i>Dispersa</i>	Biolavador	
	<i>Inmovilizada</i>	Lecho de escurrimiento	Biofiltro

§ 1.5.1.1 Biolavadores

Estos equipos, han sido utilizados en diversas ramas de la industria, básicamente para desodorizar los efluentes gaseosos. El biolavador consta generalmente de un compartimiento lavador y un compartimiento de regeneración (fig. 1.4). El lavador es una columna irrigada, en donde las gotas de agua con microorganismos son distribuidas a contracorriente con el gas a tratar. Esto permite una continua transferencia de masa de contaminantes y oxígeno del gas hacia la fase líquida.

La velocidad de transferencia de masa de un compuesto está determinada por el producto del coeficiente de transferencia de masa, el área de contacto y el gradiente promedio (la diferencia entre la concentración de equilibrio y la concentración real en la fase acuosa). La absorción de un compuesto puede ser alta si su concentración en el agua de lavado es baja y su solubilidad es alta. Sustancias absorbidas en el agua pueden ser oxidadas a través de la actividad microbiana y eliminadas de la fase líquida por una suspensión de lodos activados en el compartimiento de regeneración.

El mezclado por agitación o por aireación suele ser necesario para prevenir la sedimentación de los lodos microbianos. El control de las condiciones físicas y químicas (ejemplos: temperatura, pH, concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo) es necesario para asegurar una oxidación óptima.

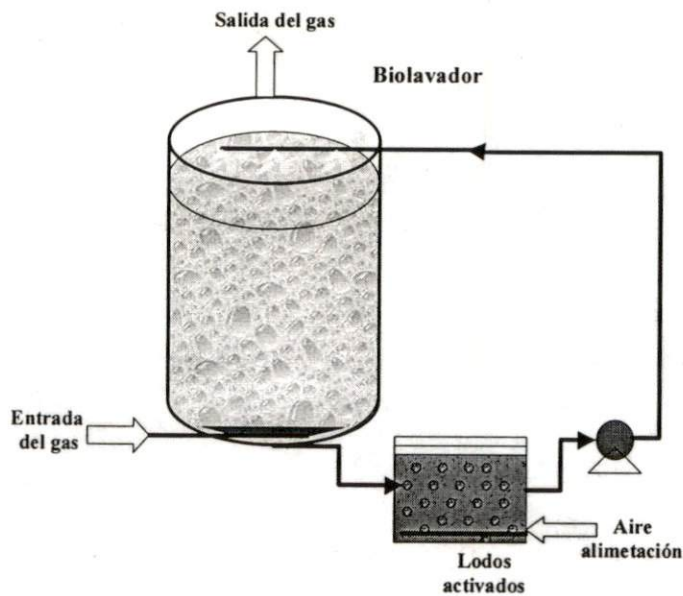


Fig. 1.4 Diagrama de proceso de un biolavador.

§ 1.5.1.2 Filtros de escurrimiento

En contraste con los biolavadores, en los filtros de escurrimiento el proceso de absorción del contaminante en la fase líquida y la regeneración de la misma ocurren de manera simultánea. El filtro de escurrimiento consiste en columnas empacadas sobre cuya superficie se desarrolla una biopelícula de varios milímetros de espesor (Ottengraf, 1987). El área específica (área de contacto por unidad de volumen de columna) del empaque puede ser relativamente baja, $100-300 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$ (Ottengraf, 1987), permitiendo la existencia de un gran volumen vacío por donde pasa el gas, minimizándose así la caída de presión en la columna y el riesgo de que el espacio vacío sea obstruido por el crecimiento bacteriano o por parte de la biopelícula desprendida.

La fase líquida contiene los nutrientes inorgánicos disueltos y es suministrada por la parte superior de la columna y distribuida de manera homogénea sobre la sección transversal de la misma. El flujo de agua descendente rodea en películas delgadas al material de empaque, y humedece la biopelícula. El gas residual es forzado a pasar a contracorriente del líquido. El oxígeno, así como los componentes solubles en agua, se transfieren a la fase líquida, y posteriormente a la biopelícula, donde son transformados o eliminados mediante reacciones biológicas aerobias.

Las columnas o filtros de escurrimiento se han usado por varias décadas para el tratamiento de aguas residuales. El modo de operación es esencialmente el mismo cuando se aplica a la purificación de gases residuales (Ottengraf, 1987).

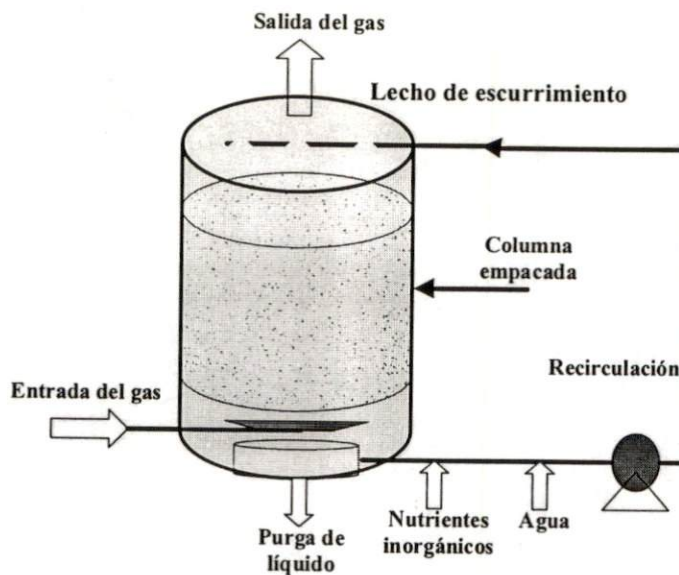


Fig. 1.5 Diagrama de proceso de un lecho de escurrimiento.

§ 1.5.1.3 Biofiltros

En sus inicios, la biofiltración fue utilizada principalmente para eliminar los olores en las plantas de tratamiento de aguas y sitios similares (Ottengraf, 1987). El diseño convencional de estos sistemas se muestra en la figura 1.6.

El gas contaminante se hace pasar a través de una capa de empaque natural, biológicamente activo (composta, turba, etc.). Este material suele mezclarse con pedazos de madera, ramas o con materiales inertes tales como anillos pall o piezas de plástico corrugado (Ottengraf y Disks, 1990; van Groenestijn y Hesselink, 1993), con este tipo de combinaciones se crea una estructura ligera por donde pasa el gas, con lo que se evita así la compactación del lecho y se obtienen bajas caídas de presión. El material de empaque sirve como soporte para los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, los cuales rodean al material que constituye el lecho y forman sobre su superficie una biopelícula.

Las partículas con las que se empaican los biofiltros son usualmente de tamaño razonable, lo cual proporciona una superficie de adsorción adecuada y una resistencia mínima al flujo, ya que si se utiliza una superficie pequeña, será necesario un equipo de mayor tamaño y consecuentemente un volumen de equipo que no resulte económico. Aunado a lo anterior, una gran resistencia al paso del gas requiere de un excesivo consumo de energía, lo que repercute de manera directa en los costos de operación del equipo.

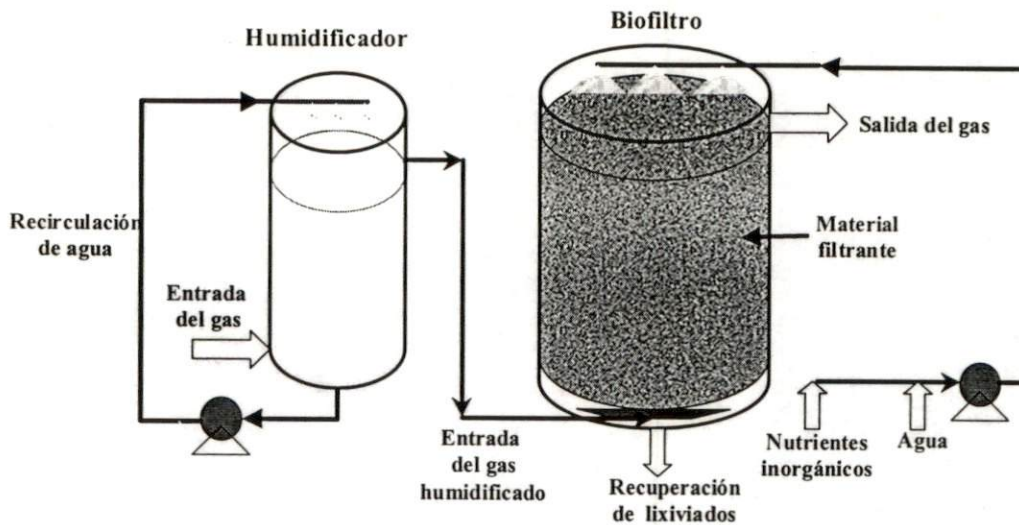


Fig. 1.6 Diagrama de proceso de un biofiltro experimental.

§ 1.6 Bases de diseño y operación de un biofiltro

Treinta años han sido acumulados en el diseño y construcción de biofiltros a través de la experimentación y práctica; sin embargo, la óptima operación de un biofiltro involucra un conocimiento fundamental de estos sistemas, ya que generalmente no operan con el mismo contaminante, concentración, flujo de aire, temperatura y humedad (Devinny y col., 1999). Por lo tanto, para obtener sistemas de biofiltración con alta eficiencia de remoción de contaminantes, es necesario tomar en cuenta cada uno de los parámetros antes mencionados. Dicha eficiencia se basa en el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos dentro del biofiltro y éstos dependen tanto de la cantidad de oxígeno disuelto en la biopelícula, como de la ausencia de inhibidores para los microorganismos, de la disponibilidad de nutrientes, de la suficiente humedad y de rangos adecuados de temperatura y pH.

A continuación se discuten cada uno de estos puntos:

§ 1.6.1 Microorganismos

Una gran variedad de microorganismos han sido estudiados en relación con los biofiltros, ya que se sabe que varios de estos se encuentran involucrados en la degradación de COVs. Dentro de los cuales, tenemos principalmente a las bacterias y los hongos. Estos en su mayoría son heterotróficos, es decir, que emplean los constituyentes del gas a tratar como única fuente de carbono (anabolismo) y energía (catabolismo) y los transforman en CO_2 y H_2O . Aproximadamente el 50 % del carbón contenido en el sustrato está involucrado en cada reacción (Diks y col., 1991). Figura 1.3.

Muchos de los microorganismos encontrados en materiales de empaque de los biofiltros no inoculados, son bacterias. Dependiendo de la composición del flujo gaseoso y las

condiciones fisicoquímicas en el filtro, se desarrollan diferentes mezclas de poblaciones (Cox y col., 1996). Rieneck (1992), encontró que muchas de las bacterias presentes son corineformes y formadoras de esporas, es decir, bacilos y ocasionalmente son *Pseudomonas*. Los Actinomicetos son frecuentemente representados por *Streptomyces spp.* Las levaduras y los hongos pueden pertenecer a los géneros *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Clostridium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria* y *Botritis*. De acuerdo con Pearson y col. (1992), el total de bacterias contadas en un biofiltro se encuentra en un rango entre 5×10^7 y 3×10^{10} UFC/g de empaque.

Algunos investigadores han estudiado la distribución espacial de los microorganismos en los biofiltros y han observado que la remoción de compuestos orgánicos volátiles es mayor cuando la densidad de microorganismos es alta (Ottengraf y van den Oever, 1983). La biodegradación de compuestos, en particular xenobióticos, puede requerir la inoculación del biofiltro con microorganismos que hayan sido expuestos previamente al contaminante. Suspensiones de suelo y de microorganismos especialmente cultivados han sido utilizados como inóculo para la degradación de ciertos compuestos (Corsi y Seed, 1995). La presencia de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos es necesaria para la biofiltración de BTX.

Como resultado de la combinación de estos inóculos previamente adaptados con el material de empaque se generan cambios sobre las poblaciones microbianas existentes y se favorece a las especies que metabolizan los contaminantes deseados. Se sabe que para compuestos orgánicos fáciles de degradar, el tiempo de adaptación es aproximadamente de 10 días (Ottengraf y col., 1986).

Lo anterior ha permitido que algunos cultivos microbianos hayan sido desarrollados y adaptados en laboratorios para degradar compuestos específicos. Algunos de estos son: *Pseudomonas* y *Nocardia*, especies de bacterias comunes en la degradación de compuestos orgánicos; *Flavobacterium* que puede adaptarse para oxidar compuestos tales como Pentaclorofenol; Mientras que *Hipomicrobium* parece ser hábil para degradar diclorometano (Jol y Dragt, 1988).

En el caso de los hongos, uno de los representantes más importantes es *Phanerochaete chrysosporium*, este organismo ha mostrado ser capaz de degradar diversos tipos de compuestos. El uso de hongos se debe a que estos microorganismos se desarrollan en hábitats naturales con bajos contenidos de agua. Por otra parte, van Groenestijn y Hesselink. (1993), postulan que las hifas aéreas de los hongos forman una gran área de superficie específica, la cual está en contacto directo con el flujo de aire que pasa a través del biofiltro

También existen trabajos de investigación de los que se obtiene información concerniente a la cinética de biodegradación (Bitzi, y col., 1991; Shareefdeen y col., 1993; Wang y Loh, 1999); estos autores, han trabajado en la degradación de mezclas de compuestos orgánicos utilizando monocultivos y mezclas de bacterias y han encontrado que el metabolismo para isopropanol, acetona, metanol y cloruro de metileno es muy similar. Este resultado

contrasta con las observaciones empíricas; debido a lo anterior, es necesario conocer más a fondo las vías metabólicas involucradas en la oxidación biológica de contaminantes para poder desarrollar un proceso de biotratamiento más eficiente.

§ 1.6.2 Material de empaque

Para una eficiente operación de los biofiltros, el material de empaque debe de cumplir con algunos requerimientos. En primer lugar, debe proporcionar condiciones ambientales óptimas para la población microbiana residente, esto permitirá mantener altas tasas de degradación. En segundo término, el tamaño de partícula y la estructura porosa deben proporcionar grandes superficies reactivas y bajas caídas de presión (Salemink, 1990). Tercero, la compactación debe ser mínima, para reducir así la necesidad del reemplazo y mantenimiento del material filtrante.

Otro tipo de recomendaciones para la operación de estos equipos son las siguientes: temperaturas cercanas a 30 °C, porcentajes de humedad del material de empaque alrededor del 50 % y rangos de pH entre 6 y 8 (Jol y Dragt, 1988).

En general, la característica más importante de los biofiltros es la composición del material de empaque, ya que el resultado de esa composición es un rico medio filtrante, en el cual una alta concentración de microorganismos vivos garantizan un máximo de bioactividad (Bureau y Bijl, 1986; Cárdenas-González y col., 1999).

Se han utilizado una gran cantidad de materiales de empaque, tales como la corteza, la composta, la turba y el suelo. Estos han resultado efectivos para diferentes contaminantes específicos y efluentes gaseosos (Hodge y col., 1991; Williams y Miller, 1992; Bohn, 1993).

Los materiales de empaque naturales, tales como la composta, requieren usualmente la adición de materiales inertes para prevenir la compactación, la cual puede crear una mala distribución del flujo. Ottengraf y col. (1986), recomiendan la adición de esferas de poliestireno para reducir las pérdidas de porosidad y prevenir el deterioro del lecho. Williams y Miller (1992), observan que el 60% en peso de las partículas en el filtro deben tener un diámetro efectivo mayor a 4 mm.

El material de empaque más utilizado es la composta (Ottengraf y Disks, 1990), lo anterior se corrobora varios años después ya que Corsi y Seed (1995) resaltan que el material de empaque que hasta el momento llena mejor los requerimientos para la degradación de BTX, es la composta. Además se ha visto que dependiendo del tipo de composta, en algunas ocasiones ésta puede proporcionar los nutrientes inorgánicos para el desarrollo de los microorganismos. Aunque, en general, la adición de nutrientes (sales minerales) es necesaria. Un ejemplo es el reportado por Morales y col. (1998) y Acuña y col. (1999). Ambos autores demostraron que la adición de nutrientes al material filtrante favorece significativamente la degradación de tolueno. La turba se forma como resultado de la

§ 1.7 JUSTIFICACION

La producción y utilización de nuevos compuestos ha crecido con el fin de satisfacer varias necesidades. Algunos de los compuestos cuyo uso se ha incrementado, entre muchos otros, los solventes. Por esta razón, es necesario estudiar sistemas mediante los cuales se pueda tratar biológicamente a este tipo de compuestos. En estudios previos, se ha visto que la biofiltración es una de las mejores alternativas a seguir.

Si bien la biofiltración ha sido principalmente estudiada en Europa y más recientemente en los Estados Unidos, actualmente en México se están realizando diversos estudios con la finalidad de comprender los aspectos básicos para su desarrollo en una mayor escala y su posterior aplicación a nivel industrial. A lo anterior se puede añadir que el proceso presenta ventajas económicas respecto a otras técnicas, que el estudiar y desarrollar estos sistemas desde un nivel básico ofrecen un trabajo de investigación de gran interés para la aplicación de sistemas de purificación biológica, con la posibilidad de tener contribuciones desde la comprensión del fenómeno hasta la implementación de estos sistemas.

Es por esto que en el presente trabajo se propone caracterizar un material de empaque, así como la obtención de los microorganismos capaces de degradar acetato de etilo, isopropanol y tolueno. Estos compuestos fueron seleccionados debido a que representan tres distintos grupos de compuestos químicos (aldehídos, alcoholes y aromáticos) respectivamente y representan en gran medida a los COVs.

Ya que el material de empaque es uno de los principales factores que afectan el desempeño de los biofiltros, el estudio y caracterización de este es de interés para entender y mejorar la operación de los biofiltros.

Por otro lado, los microorganismos son una parte fundamental en el proceso de biofiltración. Por esta razón es necesario el estudio microbiológico con la finalidad de comprender los fenómenos a nivel laboratorio para posteriormente tratar de aplicarlos en una escala mayor, que podría estar representado por un biofiltro a nivel planta piloto o escala industrial.

§ 1.8 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la biofiltración, enfocándonos en dos aspectos fundamentales:

- La caracterización física y microbiológica del material de empaque seleccionado: en este caso de la turba.
- Obtener y caracterizar un consorcio microbiano que sea capaz de degradar acetato de etilo (Ace), isopropanol (Iso) y tolueno (Tol).

§ 1.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar estudios físicos sobre el soporte incluyendo: retención de humedad, caída de presión, pH, isoterma de adsorción y desorción.
- Realizar estudios biológicos sobre el soporte: microflora nativa, inhibidores de crecimiento, composición, etc.
- Obtener parámetros cinéticos para cada una de las fuentes de carbono utilizadas.
- Aislar e identificar los microorganismos que conforman el consorcio microbiano.

§ II MARCO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se realizó en tres partes. La primera estuvo enfocada al estudio físico-microbiológico del material de empaque. La segunda a la obtención de inóculos así como al estudio de los parámetros cinéticos de la degradación del acetato de etilo, isopropanol y tolueno como únicas fuentes de carbono y energía con cultivos mixtos en medio líquido. La tercera se centró en el aislamiento, identificación y preservación de los microorganismos aislados.

ESTUDIO FISICO-MICROBIOLOGICO DEL MATERIAL DE EMPAQUE

Esta etapa corresponde al análisis de los parámetros físicos y microbiológicos de la turba; material de empaque seleccionado para este estudio.

§ 2.1 Estudio de la humedad de equilibrio

El primer parámetro que se determinó fue la humedad. Los experimentos se realizaron utilizando turba a diferentes humedades iniciales, las muestras se colocaron en columnas de vidrio de 3 cm de diámetro y 18 cm de altura. Éstas, a su vez se mantuvieron dentro de una cámara (Fig. 2.1) durante 72 horas con la finalidad de determinar la humedad de equilibrio.

Las columnas en la parte inferior tenían una malla de plástico, la cual evitó la caída de la muestra y en la parte superior se colocó un tapón para evitar la pérdida de agua y así mantener un equilibrio del medio poroso (soporte más agua). Los perfiles de humedad se determinaron a lo largo de la columna a tres diferentes alturas cada una a 6 cm de distancia.

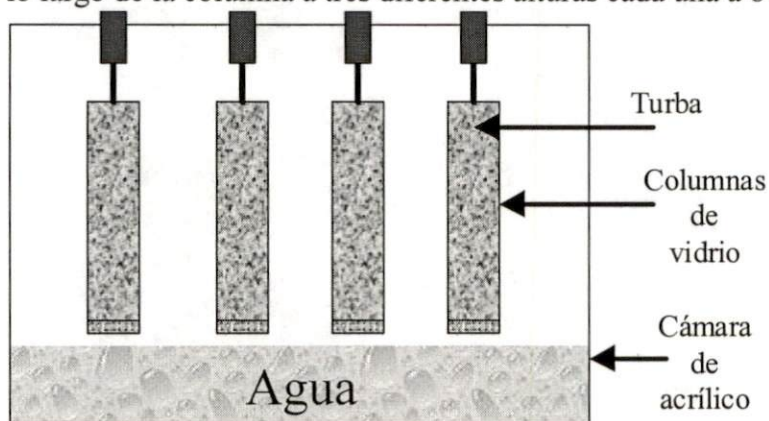


Fig. 2.1 Sistema experimental para determinar la humedad de equilibrio de la turba.

La humedad se cuantificó por diferencia de peso, para lo cual fue pesada una muestra de turba con una humedad inicial, y después se secó a 90 °C durante 48 horas para determinar el peso de la muestra seca, la humedad se calculó mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Humedad}_{\text{base húmeda}} = \left(\frac{M \text{ H}_2\text{O}}{M \text{ Total}} \right) * 100 \quad \dots 2.1$$

donde: M H₂O es el peso del agua en gramos.

M Total es el peso del agua más el peso del soporte seco en gramos.

§ 2.2 Estudio de la actividad de agua

Otro parámetro que se determinó debido a su gran impacto sobre el metabolismo de los microorganismos fue la actividad de agua (a_w). La fuerza con la que el agua es retenida en un soporte se caracteriza por la disminución en la presión de vapor ejercida por el agua contenida en el soporte, con relación a la presión de vapor saturado del agua pura a la misma temperatura. La relación entre estas dos magnitudes, es la actividad de agua contenida en el soporte.

$$a_w = \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad \dots 2.2$$

a_w es la actividad del agua

P es la presión de vapor de agua en equilibrio con el soporte

P_0 es la presión de vapor de saturación del agua pura a la misma temperatura.

La relación $\frac{P}{P_0}$ afectada por el factor 100, es igual a la humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con el soporte es decir:

$$\left(\frac{P}{P_0} \right) * 100 = \text{HRE} \quad \dots 2.3$$

HRE, es la humedad relativa de equilibrio.

Las variaciones de a_w con el contenido de agua, se representan en las curvas denominadas isothermas de adsorción o desorción.

Las determinaciones de a_w , se realizaron en el Aqua Lab CX-2 (fig. 2.2), el cual determina la presión de vapor de la muestra y la divide entre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Para lo cual se tomaron 10 g de turba seca y se les agregó agua destilada hasta alcanzar la humedad deseada.

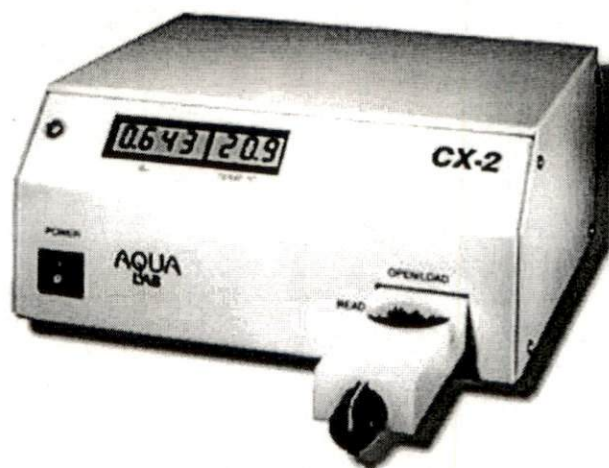


Figura 2.2 Equipo para medir la a_w , Aqua Lab CX-2

A la muestra homogeneizada, se le determinó la a_w una vez realizada la lectura, la muestra se introdujo en una incubadora a 30 °C durante 5 minutos y se registró el peso, para posteriormente realizar otra determinación de a_w . Esta metodología se repitió hasta que el valor de a_w se mantuvo constante. El registro del peso permitió conocer en todo momento el porcentaje de humedad de la muestra.

En el caso de las isotermas de adsorción se prepararon diversas muestras con el porcentaje de humedad inicial deseado y se determinó la a_w . La humedad real se evaluó a través de una termobalanza para evitar el error entre la humedad teórica y la experimental.

§ 2.3 Estudio de la caída de presión

El sistema experimental utilizado en esta etapa se conformó con 6 módulos de 15 cm de alto y 4 cm de diámetro interno. El sistema experimental se puede apreciar en la fig. 2.3.

Durante el experimento, la humedad de la turba fue del 65 % y se modificó la velocidad superficial del gas y la densidad de empaque. El equipo se conectó a un manómetro de agua (tubo en U), con el que se registró el comportamiento de la caída de presión que ejerce el material de empaque al paso del aire alimentado por la parte inferior del sistema.

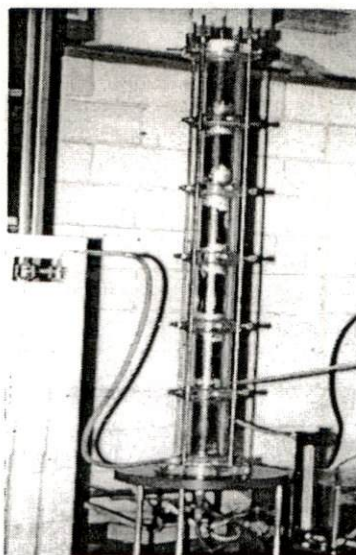


Fig. 2.3 Sistema experimental para determinar la caída de presión.

§ 2.4 Determinación de pH

Para determinar el pH de la muestra, se tomó 1 gramo de turba al que se le agregaron 25 mL de agua destilada (Kaurichev, 1984); ambos se agitaron durante 15 minutos con un agitador magnético y una parrilla de agitación Termolyne, modelo Nuova II. La lectura de pH se realizó mediante un potenciómetro conductronic, modelo pH 20.

§ 2.5 Cuantificación de cenizas

Para esta prueba se emplearon crisoles previamente tarados, en los cuales se colocaron entre 1 y 2 gramos de turba. La calcinación se realizó durante 6 horas a 550 °C, empleando una mufla tipo caja marca Lindberg modelo 51844. Una vez fría, la mufla, los crisoles se colocaron en un desecador y se pesó la muestra calcinada. El porcentaje de cenizas de la muestra se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Gramos de materia mineral}}{\text{Gramos de materia seca}} = \left(\frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \right) \left(\frac{100}{MS} \right) \quad \dots 2.4$$

Donde:

P_1 = Peso del crisol tarado

P_2 = P_1 + peso de la muestra húmeda en gramos.

P_3 = P_1 + P_2 después de la calcinación.

§ 2.6 Contenido de materia orgánica

La cuantificación de materia orgánica se realizó por triplicado, mediante el método de Walkley y Black (Manual de operación de laboratorio. Planta industrializadora de desechos sólidos, 1986). La metodología de la técnica se puede consultar en el anexo A.

§ 2.7 Determinación del contenido de nitrógeno

La determinación del contenido de nitrógeno en la turba se realizó a través del método de Kjeldahl, que se basa en la oxidación de la materia orgánica con ácido sulfúrico (Olmos, 1989). La metodología de la técnica se puede consultar en el anexo B.

§ 2.8 Fracción mineral de la turba

§ 2.8.1 Determinación de fósforo

El método utilizado para este análisis fue el de Bray y Kurtz (Yágodin, 1982), esta técnica emplea una combinación de ácido clorhídrico y fluoruro de amonio (NH_4F) con el objeto de separar fácilmente las formas de fósforo solubles en medio ácido, y así conocer las concentraciones de fósforo disponibles. La descripción completa del método se encuentra descrita en el anexo C.

§ 2.8.2 Estudio del contenido de potasio

El método utilizado para la determinación de potasio fue el de fotometría de flama (Kaurichev, 1984), determinando el potasio de intercambio mediante acetato de amonio 1N. Dicho método es el más empleado y permite cuantificar una concentración mínima de potasio de 0.5 mg/L. La descripción del método se encuentra descrita en el anexo D.

§ 2.8.3 Determinación de la fracción mineral de la turba mediante absorción atómica

Para la digestión de minerales, se tomaron 0.2 g de turba (previamente colocados en mufla durante 2 horas a 100 °C) a los cuales se les agregaron 2 mL de agua desionizada, 3 mL de ácido nítrico, 3 mL de ácido clorhídrico y 6 mL de ácido fluorhídrico. Esta mezcla se vertió en vasos de teflón, posteriormente se puso el tubo de ventilación y se colocaron en la rejilla dentro del digestor de microondas CEM.

Durante el primer segmento de programación se llevó al 90% durante 10 min segundo segmento 70 % por 5 minutos y el tercer segmento 80 % por 5 minutos, verificando que no se presurice el sistema, ya que al aumentar la presión hay pérdida de muestra. Este paso se realizó por duplicado.

Las muestras se dejaron enfriar, para poder adicionar a cada una 10 mL de ácido bórico al 5% y un mL de ácido fluorhídrico, a fin de realizar una segunda digestión. Terminado este paso, se dejó enfriar a temperatura ambiente y la muestra se aforó a 25 mL con agua desionizada, que además contiene 2000 ppm de cesio, a partir de cloruro de cesio.

Partiendo de este aforado se procedió a realizar las lecturas en un espectro de absorción atómica Varían, modelo AA 20, el cual está equipado con un detector de ionización de flama y lámparas de cátodo hueco para cada caso. Dependiendo de los metales a analizar, se emplea una relación de flama óxido nitroso / acetileno o aire / acetileno.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA TURBA

Las metodologías mostradas en esta sección, están encaminadas a describir las diferentes técnicas empleadas para el análisis de la microflora que posee la turba, así como el estudio respecto a la presencia de inhibidores de crecimiento en la misma.

§ 2.9 Determinación de la microflora del material de empaque

Los experimentos se realizaron con el fin de cuantificar el número de microorganismos que conforman la microflora natural de la turba; posteriormente, se determinó si estos eran capaces de desarrollarse en presencia de acetato de etilo, isopropanol y tolueno.

Para el primer caso, se emplearon cajas de petri con los siguientes medios: agar nutritivo, agar-medio mineral (sección 2.11) y papa dextrosa agar (PDA). Las cajas se inocularon con 0.01 g de turba y otras por la técnica de plaqueado con 0.1 mL de extracto de turba. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para determinar el número de microorganismos, las cajas se incubaron a 35 °C. El número de colonias fue cuantificado después de 48 horas de incubación. Paralelamente se corrieron controles que fueron cajas con inóculos esterilizados.

En el caso donde se utilizaron solventes como fuentes de carbono, se empleó la misma metodología, sólo que la incubación se realizó en desecadores a temperatura ambiente (fig. 2.6). En el fondo de los mismos (uno para cada compuesto) se colocó una porción de carbón activado, en la cual se vertió el solvente en estudio.

§ 2.10 Estudio de la existencia de inhibidores de crecimiento en la turba

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la presencia de sustancias que puedan inhibir el crecimiento evaluado cuantitativa y cualitativamente el desarrollo de microorganismos específicos sobre la turba con medio mineral en presencia de las distintas fuentes de carbono.

Para tal efecto, se utilizaron 100 mL de los siguientes medios: medio mineral (MM) y extracto de turba (ET) (el extracto de turba es el filtrado de 1 g de turba seca con 25 mL de agua). Los distintos medios fueron vaciados en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizaron. A estos se les inoculó con 10 mL de inóculo previamente adaptado (microorganismo crecidos con la fuente de carbono específica) a cada matraz y posteriormente se adicionó el solvente de interés (0.2 mL solvente / matraz).

El pH fue medido durante el experimento. La biomasa desarrollada se cuantificó midiendo la cantidad de proteína por el método de Lowry (anexo E). Finalmente, se realizaron tinciones de Gram y azul de metileno para un análisis cualitativo.

Los controles empleados fueron matraces con medio mineral inoculados y con la fuente de carbono deseada.

ESTUDIO DE LAS MICROCINÉTICAS

§ 2.11 Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado a lo largo de este estudio es de tipo mineral a sido utilizado con anterioridad por Claus y Walker, (1964) y Ottengraf, (1987) entre otros investigadores. Los resultados reportados hasta el momento con la utilización de este medio de cultivo se pueden catalogar como satisfactorios.

§ 2.11.1 Composición

La composición del medio de cultivo empleado a lo largo de este proyecto es la siguiente en g/L:

K_2HPO_4	0.8
KH_2PO_4	0.2
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$(NH_4)_2SO_4$	1.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01

Para los experimentos realizados con medio sólido se empleó el medio arriba descrito adicionándole 15 g/L de agar noble marca Difco. Otros medios empleados fueron: agar nutritivo y papa dextrosa agar (PDA).

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 15 psi de presión, durante 15 minutos.

§ 2.12 Inóculo

El consorcio microbiano y los cultivos puros se obtuvieron de un producto comercial de nombre PHENOBAC.

PHENOBAC es una mezcla de microorganismos deshidratados que provienen de plantas de tratamiento de aguas residuales. La biomasa contenida en PHENOBAC, es capaz de degradar eficientemente compuestos tales como fenoles, benceno, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, cresoles, nitrilos, alcoholes, glicoles, formaldehído, gasolina, queroseno etc.

En general, estos polvos han sido utilizados en el tratamiento de descargas contaminadas con hidrocarburos teniendo buen éxito (Polybac Corporation, 1988).

§ 2.12.1 Reactivación

Para la reactivación de los microorganismos se suspendió un gramo de PHENOBAC en 10 partes iguales de agua libre de cloro y se agitó durante dos horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, la mezcla fue filtrada para eliminar el exceso de sólidos. Esta suspensión se empleó como inóculo directamente en el sistema de tratamiento (Polybac Corporation, 1988).

§ 2.12.2 Adaptación del inóculo

Este experimento se realizó en un reactor LKB, de 5 L de capacidad, con un volumen de operación de 3.5 L, esquematizado en la figura 2.4.

El sistema se alimentó mediante una bomba de jeringa modelo 341A, Orion Reserch Inc. La alimentación estuvo compuesta por una mezcla de solventes: acetato de etilo, isopropanol y tolueno en una relación 3:3:1 (v/v) el flujo de alimentación se incrementó de forma gradual desde 0.51 hasta 1.67 mL/h. El sistema se mantuvo a temperatura ambiente, con una agitación de 200 rpm y una aireación de 0.15 vvm. El pH se mantuvo constante en un valor cercano a 7 mediante una mezcla de KOH y NaOH 0.3 M; dicha mezcla se adicionó mediante una bomba peristáltica conectada en línea al sistema. En esta etapa, las condiciones de trabajo fueron no estériles. La evolución de la biomasa se realizó observando la evolución de la densidad óptica.

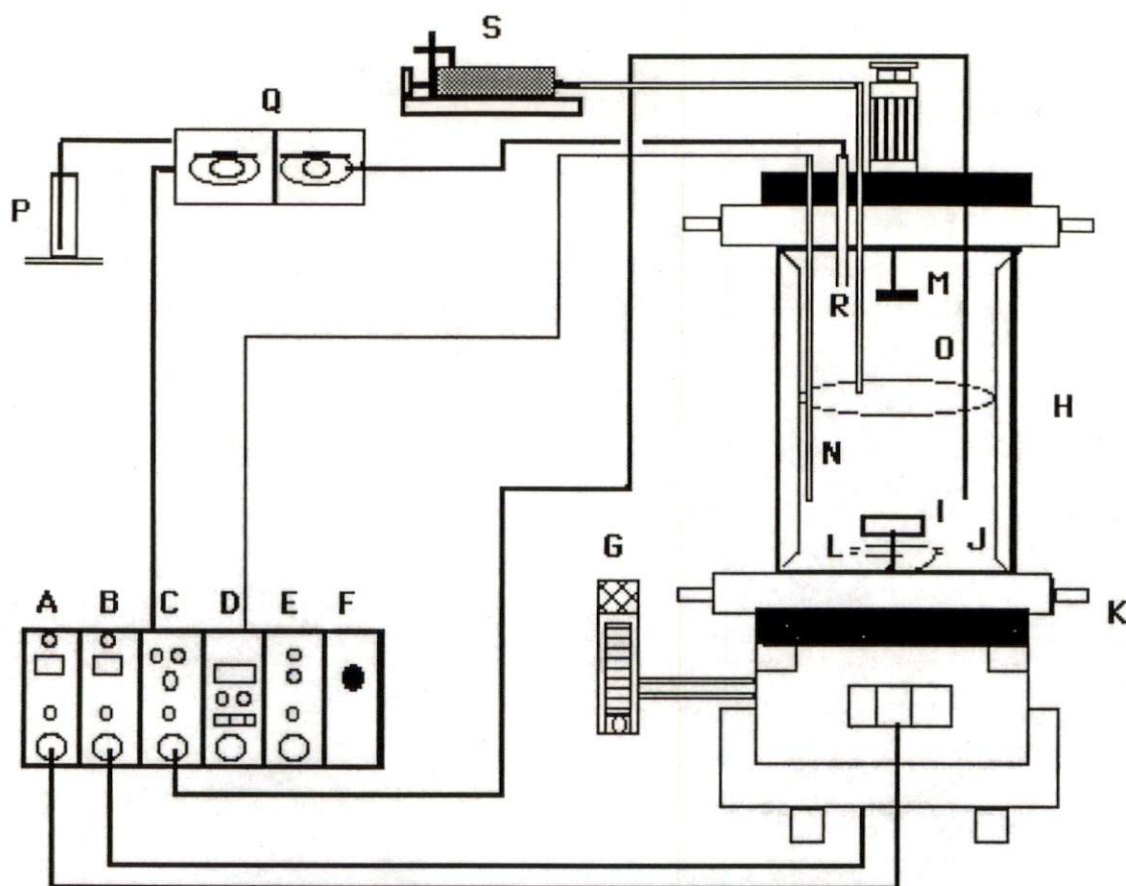


Fig. 2.4 Sistema experimental utilizado en la adaptación y enriquecimiento del cultivo los microorganismos.

- | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| A. Control de agitación. | I. Agitador de 6 aspas. | Q. Bombas peristálticas. |
| B. Control de temperatura. | J. Bafles del reactor (4). | R. Puerto de inyección para el buffer |
| C. Control de pH. | K. Puerto de muestreo. | S. Bomba de jeringa. |
| D. Control de espuma. | L. Dispersor de aire. | |
| E. Monitor de O ₂ . | M. Agitador rompe espuma de 4 aspas. | |
| F. Encendido. | N. Termopar. | |
| G. Rotámetro. | O. Sonda de pH | |
| H. Reactor LKB de 4 L. | P. Solución buffer. | |

§ 2.13 Estudios cinéticos

Los experimentos con las diferentes fuentes de carbono se realizaron en medio líquido, empleando matraces Erlenmeyer de 125 mL (fig. 2.5). El volumen de operación fue de 30 mL de líquido.

El inóculo empleado fue obtenido previamente y la metodología se describe en la sección 2.12.2. El medio de cultivo es de tipo mineral y su composición es descrita en la sección 2.11.1.

La relación para la inoculación fue del 10 % v/v (inóculo: medio de cultivo respectivamente). 30 mL de esta suspensión se adicionaron a los matraces. Toda esta manipulación se realizó dentro de una campana de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad.

Los matraces fueron cerrados utilizando válvulas mininert (VICI, Precision Sampling Inc., Baton Rouge LA), las cuales están hechas de teflón para evitar los fenómenos de adsorción del solvente. Además, estas válvulas cuentan con un septo para la toma de muestra.

La incubación se llevó a cabo en un agitador rotatorio marca New Brunswick Scientific a 30 °C y con una agitación de 200 rpm.

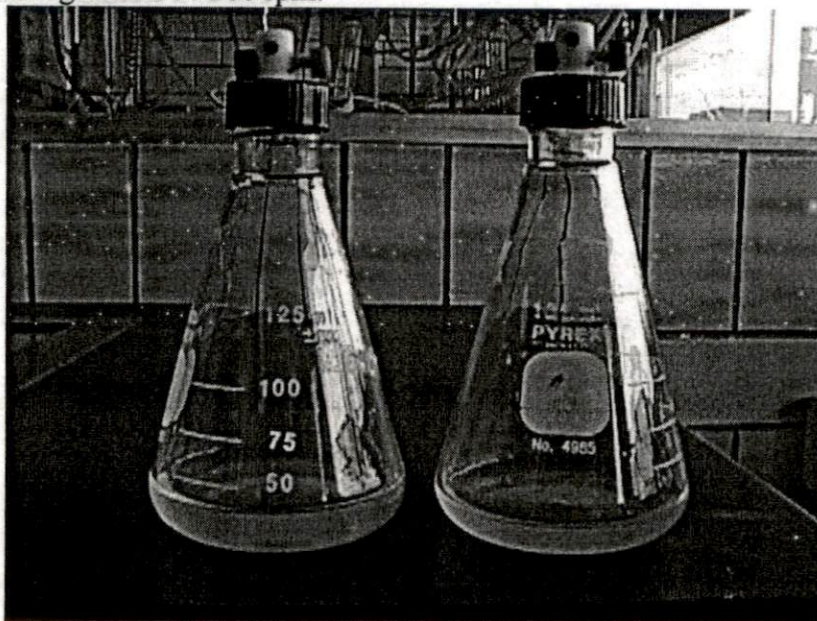


Fig. 2.5 Sistema experimental empleado para cuantificar la degradación del solvente.

Los solventes utilizados fueron acetato de etilo, isopropanol y tolueno, marca Baker, grado reactivo. Las diferentes concentraciones que se utilizaron para cada experimento se muestran en la tabla 2.1. Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron de tipo destructivo, así que para cada muestra se tomó un matraz y se retiró del experimento.

Tabla. 2.1 Concentraciones iniciales de solvente utilizado en los diferentes experimentos

Acetato de etilo (mg/L _{Liq})	Isopropanol (mg/L _{Liq})	Tolueno (mg/L _{Liq})
63.21	51.4	31.1
115.9	104.0	66.3
225.6	158.0	101.1
449.3	206.7	133.1
671.0	393.0	158.56
879.3	513.8	234.9
1473.0	770.6	304.4

§ 2.13.1 Cuantificación del solvente

La fase gaseosa de los microcosmos se analizó con un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II, equipado con una columna capilar HP-I (Methyl Silicone Gum) Instrument test. 5 m x 0.53 mm x 2.65 mm conectada a un detector de flama (FID). El volumen de muestra inyectando fue de 100 µl

Las condiciones de operación fueron: temperatura de inyector y detector 210 °C, mientras que en la columna la temperatura fue de 120 °C.

El flujo de gas acarreador (N₂) en la columna fue de 1.5 mL/min, bajo estas condiciones el tiempo de retención para el acetato de etilo fue de 1.9 min; 1.5 min para el isopropanol y 2.8 min para el tolueno. Los solventes empleados en las curvas patrón fueron grado HPLC de la marca Aldrich.

§ 2.13.2 Determinación del crecimiento microbiano

La cantidad de biomasa se realizó mediante la cuantificación de proteína, utilizando el método de Lowry y col. (1951) ver anexo E.

§ 2.13.3 Determinación de las cantidades de O₂ y CO₂

Las determinaciones de las concentraciones de O₂ y CO₂ se realizaron de manera simultánea, empleando la misma muestra. Este análisis se realizó mediante cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Gow Mac serie 550 equipado con una columna concéntrica CTR1 (Alltech, USA) para gases permanentes conectada a un detector de conductividad térmica.

Las condiciones de operación fueron fijadas de la siguiente manera: 50 °C para el inyector y 50 °C para el detector, mientras que la columna se mantuvo a 30 °C. El gas acarreador utilizado fue helio, con un flujo de 60 mL/min. El volumen de muestra inyectado fue de 100 µl.

Las áreas obtenidas mediante el integrador, son relacionadas con las siguientes fórmulas para encontrar los porcentajes de CO₂ y O₂.

$$\%O_2 = \left(\frac{AreaO_2}{AreaN_2} \right) \left(\frac{79.1}{0.9953} \right) \quad \dots 2.5$$

$$\%CO_2 = \left(\frac{AreaCO_2}{AreaN_2} \right) \left(\frac{AreaN_2 * AreaO_2}{Area\ aire} \right) (70.4735) \quad \dots 2.6$$

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

§ 2.14 Aislamiento

Para alcanzar este objetivo se utilizaron cajas de petri con medio mineral, el cual se describió en la sección 2.11.1. La técnica implementada para el desarrollo de los microorganismos sobre medio sólido, consistió en utilizar desecadores marca Pyrex como recipientes para garantizar una atmósfera saturada del solvente que se utilizó como fuente de carbono.

En el fondo del desecador se colocó una caja de petri con carbón activado impregnado de solvente, de esta manera la liberación del compuesto es de forma gradual. Las cajas ya inoculadas, se colocaron dentro del desecador correspondiente (se utilizó un desecador para cada compuesto). La incubación se realizó a temperatura ambiente. El sistema experimental se observa en la figura 2.6

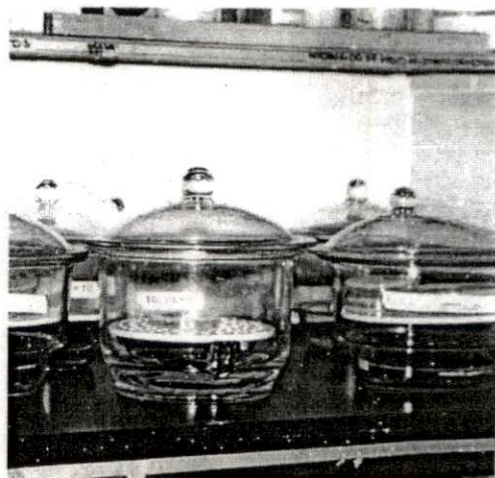


Fig. 2.6 Fotografía del sistema de atmósfera saturada, utilizado en el aislamiento de microorganismos.

Una vez crecidos los microorganismos, el aislamiento de cada una de las colonias encontradas se realizó mediante la técnica de estría cruzada (Aaronsen, 1970).

Los microorganismos aislados fueron cultivados individualmente y posteriormente transferidos a otras placas a fin de obtener cultivos puros para ser estudiados en medios diferenciales y así realizar las pruebas bioquímicas necesarias para su identificación.

§ 2.15 Identificación

La identificación de los microorganismos se realizó en tres etapas, la primera consistió en un análisis de morfología colonial; dicho estudio se llevó a cabo mediante el examen visual del desarrollo de los microorganismos en la superficie de las placas de agar.

Durante el examen, las placas se inclinaron en distintas direcciones con iluminación brillante directa, de modo que la luz se reflejara desde diversos ángulos. Los resultados de este análisis fueron registrados en la ficha de identificación que se describe en el anexo F.

Las otras dos etapas fueron de pruebas primarias y secundarias, descritas en las secciones 2.15.1 y 2.15.2, respectivamente.

§ 2.15.1 Pruebas primarias

La segunda parte de la identificación, consistió en realizar las pruebas primarias descritas por Koneman y col. (1989) y Mac Faddin (1990). Contemplan morfología microscópica (tinción de Gram; anexo G), prueba de KOH, citocromo oxidasa, catalasa, glucosa (producción de ácido) y O/F. Estas pruebas se describen a continuación.

§ 2.15.11 Morfología microscópica

Para realizar la caracterización de los microorganismos es necesario empezar con el procedimiento de coloración, el cual pone de manifiesto las diferencias entre las células. Esta diferenciación, se realizó mediante la técnica de tinción de gram. La metodología se describe en el anexo II.

§ 2.15.12 Prueba de KOH

Esta prueba permite comprobar los resultados obtenidos con la tinción de Gram. Para llevarla a cabo, se colocó una gota de KOH al 30% sobre un portaobjeto limpio y con un asa estéril se tomó una muestra de una colonia aislada, para formar una emulsión sobre la gota de KOH; posteriormente el asa se levantó verticalmente, a fin de observar si hay formación de hilos. Si estos se presentan, entonces el microorganismo es Gram negativo; de no ser así, el microorganismo es Gram positivo.

§ 2.15.13 Citocromo oxidasa

Para este análisis, se empleó la tira comercial Bactident Oxidase 13300 de Diagnostica Merck, utilizada para el diagnóstico in vitro de microorganismos. Dichas tiras contienen, en la parte inferior, una película de reactivo color rosa. Para la prueba se empleó un palillo aplicador, con el cual se tomó una muestra de células del centro de una colonia aislada y se aplicó en la zona de papel donde se hallaba el reactivo, si hay un cambio de coloración en el reactivo, de rosa a azul intenso, la prueba se interpreta como positiva.

§ 2.15.14 Catalasa

Mediante una aguja de punción o un palillo aplicador, se transfirieron células del centro de una colonia aislada a la superficie de un portaobjeto. Para posteriormente agregar 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno directamente sobre la muestra. Una rápida efervescencia indica producción de oxígeno gaseoso, lo cual se interpreta como una prueba positiva (Koneman y col., 1989).

§ 2.15.15 Prueba de glucosa (oxidación-fermentación)

La determinación de la reacción oxidación-fermentación (OF) en el laboratorio, ayuda a la identificación de bacterias aeróbicas. Para esta prueba se requieren dos tubos, los cuales fueron inoculados con el microorganismo mediante una aguja de punción que atravesara el medio hasta llegar casi al fondo del tubo.

Un tubo de cada par se cubre con una capa de 1 cm de aceite mineral estéril, mientras el otro tubo se deja abierto al aire. La incubación se realizó a 35 °C durante 48 horas. La interpretación se realizó comparando los resultados con los de la tabla 2.3 del anexo H.

§ 2.15.2 Pruebas secundarias

La tercera etapa para la identificación consiste en una serie de pruebas bioquímicas, también conocidas como pruebas secundarias. Los microorganismos aislados primeramente son inoculados en agar de Mac Conkey; en caso de que algún microorganismo sea Mac Conkey negativo, se cultiva en agar nutritivo.

Para la evaluación del metabolismo microbiano, se utilizó la serie de pruebas bioquímicas del sistema comercial API 20E de Merck. La introducción de sistemas comerciales de identificación microbiana, ha permitido que las pruebas bioquímicas de caracterización se puedan llevar a cabo fácilmente y con un alto grado de confiabilidad (Koneman y col., 1989).

Este sistema consta de una tira plástica con 20 minitubos que contienen substratos deshidratados y una cámara de incubación con tapa no hermética. En la parte superior de cada tubo hay un pequeño orificio a través del cual se puede inocular la suspensión bacteriana con una pipeta. Los resultados de las pruebas se registran en las papeletas del sistema API 20E (fig. 2.7), los valores de cada grupo de pruebas se suman y con estos valores se genera un código que posteriormente es el que permite la identificación del microorganismo en estudio.

§ 2.15.21 Movilidad

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de una especie. Los medios empleados para detectar movilidad contienen concentraciones de agar del 0.4 % o menos (Koneman y col, 1989).

El agar semisólido es utilizado para bacilos fermentadores; la inoculación se realizó por punción en los 4 mm superiores del medio, y se efectuó una lectura inicial a las 6 horas. Muchas cepas móviles de bacilos no fermentadores exhibieron tempranamente sólo una tenue turbidez cerca de la superficie del agar, que tiende a desaparecer con incubación prolongada. Asimismo, las lecturas se efectuaron nuevamente a las 24 y 48 horas para detectar cepas móviles de desarrollo lento.

§ 2.15.22 Detección de fermentadores de glucosa y lactosa en agar triple azúcar hierro

Para esta prueba, el agar se prepara en pico de flauta. La porción inclinada, expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción inferior, llamada "fondo o profundidad" está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al preparar los tubos es importante que el pico y el fondo tengan la misma longitud, de aproximadamente 3 cm cada una, a fin de conservar este efecto en las dos cámaras.

El microorganismo en estudio, previamente aislado, fue tomado de una placa de agar mediante un asa (bacteriológica) con la cual se atravesó la parte profunda del tubo. La línea de siembra no se extendió a más de 3 ó 5 mm del fondo del tubo, a fin de evitar la entrada de aire en la parte profunda y una alteración en el medio anaerobio. Tras retirar el asa del fondo se estiró el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Los tubos inoculados se colocaron en una incubadora a 37 °C de 18 a 24 horas.

Cada una de estas pruebas se realizó experimentalmente con los diversos microorganismos aislados. Los resultados obtenidos en esta parte permiten establecer el grupo o género al que corresponden los microorganismos en estudio.

§ 2.16 Conservación

La conservación de las bacterias y en general de los microorganismos aislados en este estudio, tiene como finalidad mantener viable por un largo periodo de tiempo al microorganismo. Para lograrlo, se colocaron 0.5 g. de papel filtro previamente cortado en cuadros de aproximadamente 0.7 mm o un gramo de vermiculita, en viales de vidrio de 25 mL con tapón de gasa y algodón. Este material fue esterilizado a 15 lb/plg² durante 15 minutos. Posteriormente, los viales fueron colocados en un desecador durante 24 horas.

El microorganismo que se desea conservar, se creció en caldo nutritivo y en medio mineral con la composición indicada anteriormente hasta que el crecimiento microbiano fue abundante.

Posteriormente, se adiciono 1 mL de cada uno de estos medios por separado a cada vial y fueron colocados en un desecador durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se cambiaron los tapones de gasa por las tapas correspondientes para poder cerrar los viales perfectamente. Los viales fueron conservados en refrigeración o a temperatura ambiente.

Para reactivar al microorganismo, se tomaron algunos trozos de papel o vermiculita y se colocaron en cultivo nutritivo, se incubaron hasta obtener crecimiento abundante y posteriormente resembrarlos en medio mineral con la fuente de carbono que se desee.

§ III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.0 Caracterización fisicoquímica de la turba

Una de las variables más importantes en los sistemas de biofiltración es el material de empaque, ya que éste es una matriz de soporte para los microorganismos y en algunos casos proporciona nutrientes (van Lith y col., 1997). Para una máxima remoción de contaminantes, el material de empaque debe tener las siguientes características:

1. Una alta capacidad de retención de humedad para prevenir el secado
2. Alta porosidad para minimizar la caída de presión y asegurar una buena distribución del gas
3. Disponibilidad de nutrientes para un adecuado crecimiento microbiano
4. Una población microbiana diversa

Una gran variedad de materiales de empaque han sido estudiados (Williams y Miller 1992; Hodge y Devanny, 1994; Bohn, 1993; Cárdenas-González y col., 1999). La composta, la turba y el suelo son materiales ampliamente utilizados en procesos de biofiltración (Corsi y Seed, 1995; van Groenestijn y col., 1993).

La turba es un material de origen vegetal de propiedades físicas y químicas variables, que dependen de su origen y se clasifica en dos grupos: turbas rubia y negra. La rubia tiene un mayor contenido en materia orgánica y está menos descompuesta; la turba negra se encuentra más mineralizada, por lo que tiene un menor contenido en materia orgánica.

Las turbas rubias tienen un buen nivel de retención de agua y de aireación, pero son variables en cuanto a su composición y presentan un pH que oscila entre 3,5 y 8,5. (Fernández y col., 1998). Debido a la variabilidad de este material, se hace necesaria la caracterización del mismo.

§ 3.1 Humedad de equilibrio

La humedad del material filtrante es importante para el mantenimiento de un adecuado funcionamiento de los biofiltros, ya que los microorganismos necesitan agua para mantener su actividad metabólica. Los resultados obtenidos demuestran que la humedad de la turba fresca es del $13\% \pm 1.2$ (base húmeda). Este valor, debe ser considerado al momento de determinar la humedad de equilibrio del material de empaque.

Después de varios experimentos en donde se probaron diferentes humedades iniciales, se determinó que la turba es capaz de absorber agua hasta en un 65 % de humedad, sin presentar fenómenos de drenaje macroscópico.

En estos experimentos el método utilizado permitió alcanzar un equilibrio termodinámico entre el soporte y el medio ambiente, ya que el mantener una atmósfera saturada de agua

garantiza que la humedad determinada no presente interferencias por secado. El comportamiento de los perfiles axiales de humedad dentro del reactor a diferentes H_i , se observa en la figura 3.1

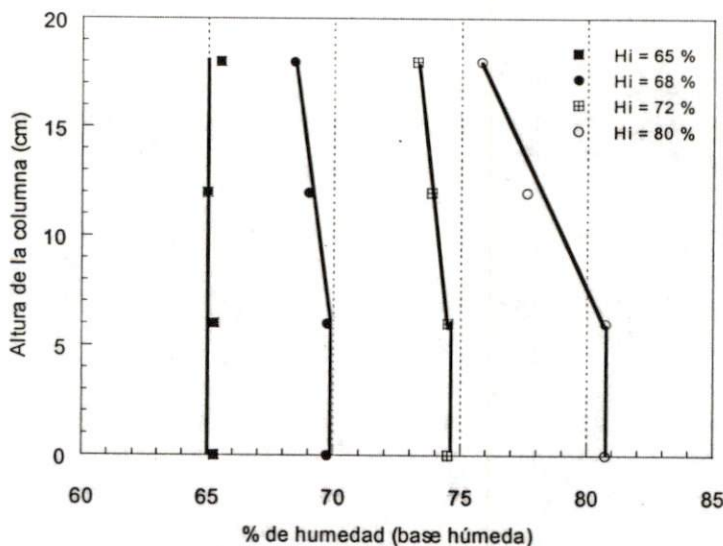


Figura 3.1 Perfiles axiales de humedad para la turba, en un tiempo de 3 días.

Los gradientes de humedad se observaron por encima del 65%; así para una H_i del 68% tenemos un gradiente del 2% y para una H_i del 75% el gradiente es de alrededor del 5% respecto a su H_i . De esta manera, con una humedad del 65% llegamos al punto de equilibrio entre la fuerza de retención (capilaridad + adsorción) y la fuerza de gravedad.

El hecho de que la humedad de equilibrio se encuentre en un valor del 65% hace que el material resulte interesante como soporte en procesos de biofiltración, ya que se ha reportado que la humedad típica de operación de los biofiltros está alrededor del 50% en peso (Muller 1988; Devigny y col., 1999). También se ha reportado que el contenido mínimo de humedad es de alrededor de un 30% como lo demuestran los estudios de Sabo y col. (1993), y de Weckhuysen y col. (1993) para el control de compuestos volátiles y para la biofiltración de butanol, en un reactor empacado con cortezas, respectivamente. Una humedad baja puede impedir la transferencia de masa en el biofiltro e inhibir el metabolismo y crecimiento de los microorganismos. Por otro lado, una humedad excesiva puede provocar la compactación del material de empaque y como consecuencia taponamiento del sistema, lo anterior genera la formación de zonas anaerobias (Corsi y Seed., 1995).

§ 3.2 Estudio de la actividad de agua (a_w)

El agua juega un papel importante en la degradación microbiana de contaminantes en los biofiltros. El contenido de agua es un índice indirecto de su disponibilidad debido a que mucha del agua en un biofiltro está ligada a las partículas del material de empaque; y es ahí donde suele estar disponible para los microorganismos. La relación de la disponibilidad del agua con el contenido de humedad depende del tamaño y la forma de las partículas y la composición del soporte, orgánico e inorgánico.

La disponibilidad de agua se puede expresar, mediante la actividad de agua (a_w) o el potencial de agua, pero éste último es mucho más difícil de medir que la a_w . Actividades de agua entre 0.97 a 0.999, promueven altas velocidades de degradación microbiana en biofiltros, la disponibilidad de agua decrece cuando el contenido de humedad disminuye, de esta forma mantener la humedad en el empaque del biofiltro resulta importante (Bohn y Bohn, 1999). Los requerimientos de agua de cada microorganismo están definidos en términos de la mínima a_w con la que pueden crecer, diversas especies de bacterias gram negativas (*pseudomonas*) han mostrado altas capacidades metabólicas en un rango entre 0.97 y 0.995 (Bohn y Bohn, 1999), mientras que algunos hongos y levaduras pueden desarrollarse con valores de a_w menores, entre 0.83 y 0.87 aunque creciendo a muy bajas tasas (Pitt y Christian, 1968).

Los resultados obtenidos al realizar las isotermas adsorción y desorción, demuestran que no existen fenómenos de histéresis, ya que la evolución de los datos experimentales en ambas isotermas son muy parecidos (figura 3.2). Ambas isotermas muestran un comportamiento típico para materiales con un alto contenido de agua (Jeannin y col., 1986). En dicho comportamiento se pueden apreciar dos zonas que están directamente relacionadas con el tipo de agua del material (figura 3.2): la zona A que se refiere a agua combinada y la zona B que se refiere al agua libre. El punto que diferencia a estas dos zonas, también es conocido como punto de quiebre o equilibrio.

El comportamiento de estas isotermas puede ser descrito mediante la ecuación de Langmuir, la cual permite determinar la cantidad de agua adsorbida por el material de empaque, mediante la siguiente expresión:

$$a_w = \frac{kp}{k' + kp} = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad \dots 3.1$$

Donde:

a_w es la actividad de agua

P es la relación de gramos de agua por gramo de soporte seco.

$K = \frac{k}{k'}$ y es la constante de equilibrio de adsorción.

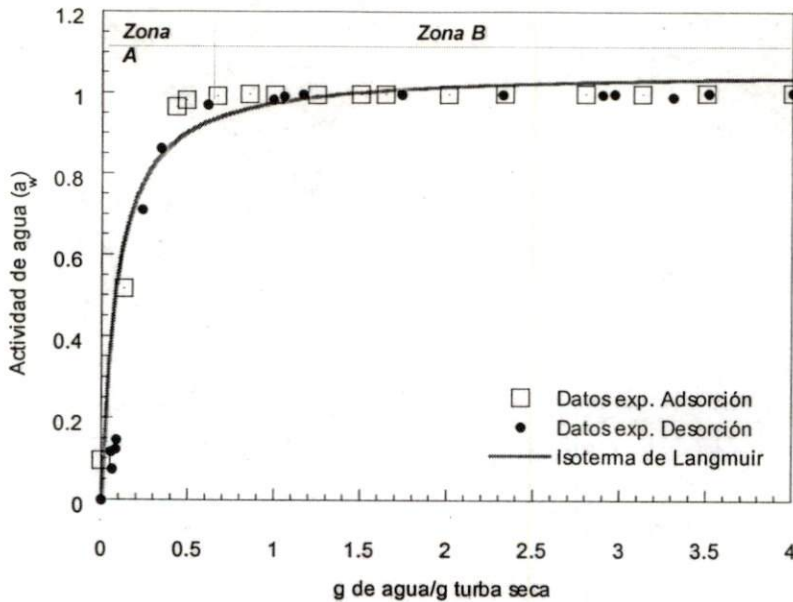


Figura 3.2 comparación de las isotermas de adsorción y desorción.

Ajustando los datos al modelo de Langmuir. Para la isoterma de adsorción tenemos que el punto de equilibrio, está dado para cuando la relación (g de agua/g turba) es igual a 0.63, la cual corresponde un 39% de humedad y un valor de a_w igual a 0.987. Mientras que en el caso de la isoterma de desorción para la misma relación (g de agua/g turba) el valor de a_w es de 0.97.

Los resultados demuestran que el equilibrio más importante a considerar es el de la isoterma de desorción, sobre todo por los fenómenos de secado que pudiesen presentarse dentro del reactor durante su operación, por lo que no se recomienda que un biofiltro opere a humedades menores al 40%. De esta manera un biofiltro con turba como material de empaque, por arriba de un 40% de humedad, puede garantizar una a_w que permita un crecimiento bacteriano adecuado y como consecuencia tener altas tasas de remoción.

De manera análoga, se realizó una isoterma complementaria, empleando medio mineral en vez de agua y con CaCO_3 como agente neutralizante, el comportamiento de la isoterma es muy similar al encontrado cuando se utiliza únicamente agua como se aprecia en la figura 3.3.

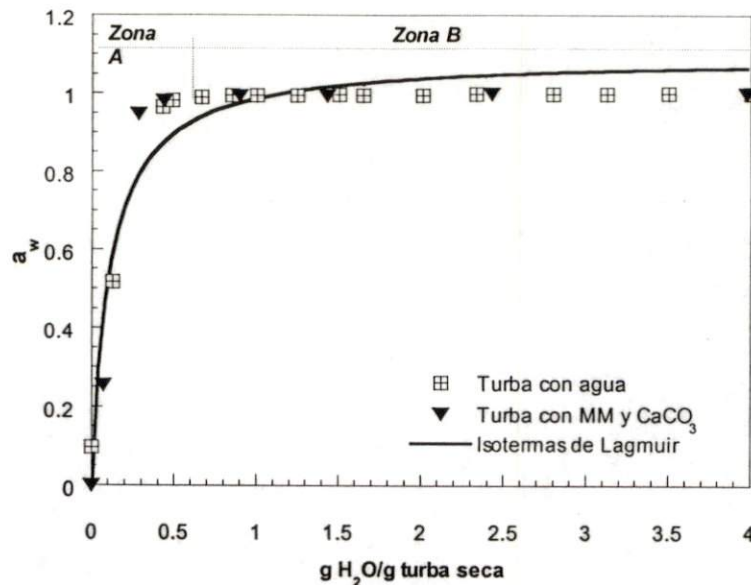


Figura 3.3 Isoterma de adsorción, utilizando MM y CaCO₃

Los resultados muestran que las sales minerales que se encuentran en el medio de cultivo así como el carbonato de calcio no afectan la disponibilidad de agua en este soporte.

§ 3.3 pH del material filtrante

El efecto del pH y la temperatura en un biofiltro son análogos, ya que cada especie de microorganismos se desarrolla adecuadamente en un cierto rango de pH y pueden inhibirse si no se encuentra dentro de dicho rango. Algunas especies prefieren valores de pH altos y otras bajos, pero las especies moderadas son más comunes. Rápidos cambios en el pH son peligrosos para algunas especies. Algunos biofiltros han sido diseñados para operar a un pH cercano a 7 y éste es generalmente aceptado como una condición inicial (Devinny y col., 1999).

La determinación del pH del extracto acuoso de la turba nos condujo a que éste es de carácter ácido, con un valor de 3.7; la literatura sugiere que un buen funcionamiento del biofiltro ocurre en un rango de pH para el material de empaque entre 6 y 8 (Muller, 1988; Leson y Winer, 1991). Fue por esta razón que se decidió emplear CaCO₃, como agente neutralizante (Jol y Dragt, 1988; van Groenestijn y Hesselink, 1993).

El comportamiento del valor de pH de la turba como función del CaCO₃ se observa en la figura 3.4; éste se incrementó conforme se adicionó CaCO₃ a la solución. Encontrando que para tener un valor de pH cercano a 7 se requieren 0.1 g de CaCO₃/ g de turba seca. Con este resultado la turba como material de empaque se encuentra dentro de los rangos de condiciones de operación apropiada de los sistemas de biofiltración reportados en la literatura.

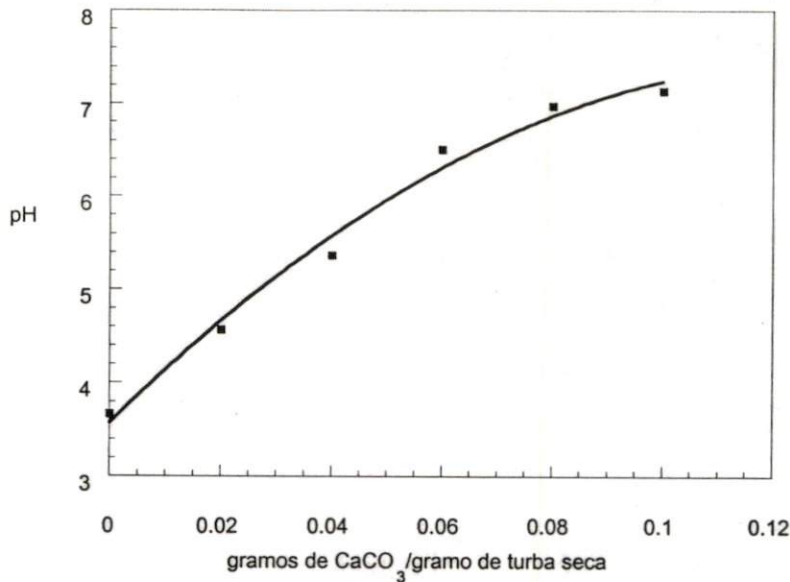


Figura 3.4 Comportamiento de pH de la turba como función de la adición de CaCO₃.

§ 3.4 Caída de presión

Caídas de presión (Δp) bajas en un biofiltro tienen como consecuencia menores costos de operación, ya que no se requiere tanta energía para hacer pasar el gas a través del lecho. La Δp es un parámetro que depende del: tamaño de partícula, de la densidad de empaque, de la porosidad del material, de la humedad del soporte, del tipo de material, (orgánico o sintético) y de la velocidad superficial del aire que es alimentado al reactor. Al respecto, diversos estudios se han realizado con la finalidad de obtener un material de empaque que ofrezca una caída de presión mínima (Baltzis y Shareefdeen, 1993).

El objetivo de este estudio, fue encontrar la Δp de la turba, a la humedad de equilibrio (65 %) como una función de la densidad de empaque y de la velocidad superficial del aire. Para lo cual se tomó como precedente lo reportado por Ottengraf y Van Den Oever (1983).

El comportamiento de los datos experimentales, se observa en la figura 3.5. Los resultados muestran que con una densidad de empaque (D_e) igual a 0.24 g/cm³ y una velocidad de 20 cm/s, se obtiene una Δp de 80 mm H₂O, tanto el valor máximo de Δp como la tendencia se encuentran por debajo de lo reportado en la literatura. Por ésta razón se realizó otro experimento variando de 0.24 a 0.29 g/cm³ la D_e y los resultados obtenidos tienen un comportamiento parecido a los previamente reportados, ambas tendencias se observan en la figura 3.5:

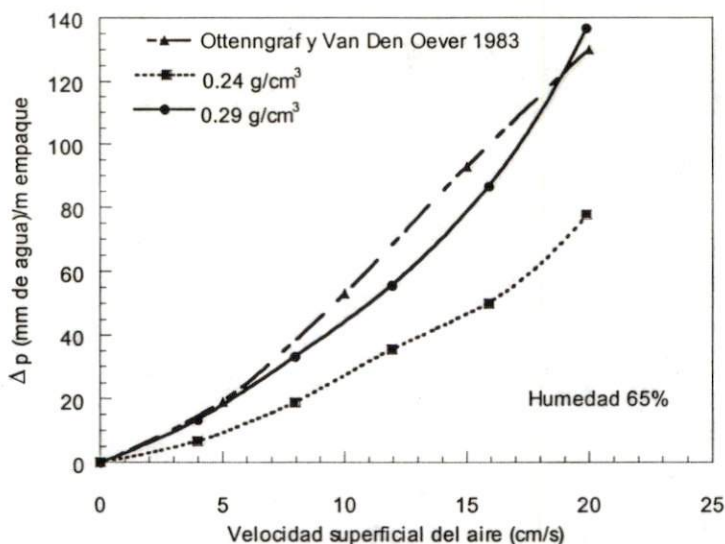


Figura 3.5 Comportamiento de Δp , como función de la velocidad superficial del gas.

Si consideramos que en experimentos de planta piloto la velocidad superficial del gas es de 1 a 15 cm/s (Ottengraf y Van De Oever, 1983), la Δp que corresponde a la máxima velocidad es de 6 cm de agua, la cual es una caída de presión pequeña comparada con la reportada por García-Peña, (2002) de 20 mm de H_2O para un biofiltro fúngico con una velocidad superficial de 0.65 cm/s y una densidad de empaque de 0.5. Los resultados indican que la turba no ofrece una resistencia importante al paso del gas, lo cual implica un ahorro de energía en la operación del biofiltro.

§ 3.5 Composición de la turba

Debido a que la turba es un producto de la descomposición de diferentes tipos de vegetación y a que su composición depende de su origen (Fernández y col., 1998), el análisis de su composición es de gran importancia para su caracterización. Algunas de sus características han sido reportadas por Yágodin (1982) y se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características de la turba reportadas por Yágodin (1982)

Turba de Turbera	pH del extracto	% de materia orgánica	% de cenizas	% de nitrógeno	% de P_2O_5	% de K_2O	% de CaO
Alta	3.0 - 4.5	95 - 98	2 - 5	0.7 - 1.5	0.05-1.15	0.05-1.10	0.2-0.4
Transitoria	4.0 - 6.0	90 - 95	5 - 10	1.2 -2.5	0.10-0.25	0.10-0.15	0.4-2.0
Baja	5.5 - 7.0	85 - 92	8 - 15	2.5 - 3.5	0.20-0.60	0.15-0.20	2.0-6.0

§ 3.51 Porcentaje de materia orgánica y carbono

El contenido de materia orgánica se realizó utilizando la técnica descrita por Walkley-Black (Manual de operación de laboratorio, 1986 véase sección 2.6). Los experimentos se realizaron por triplicado y después del análisis se determinó que el contenido de materia orgánica en la turba fue del $93.6\% \pm 0.66$. Los resultados muestran que el tipo de turba estudiada pertenece a la turba de turbera transitoria, la cual tiene un contenido de materia orgánica entre 92 y 95% (Yágodin, 1982). Para determinar el porcentaje de carbono se utilizó la relación propuesta por Jackson (1970).

$$\% \text{ de Carbono} = \% \text{ de Materia orgánica} * 0.58 \quad \dots 3.2$$

Así, el porcentaje de carbono encontrado en la muestra de estudio fue de $54.3\% \pm 0.38$; dicho resultado es muy similar al reportado por Martin y col. (1989), quien encontró que la turba contiene 50% de carbono. Más recientemente Mallakin y Ward (1996) utilizaron turba como soporte en la degradación de BTEX y reportan una composición del 52% de carbono, ambos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo. El carbono en la turba forma parte de compuestos orgánicos, tales como lignina, bitumen, brea, cera, y ácidos grasos, los cuales son muy resistentes a la descomposición microbiana (Yágodin, 1982). Lo anterior es importante, ya que estos compuestos hacen que la turba sea un material recalcitrante o de difícil degradación lo cual es adecuado para garantizar la estabilidad en los biofiltros cuando ésta se utiliza como material de empaque.

§ 3.52 Nitrógeno

La importancia del nitrógeno en el material de empaque, se debe a que éste constituye entre el 10 y 15 % en peso seco de las células y es indispensable para la síntesis de constituyentes celulares. En este estudio, se determinó el contenido de este elemento en la turba, la cual contiene tan solo $0.55\% \pm 0.03$ de nitrógeno, éste resultado puede considerarse bajo. Sin embargo realizando el siguiente análisis tenemos que el 0.55 % de nitrógeno equivale a 5.5 g de nitrógeno por kilogramo de turba seca y suponiendo que todo este nitrógeno esta disponible para ser utilizado en la producción de biomasa, (la cual tiene la siguiente composición $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$) obtenemos: 48.3 mg de biomasa/g s soporte seco. Este resultado puede compararse con el obtenido por Garcia-Peña y col. (2001), la cual reporta 55mg de biomasa/g soporte seco. Cabe aclarar que el método empleado no cuantifica los nitratos ni los nitritos. Por otro lado, Yágodin (1982) sostiene que los nitratos y los nitritos únicamente representan del 2 al 3 % de nitrógeno de la turba, así podemos ver que estos no tienen una gran contribución en el nitrógeno total.

Por lo tanto, la turba empleada en el análisis no es pobre en nitrógeno, este dato es importante ya que de ser utilizada la turba como material de empaque, puede no ser necesario añadir alguna fuente de nitrógeno al material de empaque. Aunque estudios realizados por Morales y col. (1998) han demostrado que la capacidad de eliminación de

tolueno en un biofiltro en donde se utilizó turba como material de empaque, se incrementó de manera significativa cuando se adicionó amonio al sistema.

§ 3.53 Cenizas y fracción mineral

El contenido de cenizas es un parámetro importante en la caracterización de la turba, ya que se ha reportado que la turba puede contener principalmente fósforo potasio y calcio (Yágodin, 1982). El fósforo se usa principalmente para la síntesis de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, pero aparece también en coenzimas y proteínas. Mientras que el ión potasio (K^+) interviene en la activación de una variedad de enzimas, incluyendo las que participan en la síntesis de proteínas y el ión calcio (Ca^{++}) es un cofactor de ciertas enzimas, como las proteinasas. Por estas razones el análisis de la fracción mineral nos permite determinar si la turba aporta algunos para el desarrollo microbiano cuando es utilizada como material de empaque en sistemas de biofiltración.

En el caso de la muestra analizada se encontró que el porcentaje de cenizas fue del 1.76% \pm 0.03; dicho valor es cercano al reportado para turba de alta turbera (tabla 3.1).

La fracción mineral del soporte en estudio, se presenta en la siguiente tabla, donde podemos ver que efectivamente, la turba contiene los tres elementos reportados por Yágodin (1982).

Tabla 3.2 Fracción mineral de la turba.

Compuesto	ppm ó mg/Kg turba
Calcio	5600
Fierro	1100
Magnesio	1700
Potasio	200
Fósforo	130
Sodio	100
Aluminio	200

La muestra analizada tiene un muy bajo contenido en fósforo 130 ppm, ya que se encuentra reportado que este elemento constituye alrededor del 3% de las células (bacterias) y con esta cantidad de fósforo sólo se podría constituir 4.3 mg de biomasa/g de soporte seco, diez veces menos biomasa que con el nitrógeno. En el caso del potasio, este forma parte de las células entre 1 y 4.5% (Scriban, 1985), así que con la cantidad que contiene la turba (200 ppm) podemos tener entre 4.4 y 20 mg de biomasa/g de soporte seco. En ambos casos es necesario adicionar estos elementos para obtener la mismas biomasa que se puede obtener con el nitrógeno que contiene la turba. Pero no así con el calcio ya que este constituye entre el 0.01 y 1.1% en peso, así que lo mínimo que se obtiene de biomasa son 509 mg de biomasa/g de soporte seco y algo similar pasa con los otros elementos, los cuales son considerados como elementos traza y se requieren en mg/L. Lo anterior nos permite decir que la turba contiene nutrientes, pero no en las cantidades que se necesitan para que los

microorganismos puedan crecer adecuadamente, lo cual hace necesario su adición para tener un material de empaque con condiciones apropiadas para el desarrollo microbiano.

A manera de resumen, los resultados de los análisis realizados para la caracterización de la turba se pueden integrar en la siguiente tabla:

Tabla 3.3 Características de la turba analizada

PH del Extracto Acuoso	% de materia orgánica	% de cenizas	% de nitrógeno	% de fósforo	% de potasio	% de calcio
3.7 ± 0.05	93.6 ± 0.66	1.76 ± 0.03	0.543 ± 0.38	0.013 ± 0.35	0.02	0.56

Con base en los resultados obtenidos y después de comparar con lo reportado en la literatura (tabla 3.1), podemos decir que la turba empleada en nuestra investigación corresponde a turba de alta turbera, la cual se puede describir de la siguiente manera:

Es un material que se constituye de restos vegetales, musgos esfagníneos, romero silvestre y otras plantas que se caracterizan por su poca exigencia de nutrientes y humedad. Otras características importantes suelen ser su bajo contenido de sustancias nutritivas, así como su escaso contenido de cenizas y pH ácido. Además, posee una gran capacidad de retención de humedad, sin olvidar que contiene importantes cantidades de celulosa, hemicelulosa y bitumen, las cuales le confieren una gran resistencia a la degradación (Yágodin, 1982).

§ 3.54 Flora microbiana de la turba

Como parte de la caracterización de la turba, se cuantificó el número de microorganismos que contiene este material como parte de su microflora natural. La cuantificación de microorganismos corresponde a 48 horas de incubación y se encontró:

9×10^5 bacterias/g turba seca y 8.2×10^5 Hongos/ g turba seca.

Estos resultados son difíciles de comparar, pues la flora microbiana de este tipo de materiales depende de muy diversas variables que en ocasiones nunca se repiten, de ahí la heterogeneidad de estos materiales, además hay pocos reportes al respecto. Martín y col. (1989), reporta que la turba, contiene 10^5 bacterias/g de turba, lo cual nos da un indicio en cuanto a bacterias se refiere, en ese trabajo no cuantifican los hongos. Una vez cuantificados los microorganismos contenidos en la turba, se evaluó su posible capacidad de utilizar por separado el acetato de etilo, isopropanol y el tolueno como fuentes de carbono y energía, utilizando el principio de atmósfera saturada (fig. 2.6).

Los resultados demuestran que los microorganismos que contiene la turba son capaces de utilizar las diferentes fuentes de carbono, en la tabla 3.4 se muestran los resultados del crecimiento de los microorganismos de la turba con diferentes las fuentes de carbono.

Tabla 3.4 UFC en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	UFC / g de turba seca (10^5)
Agar nutritivo	9
Isopropanol	6
Acetato de etilo	3
Tolueno	1.3

En la tabla 3.4, se puede ver que un mayor número de microorganismos utilizaron isopropanol, posteriormente acetato de etilo y finalmente tolueno. Lo anterior puede atribuirse a la complejidad de la estructura del compuesto.

§ 3.6 Inhibidores

Como se demostró en la sección anterior, la turba posee cierta flora microbiana y por esta razón es posible que la turba no contenga sustancias que inhiban el crecimiento de los microorganismos. Para lo cual, se analizó la influencia del extracto acuoso de la turba sobre el crecimiento de microorganismos específicos, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.5 Inhibidores

Fuente de carbono → Medio utilizado ↓	Acetato de etilo Biomasa (mg/L)	Isopropanol Biomasa (mg/L)	Tolueno Biomasa (mg/L)
Extracto de turba	280	150	160
Medio mineral	254	220	347.98

El análisis de los resultados en estos experimentos, es difícil ya que la cantidad de sales en ambos medios no fue la misma, sin embargo con los resultados obtenidos se puede ver que la turba contiene una fracción de nutrientes que son disponibles y permiten el crecimiento de los microorganismos. Lo anterior permite descartar que el extracto de turba contenga inhibidores para los microorganismos utilizados en este estudio.

§ 3.7 Determinación de los parámetros cinéticos

Los cultivos mixtos crecidos en presencia de múltiples sustratos o fuentes de carbono son utilizados cotidianamente en procesos de biotratamiento (biofiltración); el estudio detallado de los mismos es crucial para el desarrollo de un entendimiento de la cinética del proceso que se aplica en la operación de sistemas de biotratamiento (Bitzi y col., 1991).

Hace más de 30 años, Gaden (Bitzi y col., 1991) recalzó que la información en la cinética del bioproceso es esencial para el diseño de procesos continuos. Sin embargo, para comprender el fenómeno de la biodegradación de los componentes de una mezcla de sustratos es necesario realizar estudios con cada uno de los componentes de manera

individual (Arvin y col., 1989; Alvarez y Vogel, 1991; Smith y col., 1991; Rogers y Reardon, 2000). A continuación se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la actividad metabólica del consorcio y la obtención de los parámetros cinéticos que describen el consumo de dichos sustratos. En el presente estudio se determinó la capacidad del consorcio para utilizar 3 distintas fuentes de carbono a diferentes concentraciones iniciales, evaluando por separado al acetato de etilo, isopropanol y tolueno.

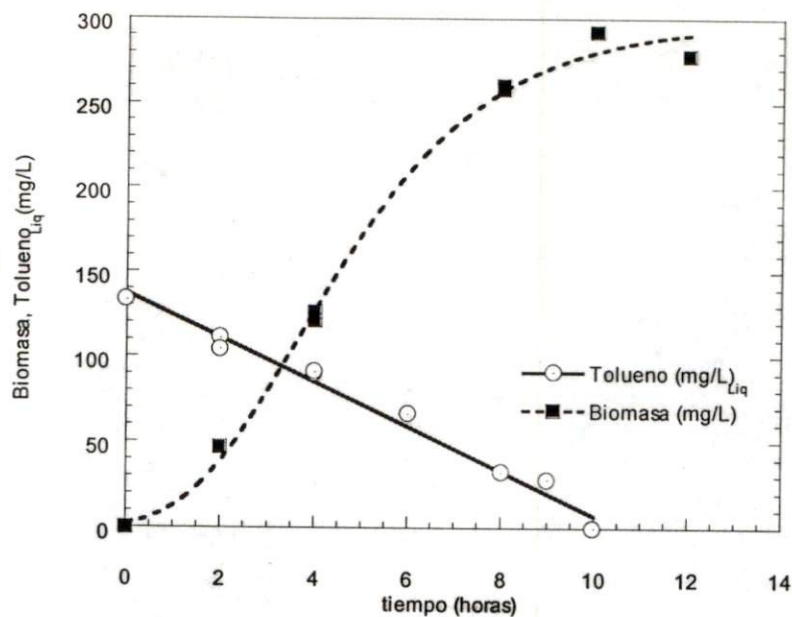
En el caso de sustratos volátiles tales como el tolueno, acetato de etilo e isopropanol, que se encuentran tanto en la fase líquida como en la fase gaseosa, las velocidades de crecimiento microbiano dependen de la concentración en fase líquida, pero el rendimiento de biomasa depende del cambio de la masa total del sustrato (Reardon y col., 2000). Las masas de un compuesto volátil en la fase líquida y gaseosa son relacionadas mediante la ley de Henry como se describe en la siguiente expresión:

$$m_{\text{tot}} = m_l + m_g = m_l \left(1 + \left(\frac{H}{RT} \right) \left(\frac{V_g}{V_l} \right) \right) \quad \dots 3.3$$

Donde: m se refiere a la masa del sustrato volátil en la fase gas (g), en la fase líquida (l) o en el sistema completo (tot). H es la constante de la ley de Henry ($\text{atm m}^3/\text{mol}$), R es la constante de los gases (atm L/mol K), T es la temperatura (K) y V_g y V_l son volúmenes en la fase gaseosa y líquida (L), respectivamente. De acuerdo a lo anterior los datos de consumo de sustrato y la producción de biomasa se presentaran en función de la concentración del sustrato en la fase líquida.

§ 3.7.1 Tolueno

Los resultados de degradación de tolueno para una concentración inicial de 133 mg/L, se muestran en la gráfica 3.6. El crecimiento se inició inmediatamente, es decir que no hubo fase de adaptación para el consorcio y después de 10 horas de cultivo el tolueno fue completamente consumido y el máximo de biomasa producida correspondió a 300 mg/L. Cabe mencionar que se realizaron experimentos independientes en los cuales se midieron los mismos parámetros para diferentes concentraciones iniciales de tolueno desde 31.07 mg/L hasta 304.3 mg/L. Lo anterior se realizó con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos para el consorcio en estudio



Gráfica 3.6 Evolución de consumo de tolueno, producción de biomasa

Para realizar el balance y determinar la distribución del tolueno consumido, en la gráfica 3.7 se presentan los datos en masa total de tolueno, biomasa, CO₂ y O₂ como una función del tiempo. Por otro lado la reacción estequiométrica de la oxidación de tolueno hasta CO₂ y agua, es descrita mediante la siguiente expresión:

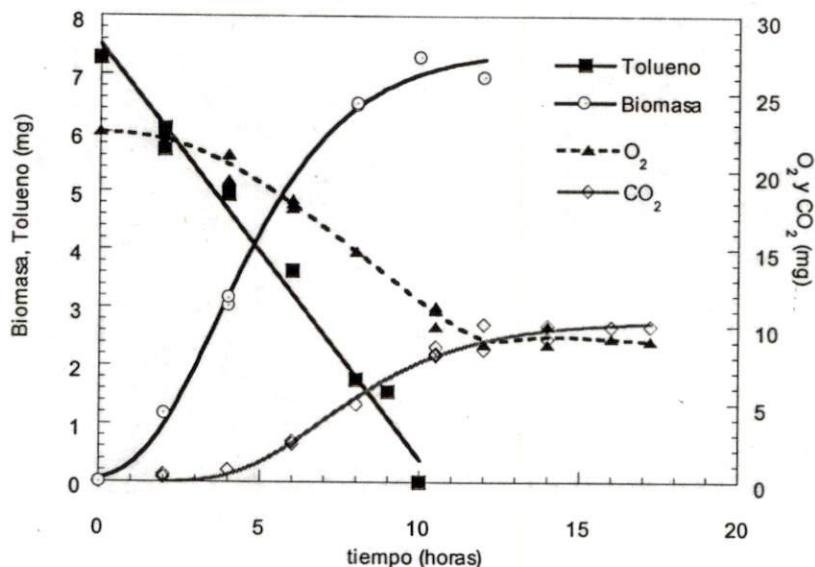


Figura. 3.7 Evolución del consumo de tolueno y O₂, producción de biomasa y CO₂ en mg totales.

De esta manera, a través de la ecuación 3.4 tenemos que la oxidación completa de 92 mg de tolueno (un milimol) hasta CO_2 y H_2O , nos permite obtener teóricamente 308 mg de CO_2 . En la gráfica 3.7 se observa que a partir de una masa inicial de 7.8 mg de tolueno, se obtuvieron 12 mg de CO_2 , lo cual indica que aproximadamente el 46% del carbono consumido fue recuperado como CO_2 . Por otro lado, se obtuvieron 7 mg de biomasa, asumiendo que el porcentaje de carbono en la biomasa es del 53% (Scriban, 1985), el 49% del carbono del tolueno se usó para la formación de biomasa. En lo que se refiere al consumo de O_2 y la producción de CO_2 , estos parámetros se encontraron correlacionados, ya que el balance indica que para oxidar 92 mg de tolueno se requieren 288 mg de O_2 y teóricamente se obtendrán 308 mg de CO_2 , basados en este análisis y en los datos de la gráfica 3.7 tenemos que se consumieron 11 mg de O_2 y se produjeron 12 mg de CO_2 , es decir el 85% de O_2 fue utilizado para la conversión del tolueno inicial, lo cual corrobora que este sustrato fue totalmente consumido.

El valor de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato ($Y_{x/\text{tol}}$), fue determinado a partir de los datos experimentales (g de biomasa producida/g de sustrato consumido) y este tuvo un valor de 0.95 (mg de biomasa/mg de tolueno). El valor teórico del coeficiente ($Y_{x/\text{tol}}$), es de 1.23 g biomasa/g tolueno (Shuler y Kargi, 1992). Los valores de ($Y_{x/\text{tol}}$), representados en la tabla 3.6, muestran datos de rendimiento obtenidos por diferentes autores, algunos son similares al teórico, incluyendo a *P. putida* F1 y *P. putida* R1, y otros se encuentran entre 0.9 y 1.0 entre los cuales tenemos el valor determinado para el consorcio utilizado en este estudio. Una excepción, respecto al rendimiento es *P. putida* O1 cuyo valor de ($Y_{x/\text{tol}}$) es menor al promedio reportado.

Tabla 3.6. Parámetros cinéticos para cultivos puros de *Pseudomonas* crecidas en tolueno

Microorganismo y tipo de cultivo	Concentración de tolueno (mg/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_s (mg/L)	K_I (mg/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Referencia
¹ <i>P. putida</i> ATCC33015	-	0.13	0.09	-	1.05	Veicht y col., 1988
¹ <i>P. putida</i> mt-2	-	0.4	-	-	-	Duetz y col., 1994
¹ <i>P. cepacia</i> G4	-	0.19	-	-	-	Duetz y col., 1994
¹ <i>P. fluorescens</i>	-	0.46	1.88	-	0.99	Chang y col., 1993
¹ <i>P. GJ 31</i>	-	0.58	4.6	-	-	Keuning y Jager, 1994
¹ <i>P. GJ40</i>	-	0.58	6.4	-	-	Keuning y Jager, 1994
² <i>P. putida</i> F1 batch	43	0.86	13.8	-	1.28	Reardon y col., 2000
² <i>P. putida</i> R1 batch	4	0.504	0.1	-	1.2	Pedersen y col., 1997
² <i>P. putida</i> 54G batch	50	0.42	3.98	42.78*	0.9	Mirpuri y col., 1997
² <i>P. putida</i> O1 batch	70	0.72	15.07	44.43*	0.64	Oh y col., 1994
² <i>P. fragi</i> B1 batch	10	0.543	1.96	-	1.22	Chang y col., 1993
² <i>P. sp.</i> X1 Batch	10	0.452	1.88	-	0.99	Chang y col., 1993
² <i>P. putida</i> ATCC 23973 Batch	30	0.437	6.0	1980*	-	Choi y col., 1992
Consortio	30-304	0.38	13.8	110*	0.95	Este trabajo

Fuente: ¹Pedersen, 1996; ² Reardon y col., 2000; * Parámetros obtenidos a partir del modelo de Andrews.

En la figura 3.8 se presentan las cinéticas de crecimiento realizadas para 7 concentraciones iniciales de tolueno, a partir de dichas curvas se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) del cultivo, lo anterior permitió obtener los valores que se observan en la tabla 3.7. El método para determinar los parámetros microcinéticos (μ_{\max} , K_s y K_I) fue similar al realizado por Livingston (1991), restando la cantidad de biomasa inicial.

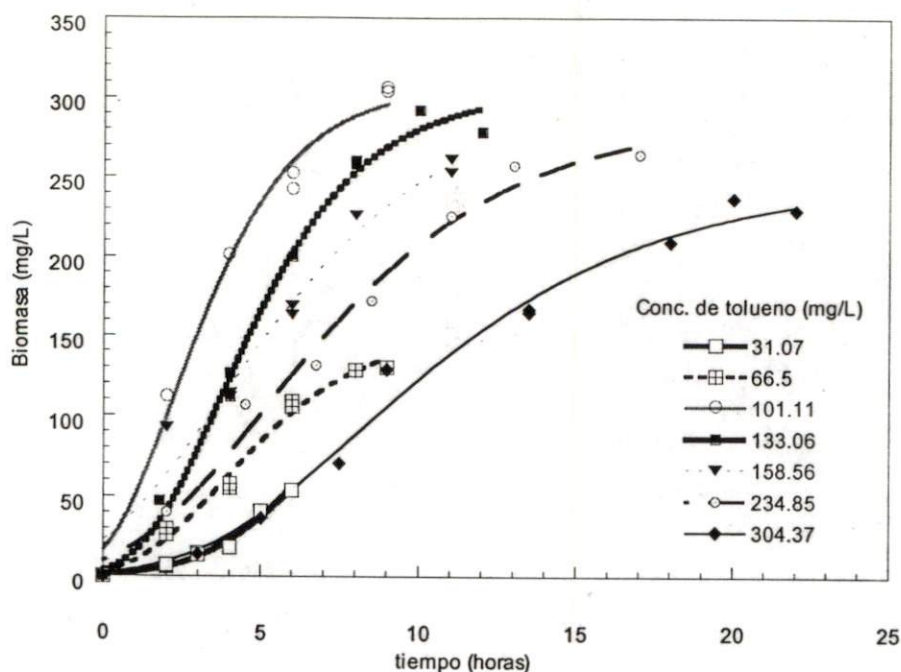


Figura 3.8 Curvas de crecimiento del consorcio a diferentes concentraciones iniciales de tolueno.

Tabla 3.7 Concentraciones iniciales de tolueno y las μ obtenidas en cada experimento.

mg iniciales de Tolueno	Tolueno mg/L (fase líquida)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})
1.8	31.0	0.21
3.9	66.3	0.37
5.9	101.1	0.43
7.8	133.0	0.39
9.3	158.6	0.26
12.7	234.9	0.23
17.8	304.4	0.19

Las diferentes velocidades específicas de crecimiento (μ) se graficaron contra las concentraciones correspondientes de tolueno utilizado, como se indica en la figura 3.9. El comportamiento de los datos indica una disminución de μ a concentraciones de tolueno, mayores a 100 mg/L en fase líquida, lo cual sugiere un efecto de inhibición por sustrato. Algunos autores han reportado que para el caso de cinéticas que presentan inhibición por sustrato, el modelo de Andrews (Andrews, 1968) resulta útil para describir el comportamiento de los datos y determinar el valor de μ_{max} y K_s , ya que incluye una constante de inhibición K_i (Choi y col., 1992; Oh y col., 1994; Mirpuri y col., 1997).

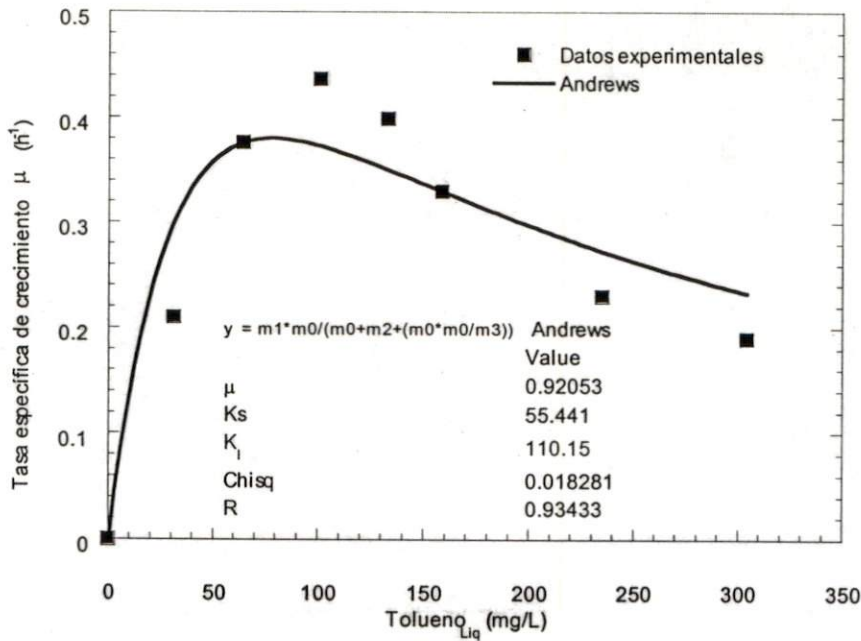


Fig. 3.9 Ajuste de los datos experimentales utilizando la ecuación de Andrews, utilizando tolueno como sustrato.

El análisis del comportamiento cinético en este estudio fue realizado mediante el modelo de Andrews, el cual tiene una constante de inhibición y a continuación se describe:

$$\mu_{max} = \frac{\mu^* S_T}{K_s + S_T + \left(\frac{S_T^2}{K_I} \right)} \quad \dots 3.5$$

Donde: S_T es la concentración de sustrato. K_s es la constante de saturación y K_I la constante de inhibición. Los valores obtenidos a través del ajuste son: $\mu^* = 0.92 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 55.4 \text{ mg/L}$; $K_I = 110 \text{ mg/L}$.

El valor de μ^* es al menos 2 veces mayor comparado con el máximo valor que se alcanzó experimentalmente (0.43 h^{-1}), por lo tanto el valor de μ^* puede ser considerado como un valor aparente, así que para obtener el valor real de μ_{max} es necesario derivar la ecuación 3.5 respecto a S_T , lo que nos lleva al hecho de que la derivada vale cero cuando:

$$S_T = \left(\frac{K_s}{K_I} \right)^{0.5} \text{ entonces sustituyendo } S_T \text{ en la ecuación 3.5 tenemos la siguiente}$$

expresión:

$$\mu_{max} = \frac{\mu^*}{1 + 2\left(\frac{K_s}{K_I}\right)^2} \quad \dots 3.6$$

De esta manera, sustituyendo los valores de μ^* , K_s y K_I en la ecuación 3.6, nos permite obtener el valor de $\mu_{m\acute{a}x}$, el cual es de 0.38 h^{-1} . Este valor es similar al determinado experimentalmente, el comportamiento descrito por la ecuación de Andrews (3.6) es comparado con los datos experimentales en la gráfica 3.9 y podemos ver que la curva descrita por esta ecuación tiene un buen ajuste con los datos experimentales. Así la $\mu_{m\acute{a}x}$, la K_s y la K_I del consorcio microbiano con tolueno fueron 0.38 h^{-1} , 55.4 mg/L y 110 mg/L , respectivamente. El modelo de Andrews, tiene la posibilidad de describir cinéticas que presentan inhibición por sustrato, obteniendo y relacionando los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_I .

La mayoría de los cultivos presentados en la Tabla 3.6 tienen valores de la velocidad específica de crecimiento μ_{max} en un rango entre 0.4 y 0.55 h^{-1} , con excepción de *P. putida* O1 (0.72 h^{-1}) y *P. putida* F1 (0.86 h^{-1}). El valor de μ_{max} calculado con el modelo tiene una valor de 0.38 h^{-1} , dicho valor es mayor al obtenido para *P. putida* ATCC33015 (0.13 h^{-1}) (Veicht y col., 1988) y para *P. cepacia* G4 (0.19 h^{-1}) (Duetz y col., 1994), es cercano al límite inferior del promedio en el que se encuentra la μ_{max} de la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* reportadas.

Los valores de K_s indican la habilidad del microorganismo para crecer a bajos niveles de sustrato y se encuentran en un rango entre 0.1 y 15 mg/L para *P. putida* R1 y O1, respectivamente. Reardon y col. (2000) reportan una K_s de 13.8 mg/L para *P. putida* F1 y una concentración de tolueno de 43 mg/L , en el caso de Oh y col. (1994) estos reportan una K_s de 15.07 mg/L y una concentración de tolueno de 70 mg/L . El valor determinado con el modelo de Andrews para el consorcio fue 55.44 mg/L . Sin embargo, se sabe que la constante de saturación K_s , es igual a la menor concentración de sustrato a la cual la velocidad específica de crecimiento es igual a un medio la máxima velocidad específica de crecimiento (Andrews, 1968), bajo este argumento el valor de K_s para el consorcio en el presente trabajo a partir de los datos experimentales corresponde a 15.7 mg/L . Este valor se encuentra en el límite superior del rango de reportado para otras bacterias como se puede observar en la tabla 3.6.

La inhibición por sustrato ha sido reportada para tres de los cultivos que se presentan en la tabla 3.6 y el modelo de Andrews se uso para determinar la velocidad específica de crecimiento en dichos estudios. Valores de K_I cercanos a 44 mg/L fueron determinados para *P. putida* 54G y O1 (Mirpuri y col., 1997; Oh y col., 1994). Para el tercer cultivo reportado, la K_I fue cercana a los 2000 mg/L , mientras que para el consorcio utilizado en este trabajo la K_I fue de 110 mg/L , éste valor es aproximadamente el doble al obtenido por otros autores (tabla 3.6). Sin embargo, la constante de inhibición depende del tipo de cultivo así como de la tolerancia de los microorganismos. Ya que se ha demostrado que el tolueno es altamente biotóxico e inhibe a muchos microorganismos a bajas concentraciones ($0.1\% \text{ v/v}$) sin embargo algunas especies tales como *Pseudomonas*, *Acrobacter* y *Nocardia* pueden

asimilar el tolueno y su tolerancia a este solvente es cercana a 0.3 % v/v. Inoue y Horikoshi (1989) reportan una cepa de *P. putida* capaz de crecer en un medio de cultivo con 50 % de tolueno v/v.

Otro aspecto importante, es la velocidad de consumo del sustrato, por lo cual se presentan y analizan los perfiles de consumo del tolueno (gráfica 3.10).

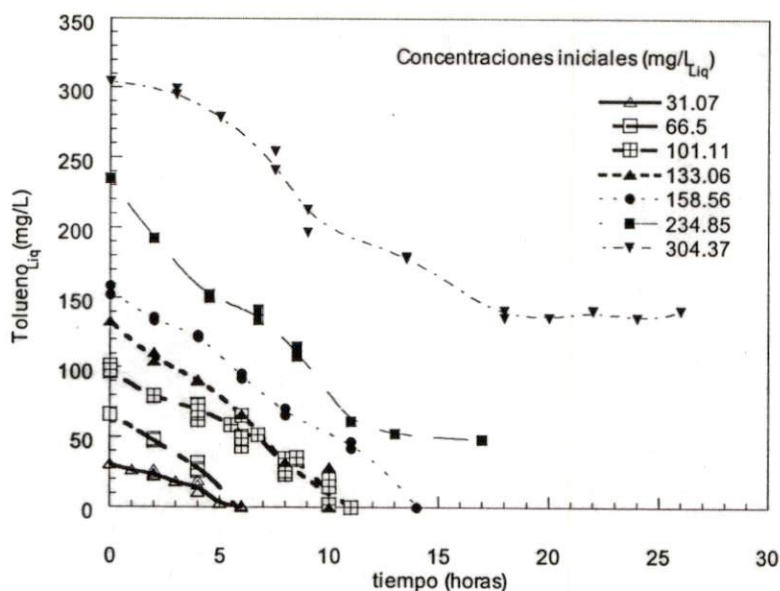


Fig. 3.10 Perfiles de consumo de tolueno

Para concentraciones iniciales de tolueno entre 31.1 y 66.3 mg/L, este fue rápidamente agotado en las primeras 5 horas de cultivo, mientras que para las concentraciones entre 101 a 133 mg/L de tolueno el sustrato tardó 10 horas en consumirse. A medida que se incrementó la concentración de tolueno el consumo se hizo más lento, de esta forma con 158 mg/L de tolueno el tiempo de consumo fue de 15 horas. Para concentraciones entre 234.85 y de 304.37 mg/L el tolueno no fue completamente consumido, para esta última concentración inicial de tolueno el consumo fue de aproximadamente 50%. Con estos datos se calcularon las velocidades de consumo del tolueno para el consorcio y se graficaron contra la concentración inicial como se observa en la gráfica 3.11. En donde se observan dos zonas de reacción, la de primer orden que se encuentra entre 0 y 36 mg/L, con una velocidad específica de consumo de 0.16 h^{-1} para concentraciones mayores entre 98 a 300 mg/L, la velocidad de consumo se hizo independiente a la concentración del sustrato. Sin embargo en las dos últimas concentraciones 234 y 304 mg/L de tolueno el rendimiento disminuyó en un 15 y 25% respectivamente, la importancia de esta observación es que el consorcio puede degradar a una velocidad constante el tolueno aun en presencia de altas concentraciones de este compuesto y tener una tasa de crecimiento menor, lo cual resulta de gran interés en los biofiltros.

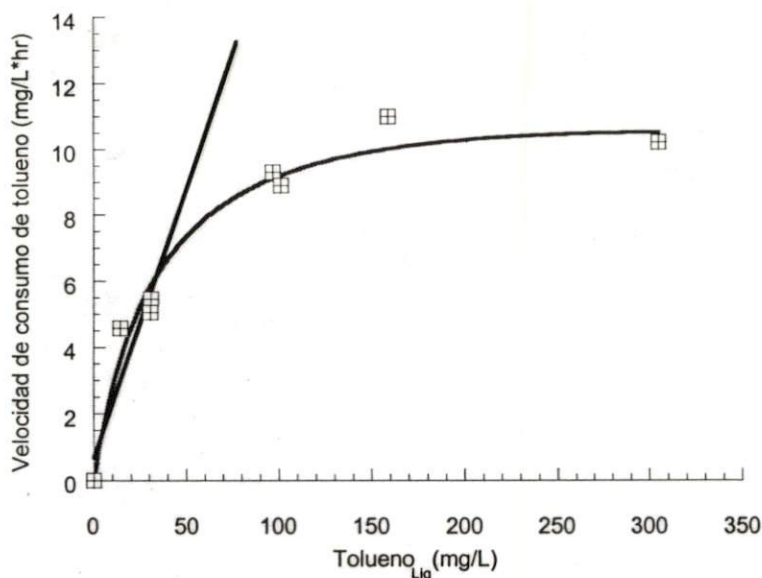
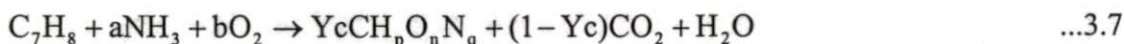


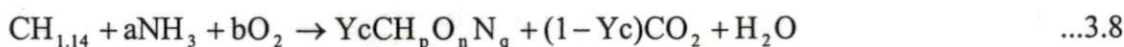
Fig. 3.11 Velocidades de consumo contra las diferentes concentraciones iniciales de tolueno.

§ 3.11.6 Balance para tolueno.

Partiendo de que la composición celular puede ser representada mediante la siguiente expresión: $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ (Shareefdeen y col., 1993), de que la fuente de nitrógeno utilizada fue: $(NH_4)_2SO_4$, de que el rendimiento para el tolueno (Y_{Tol}) fue = 0.95 (mg de biomasa/mg de sustrato) y suponiendo que no hay formación de productos (oxidación total del tolueno), entonces uno puede escribir:



rescribiendo la ecuación, para una mol de carbono de tolueno la ecuación 3.7 queda de la siguiente manera:



datos adicionales:

- La fracción en peso del carbono en la biomasa es del 53 % ($s_b = 0.53$)
- La fracción en peso del carbono en el tolueno es del 91% ($s_s = 0.91$)

De esta manera tenemos que: el grado de reductancia para la biomasa (γ_b) esta dado por:

$$\gamma_b = 4 + P - 2n - 3q \quad \dots 3.9$$

sustituyendo en 3.9 obtenemos:

$$\gamma_b = 4 + 1.8 - 2(0.5) - 3(0.2) = 4.2$$

mientras que el grado de reductancia para el sustrato (γ_s) esta dado por:

...3.10

$$\gamma_s = 4 + m - 2l$$

sustituyendo en la ecuación 3.10 tenemos:

$$\gamma_s = 4 + 1.143 - 5.143$$

por otro lado el rendimiento energético de la biomasa (η) esta dado por:

$$\eta = \left(\frac{\sigma b \gamma b}{\sigma s \gamma s} \right) \quad \dots 3.11$$

Sustituyendo en 3.11

$$\eta = \left(\frac{(0.53)(4.2)}{(0.91)(5.13)} \right) = 0.4756$$

mientras que el rendimiento teórico de carbono esta dado por la siguiente relación:

$$Y_c = \left(\frac{\gamma b}{\gamma s} \right) \eta \quad \dots 3.12$$

sustituyendo en 3.12 tenemos que

$$Y_c = \left(\frac{5.143}{4.2} \right) 0.4756 = 0.5823$$

Así que la demanda de nitrógeno (a) esta dada por:

$$a = \left(\frac{\gamma b}{\gamma s} \right) (q * \eta) \quad \dots 3.13$$

$$a = \left(\frac{5.143}{4.2} \right) (0.2 * 0.4756) = 0.1164$$

mientras que la formación de CO₂ (d) esta dada por:

$$d = 1 - \left(\frac{\gamma b}{\gamma s} \right) \eta \quad \dots 3.14$$

sustituyendo en 3.14

$$d = 1 - \left(\frac{5.143}{4.2} \right) 0.4756 = 0.4176$$

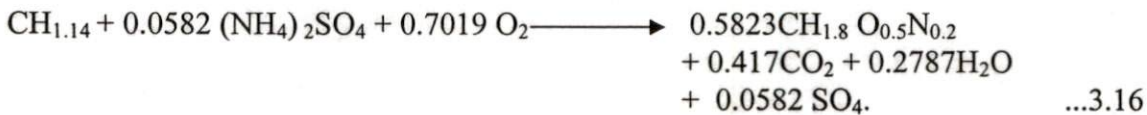
La demanda de O₂ (*b*) es:

$$b = \left(\frac{Y_S}{4} \right) (1 - \eta) \quad \dots 3.15$$

sustituyendo valores en 3.15

$$b = \left(\frac{5.143}{4} \right) (1 - 0.4756) = 0.6742$$

Finalmente, para escribir la ecuación del balance global sustituimos los valores obtenidos, quedando la distribución del tolueno de la siguiente manera:



Los balances de masa y energía pueden ser usados para examinar la consistencia de los datos experimentales. Cuando hay productos presentes, cuatro o más variables deben ser medidas para evaluar la consistencia de los datos experimentales. Por ejemplo, los datos de velocidad de consumo de un sustrato orgánico y la tasa de producción de biomasa, pueden ser usados para estimar el rendimiento energético de la biomasa (η) (Erickson, 1979). Así, basados en lo anterior y en la ecuación 3.15, podemos calcular el rendimiento energético de la biomasa (η), el cual fue igual a 0.48 y el rendimiento de oxígeno $Y_o = 0.82$ (gramos de biomasa/gramos de O₂).

Los requerimientos de oxígeno y sustrato, así como el rendimiento de biomasa son algunos de los parámetros básicos que necesitan ser considerados para determinar la factibilidad de un proceso de degradación.

§ 3.11.3 Isopropanol

Otro de los sustratos evaluados con el consorcio fue el isopropanol, este es un alcohol secundario representativo en la formulación del thiner (Ramírez, 2000). En la figura 3.12, se presenta el crecimiento característico del consorcio con 206.67 mg/L de isopropanol en fase líquida. La evolución del crecimiento del consorcio en presencia de este sustrato fue similar para todas las concentraciones del sustrato evaluadas, debido a que para la obtención de los parámetros cinéticos se utilizaron concentraciones de isopropanol en un rango entre 51.66 y 516.67 mg/L en fase líquida.

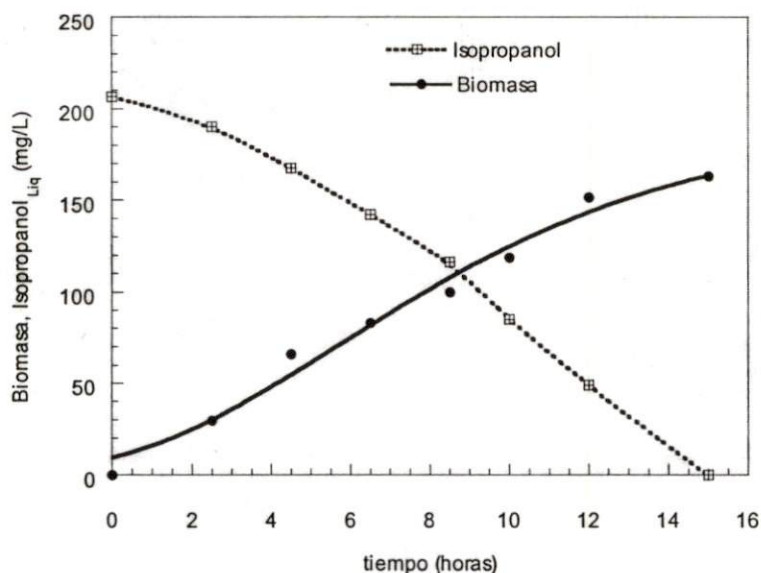


Fig. 3.12 Comportamiento del consumo del isopropanol y biomasa producida.

La evolución de la biomasa estuvo correlacionada con el consumo del sustrato y se puede observar que la fase de retardo fue muy pequeña, ya que el compuesto se empezó a degradar inmediatamente después de iniciado el cultivo. Lo anterior se debió a que se trata de un consorcio previamente adaptado y a que este alcohol es de fácil degradación (Bitzi y col., 1991). El compuesto en estudio fue consumido por completo en 15 horas; obteniéndose a partir de este 48.7 mg/L de CO_2 y 150 mg/L de biomasa, respectivamente

En la figura 3.13, se presentan las masas totales en mg de isopropanol, biomasa, CO_2 y O_2 . La relación entre las cantidades totales nos permite establecer la forma en la cual se distribuyó el carbono del isopropanol consumido.

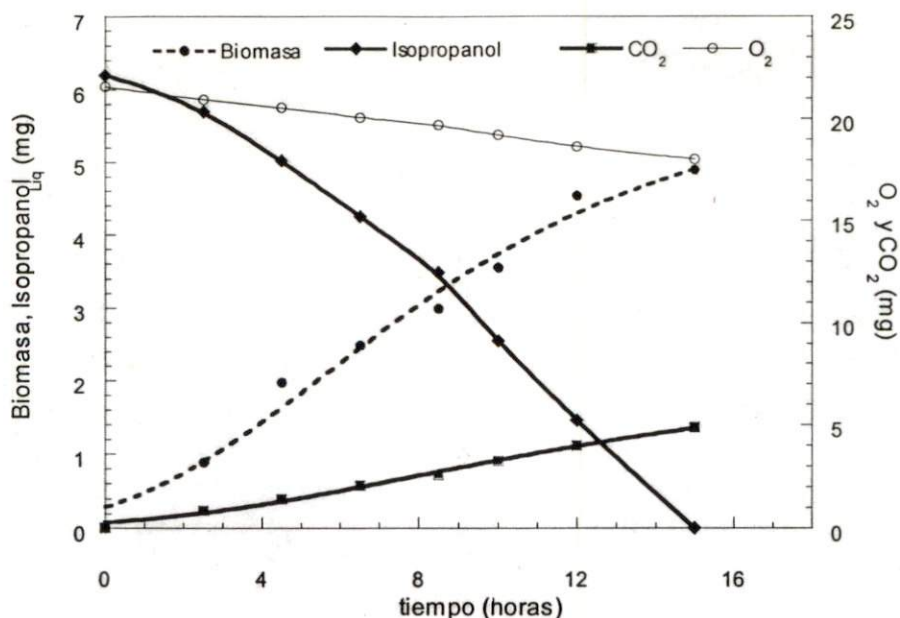


Fig. 3.13 Evolución del consumo de sustrato, O₂ y producción de biomasa y CO₂ en mg totales.

Partiendo de los datos obtenidos en los diferentes experimentos y con la ecuación 3.17, la cual describe la oxidación total del isopropanol hasta CO₂ y agua.



Sabemos que para oxidar totalmente un milimol de isopropanol. (60.1 mg) se requieren 3 milimoles de oxígeno (96 mg) y se obtienen 1.5 milimoles de CO₂ (66 mg), experimentalmente se utilizaron 6.21 mg de isopropanol, a partir de los cuales se produjeron 4.87 mg de CO₂ y 4.9 mg de biomasa, es decir que el 65% del carbono consumido fue hasta CO₂ y el 34% del carbono inicial fue utilizado para la formación de biomasa. El balance de carbono fue completamente cerrado. En lo que se refiere al consumo de oxígeno, teóricamente se requieren 9.91 mg para oxidar la cantidad inicial de isopropanol, experimentalmente se consumieron 9.5 mg de oxígeno, lo cual nos permite decir que el isopropanol fue completamente eliminado biológicamente.

Por otro lado, el rendimiento de biomasa en función al sustrato ($Y_{x/Isop}$) fue igual a 0.7 mg biomasa/mg isopropanol, este valor es superior al reportado para un cultivo puro utilizado para la obtención de proteína unicelular 0.43 mg biomasa/mg isopropanol (Abbott y Clamen, 1973) y para otros alcoholes. Sin embargo, el rendimiento obtenido en el presente estudio es similar al reportado por Bitzi y col. (1991), para un cultivo de *Pseudomonas* creciendo con isopropanol, tal como se puede observar en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Parámetros cinéticos para cultivos de bacterias y levaduras crecidas con diferentes alcoholes.

Cepa	Sustrato	Y (gx/gs)	Referencia
<i>P. putida</i> ATCC33015	Isopropanol	0.43	Abbott y Clamen, 1973
<i>C. utilis</i>	Etanol	0.68	¹ Johnson, 1967
<i>P. fluoresces</i>	Etanol	0.49	¹ Harrison y col., 1973
<i>Klebsiella sp.</i>	Metanol	0.38	² Nagai y col., 1979
Cultivo mixto	Butanol		² Nagai y col., 1979
<i>Pseudomonas</i> cultivo mixto	Isopropanol	0.81	Bitzi y col., 1991

Fuente: ¹Pirt, 1975; ²Bailey y Ollis, 1986.

Los parámetros cinéticos de este consorcio en presencia de isopropanol, se obtuvieron de forma similar que para el tolueno (3.7.1). Los resultados de las diferentes velocidades específicas de crecimiento (μ) se observan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9 Concentraciones iniciales de isopropanol, y las μ obtenidas en cada experimento.

Isopropanol mg totales	Isopropanol mg/L (fase líquida)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})
1.57	51.4	0.135
3.14	104	0.151
4.74	158	0.275
6.21	207	0.352
11.79	514	0.443
15.42	771	0.420
23.13	1027	0.22

Estos datos se utilizaron para determinar la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) del consorcio microbiano. En la gráfica 3.14, se observa el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento, la cual alcanza un máximo con una concentración de 515 mg/L de isopropanol. Una vez alcanzado el máximo la velocidad de consumo, esta se mantiene constante para una concentración de 771 mg/L y posteriormente decrece. Lo anterior podría sugerir un ligero fenómeno de inhibición por sustrato, es por esta razón que el análisis cinético fue realizado mediante el modelo descrito por la ecuación 3.5 y los valores obtenidos a través de esta ecuación son: $\mu^* = 0.44 h^{-1}$, $K_s = 102 mg/L$; $K_i = -9.76 \times 10^{15} mg/L$. Basados en los datos utilizando el modelo de Andrews la constante de inhibición K_i no tiene ningún sentido ya que es extremadamente pequeña comparada con K_s . Por tal

razón los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando el modelo de Monod con inhibición que es descrito a continuación:

$$\mu = \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{S}{K_I} \right) \quad \dots 3.18$$

El valor de μ_{max} determinado con la ecuación 3.18, fue de 0.52 h^{-1} , el cual es ligeramente mayor al que se alcanzó experimentalmente (0.443), el valor de K_S fue de 96.72 mg/L y K_I igual a 1235.7 mg/L .

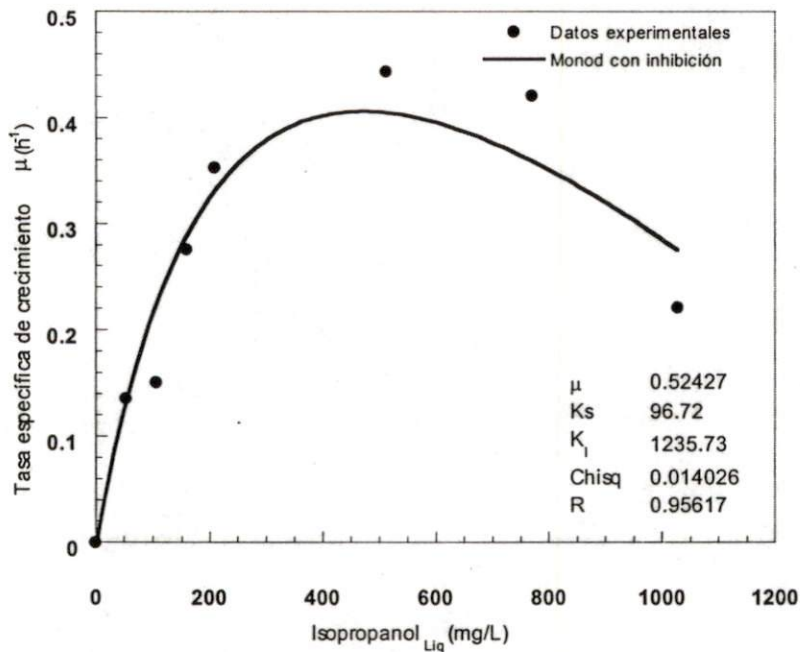


Figura. 3.14 Correlación de los datos experimentales de velocidad de crecimiento del consorcio mediante la ecuación de Monod con inhibición, utilizando isopropanol como sustrato.

El valor de μ_{max} determinado para el consorcio estudiado con isopropanol como única fuente de carbono y energía calculado a través de la ecuación 3.18 fue mayor al determinado experimentalmente y es 2.5 veces mayor (0.20 h^{-1}) al reportado por Bitzi y col. (1991) para un consorcio microbiano. Respecto a K_S y K_I no existen datos en la literatura para poder compararlos.

En la siguiente gráfica se presentan los perfiles de consumo de sustrato con las distintas concentraciones iniciales de isopropanol. Este sustrato fue consumido completamente en todas las concentraciones evaluadas. Tal es el caso de las tres primeras concentraciones, es decir 63.21 , 115.9 y 225 mg/L , las cuales fueron agotadas durante las primeras 8 h de cultivo. Por otro lado cuando se utilizaron 449 , 671 y 879 mg/L de Isopropanol, el consumo de este compuesto se inició después de aproximadamente 5 h y el sustrato se agotó a las 15 h de cultivo. Mientras que en el caso de la concentración correspondiente a 1473 mg/L , esta se empezó a utilizar rápidamente y fue completamente oxidada en 30 horas de cultivo.

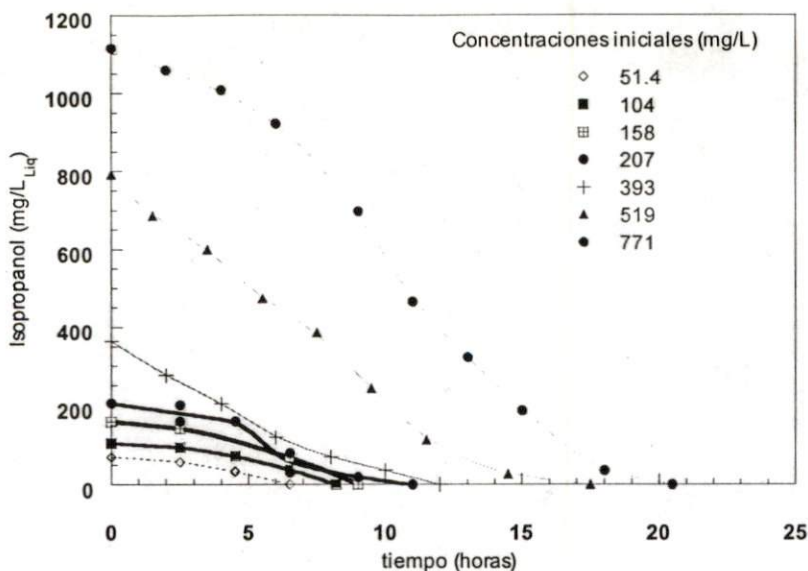
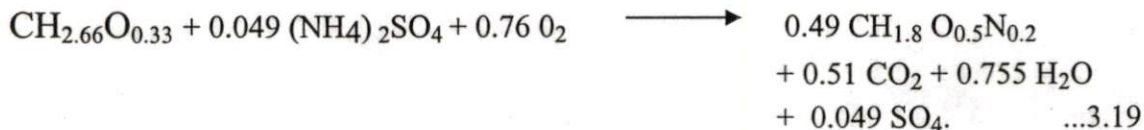


Fig. 3.15 Comparación de los perfiles de consumo de isopropanol

§ 3.11.4 Balance para el isopropanol

Partiendo de lo descrito en el punto 3.11.2 y de la misma manera que para el tolueno y con un rendimiento para el isopropanol (Y_{ISOP}) de 0.7 (mg de biomasa/mg de sustrato) podemos escribir el siguiente balance para el isopropanol.

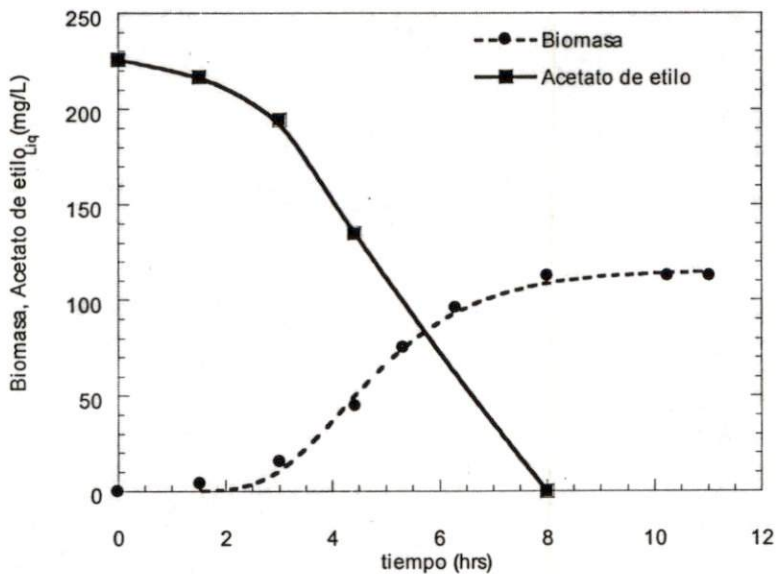


con estos datos se estimó el rendimiento energético de la biomasa (η), el cual fue igual a 0.6 y el rendimiento de oxígeno $Y_o = 0.65$ (gramos de biomasa/gramos de O_2).

§ 3.11.5 Acetato de etilo

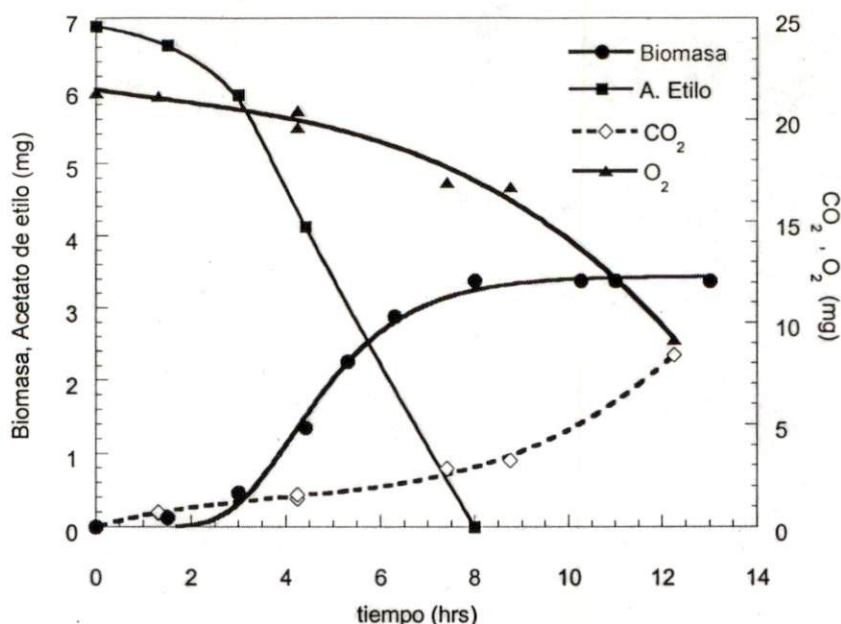
De manera similar al análisis realizado para el tolueno y el isopropanol, se presentan los resultados experimentales obtenidos con el Acetato de etilo, usado como única fuente de carbono y energía.

En la gráfica 3.16 se puede apreciar el comportamiento característico de crecimiento del consorcio, utilizando una concentración inicial de acetato de etilo de 225 mg/L en la fase líquida. El sustrato se agotó en 8 horas, tiempo en el cual se observó que el crecimiento alcanzó un máximo para posteriormente entrar en una fase de mantenimiento. Durante este periodo se consumieron 225 mg/L de Acetato de etilo, de los cuales se obtuvieron 110 mg de biomasa/L y aproximadamente 80 mg/L de CO₂. Un análisis similar se realizó para cada una de las 7 concentraciones diferentes entre 63 y 1473 mg/L de acetato de etilo; éstas se muestran a detalle en la tabla 3.10. En estos experimentos, crecimiento y consumo de sustrato estuvieron asociados.



Gráfica 3.16 Evolución del consumo de sustrato y producción de biomasa.

Con la finalidad de determinar la distribución del sustrato consumido se presenta la siguiente gráfica donde tenemos las masas totales de acetato de etilo CO₂, biomasa, así como los miligramos de O₂ consumido.



Gráfica 3.17 Evolución del consumo de sustrato y O₂, producción de biomasa y de CO₂ totales.

La oxidación total del acetato, se puede expresar estequiométricamente de la siguiente manera:



Lo cual implica que para oxidar 88.11 mg (un milimol) de acetato, son necesarios 160 mg de oxígeno. Teóricamente esta reacción produce 176 mg de CO₂. En la gráfica 3.16 se observa que a las 8 horas, los 7 mg de sustratos iniciales fueron consumidos completamente, obteniéndose 5 mg de CO₂. Al relacionar los datos experimentales de la gráfica 3.17 con la expresión estequiométrica se obtiene que el 62% del carbono fue recuperado como CO₂. Por otro lado, se obtuvieron 3 mg de biomasa a partir del sustrato inicial, lo cual significa que alrededor del 45% del carbono inicial fue utilizado para la formación de biomasa. El balance de carbono nos muestra que la recuperación fue del 107% del carbono inicial, el exceso en la cantidad total de carbono recuperado (biomasa y CO₂) pudo deberse al margen de error en la determinación de la biomasa.

En cuanto al consumo de O₂ el balance teórico indica que para oxidar 7 mg de acetato de etilo se necesitan consumir 13 mg de oxígeno, los resultados experimentales muestran un consumo de 12.17 mg, lo cual corrobora que la transformación del acetato fue completa. Estos datos nos permiten calcular el rendimiento (promedio) de biomasa en función del sustrato consumido ($Y_{X/S}$), el cual fue de 0.48 g biomasa/g sustrato. Este último se encuentra en el nivel superior reportado por Kwok y col. (1998) (de 0.4 a 0.12 g biomasa/g sustrato) para un biopelícula bacteriana crecida en un reactor con biomasa suspendida.

Los requerimientos de oxígeno y sustrato, así como el rendimiento de biomasa son algunos de los parámetros básicos que necesitan ser considerados para determinar la factibilidad de un proceso de degradación.

Los parámetros cinéticos μ_{\max} , K_s y K_i , se obtienen de la misma manera que en el caso del tolueno, en la tabla 3.10 se pueden apreciar los datos de μ .

Tabla 3.10 Concentraciones iniciales de acetato de etilo y la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada experimento.

mg de acetato de etilo	Acetato de etilo mg/L (fase líquida)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})
1.93	63.21	0.567
3.54	115.9	0.736
6.89	225.6	0.818
13.72	449.3	0.724
20.49	671	0.501
26.85	879.3	0.220
44.99	1473	0.110

Estos datos se utilizaron para determinar la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) del consorcio microbiano. En la gráfica 3.18, se observa el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento, la cual alcanza un máximo con una concentración de 225 mg/L de Acetato de etilo, una vez alcanzado el máximo las velocidades empiezan a decrecer a altas concentraciones de sustrato, (mayores de 250 mg/L de acetato) lo que indica una inhibición por sustrato. Y por lo tanto el análisis de este comportamiento cinético se realizó mediante el modelo de Andrews (ec. 3.5).

Los valores obtenidos son: $\mu^* = 1.6 h^{-1}$; $K_s = 85.24 mg/L$; $K_i = 286.11 mg/L$. Una vez más el valor de μ^* determinado con la ecuación 3.5 es mayor que el obtenido experimentalmente ($0.82 h^{-1}$), por lo tanto sustituyendo los valores de μ^* , K_s y K_i en la ecuación 3.6, se obtuvo el valor de μ_{\max} , el cual fue de $0.76 h^{-1}$, éste resultado es muy similar al determinado experimentalmente. El comportamiento descrito por la ecuación 3.6 es comparado con los datos experimentales en la gráfica 3.18, y podemos ver la curva descrita por la ecuación de Andrews (modelo) tiene un buen ajuste con los datos experimentales.

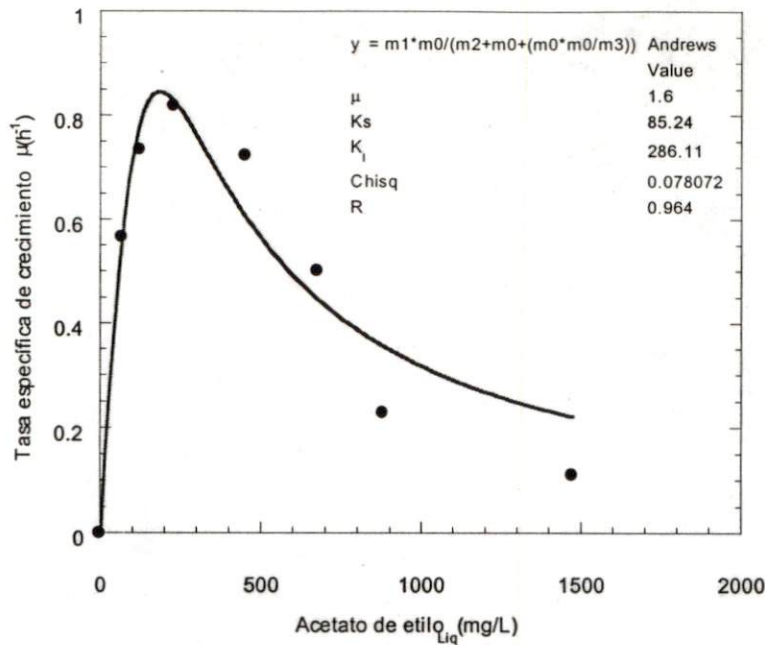


Fig. 3.18 comparación entre de los datos experimentales y los datos obtenidos con el modelo de Andrews.

Sin embargo como ya se discutió en el caso del tolueno la constante de saturación K_s , es igual a la menor concentración de sustrato a la cual la velocidad específica de crecimiento es igual a un medio la máxima velocidad específica de crecimiento (Andrews, 1968), entonces el valor experimental de éste parámetro fue de 23.36 mg/L.

En la siguiente gráfica se presentan los perfiles de consumo de sustrato con las distintas concentraciones iniciales de Acetato de etilo. Este sustrato fue consumido completamente en todas las concentraciones evaluadas. Tal es el caso de las tres primeras concentraciones, es decir 63.21, 115.9 y 225 mg/L, las cuales fueron agotadas durante las primeras 8 horas de cultivo. Por otro lado cuando se utilizaron 449, 671 y 879 mg/L de acetato, el consumo de este compuesto se inició después de 5 horas y el sustrato se agotó a las 15 horas de cultivo. Mientras que en el caso de la concentración correspondiente a 1473 mg/L, ésta se empezó a utilizar rápidamente y fue completamente oxidada en 30 horas de cultivo.

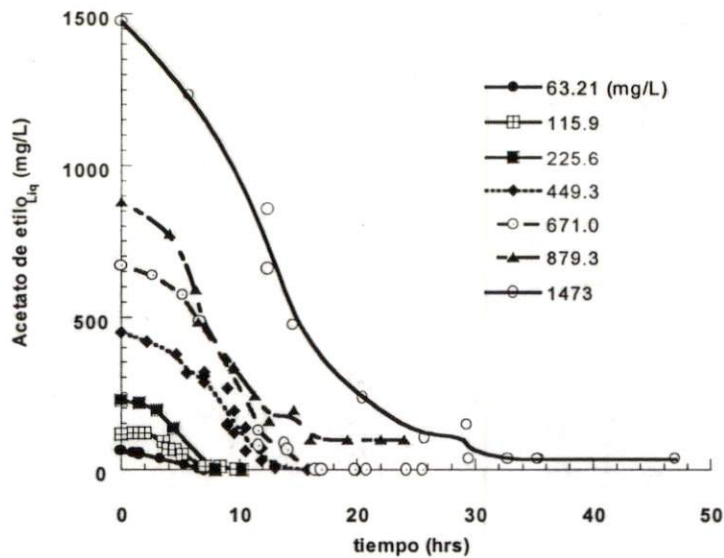


Fig. 3.19 comparación de los perfiles de consumo de acetato de etilo.

Las velocidades de consumo de este sustrato, se obtuvieron a partir de los perfiles mostrados en la figura anterior. Dichos datos se graficaron contra las diferentes concentraciones iniciales. En la grafica 3.20 se observa que la velocidad de consumo se va incrementando al aumentar la concentración inicial de acetato de etilo, con una velocidad específica de consumo de 0.18 h^{-1} en un rango de concentración de acetato de 0 a 200 mg/L. Rango en el cual tenemos una reacción de orden uno. Mientras que entre 200 y 500 mg/L se tiene una zona de transición, la cual puede ser denominada zona de pseudoprimer orden. Finalmente para concentraciones mayores a 500 mg/L, la velocidad de consumo del consorcio fue prácticamente constante e independiente del incremento de la concentración inicial de sustrato, es decir se trata de una zona de reacción de orden cero.

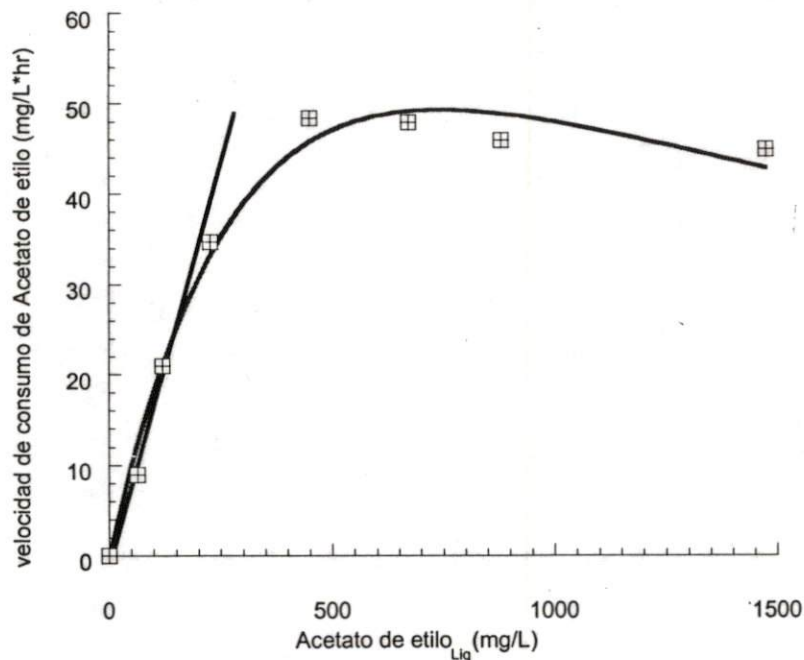


Fig. 3.20 Relación entre la velocidad de consumo y la concentración inicial de acetato de etilo.

El balance de carbono, se realizó con base a lo planteado por Erickson (1979) el cual permite corroborar los requerimientos y distribución de la fuente de carbono. Este se presenta a continuación:

§ 3.11.2 Balance para el acetato de etilo

Partiendo de un análisis similar al realizado para el tolueno e isopropanol, tenemos que el balance para el acetato de etilo se puede escribir de la siguiente manera.



El rendimiento energético de la biomasa (η) (Erickson, 1979). Así, basados en lo anterior y en la ecuación 3.15, podemos calcular la eficiencia (rendimiento energético de la biomasa (η), la cual fue igual a 0.53 y el rendimiento de oxígeno $Y_o = 0.64$ (gramos de biomasa/gramos de O_2).

A continuación se presenta un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el consorcio, utilizando tres solventes diferentes como única fuente de carbono y energía.

Tabla 3.11. Resumen de los parámetros cinéticos determinados en este estudio

Fuente de carbono	Y ($\frac{\text{g biomasa}}{\text{g sustrato}}$)	μ_{max} (h^{-1})	K_s (mg/L)	K_i (mg/L)
Tolueno	0.95	0.38	13.8	110
Isopropanol	0.7	0.52	96.7	1235.7
Acetato de etilo	0.48	0.76	23.3	286

De acuerdo a los resultados cinéticos, el consorcio microbiano evaluado alcanzó la máxima velocidad de crecimiento con acetato de etilo como única fuente de carbono y energía. Aparentemente las poblaciones presentes en este consorcio consumen eficientemente este compuesto y su crecimiento se inhibió a concentraciones de alrededor de 290 mg/L. En lo que respecta al isopropanol, con el modelo de Andrews no se obtuvo un buen ajuste y fue necesario la utilización del modelo de Monod con inhibición, la velocidad máxima de crecimiento determinada resultó mayor a lo reportado para otros consorcios. Sin embargo el valor de K_s es alto lo cual sugiere que este consorcio requiere concentraciones mayores de sustrato para crecer. Finalmente en el caso de tolueno la velocidad de crecimiento máxima alcanzada fue similar a los valores reportados en la literatura, la K_s obtenida para este

consorcio se encuentra en rango superior de los datos reportado, lo cual puede indicar una baja afinidad por dicho sustrato. Por otro lado los rendimientos de biomasa con respecto al sustrato fue mayor con el tolueno, lo cual coincide con lo reportado por otros autores.

§ 3.12 Aislamiento e identificación de los microorganismos pertenecientes al consorcio

Después de los procesos de adaptación y aislamiento de los microorganismos, descritos en materiales y métodos. De las cajas que presentaron abundante crecimiento, se realizaron resiembras por estría cruzada de cada una de las colonias que aparentemente eran diferentes, con la finalidad de obtener cepas puras.

De esta manera se obtuvieron 20 cepas diferentes. Es importante recalcar que después del aislamiento, algunas cepas no conservaron la capacidad de degradar los compuestos en estudio. Lo anterior puede deberse a que algunos microorganismos necesitan estar en asociación con otros para degradar los compuestos en estudio. Después de varias resiembras, no todas las cepas lograron desarrollarse de manera óptima, por lo que, finalmente se seleccionaron 5 cepas puras para la etapa de identificación.

De las cepas obtenidas a partir del consorcio, una de ellas mostró la capacidad de degradar acetato de etilo (denominada ACE 1), la segunda consumió isopropanol (ISO 1) y las tres restantes fueron capaces de degradar tolueno (TOL 1, TOL 2 y TOL 3).

Las características macroscópicas de las cepas mencionadas anteriormente son resumidas en la tabla 3.12

Tabla 3.12 Características macroscópicas de las cepas aisladas

Cepa	Edad (Horas)	Tamaño (mm)	Color	Forma	Borde	Aspecto	Luz Trásmítida	Luz Reflejada	Superficie	Consistencia	Elevación
ACE1	48	2	Crema	Circular	Liso	Húmedo	Opaca	Brillante	Lisa	Suave	Elevada
ISO1	48	1	Crema	Circular	Liso	Húmedo	Translúcida	Brillante	Lisa	Suave	Plana
TOL1	48	1.5	Amarillo Pálido	Circular	Liso	Húmedo	Opaca	Brillante	Lisa	Suave	Plana
TOL2	48	1.5	Amarillo Pálido	Circular	Liso	Húmedo	Opaca	Brillante	Lisa	Suave	Plana
TOL3	48	1.8	Crema	Circular	Liso	Húmedo	Translúcida	Brillante	Lisa	Suave	Plana

§ 3.12.1 IDENTIFICACIÓN

El protocolo para la identificación de las cepas aisladas consistió en la aplicación de una serie de pruebas bioquímicas que permiten identificar una serie de características específicas de los microorganismos y los relaciona con cierto género y familia. Las pruebas y los resultados que se obtuvieron al aplicarlas a las tres cepas aisladas a partir del consorcio microbiano inicial se muestran en la siguiente tabla (3.13).

Tabla 3.13 Resultados de las pruebas bioquímicas

PRUEBA	ACE 1	ISO 1	TOL 1	TOL 2	TOL 3
Mac Conkey	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo*	Bacilo	Coco
Gram	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
KOH	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Citocromo oxidasa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
Catalasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Oxido-Fermentación	No Sacarolitico	Fermentativo	Fermentativo	No Sacarolitico	Fermentativo
Movilidad	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Ferm. De Glucosa y Lactosa	Base/Base	Acido/Acido	Acido/Base	Base/Base	Base/Base
Voges-Proskauer	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
Sistema API 20-E					
ONPG	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Arginina Dihidrolasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Lisina Descarboxilasa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Ornitin Descarboxilasa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Citrato	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Sulfuro de Hidrógeno	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Ureasa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Triptofano Desaminasa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva
Indol	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
Voges-Proskauer	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
Gelatina	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
Glucosa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Manitol	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Inositol	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
Sorbitol	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Ramnosa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Sacarosa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Melibiosa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Amigdalina	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Arabinosa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva

Con la información que se muestra en las tablas 3.12 y las pruebas bioquímicas cuyos resultados se resumen en la tabla 3.13 se pudieron identificar tres de las cinco cepas. La cepa ACE 1 y TOL 2 fueron identificadas como *Pseudomonas putida* y la cepa ISO 1 fue

identificada como *Enterobacter cloacae*.

La siguiente figura muestra una vista característica de un cultivo de bacterias de *Pseudomonas putida*, aislada e identificada en este trabajo.

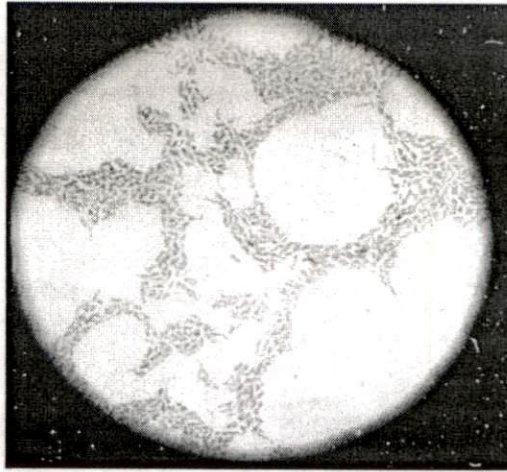


Figura 3.21 Bacteria identificada como *Pseudomonas putida*, con el sistema API 20-E

§ IV CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta investigación se pueden resumir en 3 aspectos, el primero referente al material de empaque, el segundo en cual se determinaron los parámetros cinéticos que rigen la degradación de tres diferentes compuestos con el consorcio y finalmente el tercero donde se identificaron 3 cepas pertenecientes al consorcio microbiano.

Respecto al soporte, se puede decir que posee una excelente capacidad de retención de humedad sin presentar drenaje, lo cual tuvo un efecto sobre la actividad de agua del material, ya que en un rango de 40 a 80 % de humedad el a_w se mantiene entre 0.99 y 0.999, mismo que permite que los microorganismos se desarrollen adecuadamente. El pH del extracto acuoso de la turba fue 3.7, por tal razón se adicionó CaCO_3 como agente neutralizante en una relación de 0.1 g de CaCO_3 /g de turba seca. La turba mostró que no contiene inhibidores de crecimiento microbiano y su microflora nativa es capaz de utilizar los solventes en estudio. El contenido de nitrógeno fue del 0.55%, mientras que la fracción mineral fue baja, lo cual implica la necesidad de adicionar nutrientes. Otro aspecto que cabe resaltar fue la baja caída de presión con este soporte a 65 % de humedad, es decir este material de empaque no ofrece una resistencia importante al paso del gas lo cual tiene un impacto positivo sobre el ahorro de energía en la operación de sistemas de biofiltración.

Por otro lado, el consorcio fue capaz de utilizar eficientemente los tres sustratos evaluados y con los parámetros cinéticos determinados se puede aseverar que el consorcio alcanza la máxima velocidad de crecimiento con acetato de etilo, posteriormente con isopropanol y finalmente con tolueno. Los resultados muestran que el consorcio tiene poca afinidad por el tolueno, sin embargo puede tolerar concentraciones mayores a las reportadas debido a que el crecimiento se empieza a inhibir a una concentración mayor de 100 mg/L. En lo que respecta al isopropanol, los valores de K_s y K_i fueron altos, sin embargo no existen datos que permitan compararlos con la literatura.

En el caso de los rendimientos, el obtenido para tolueno se encuentra en el rango reportado para *Pseudomonas* alrededor de 1 g biomasa/g tolueno, para isopropanol es ligeramente menor (0.7) comparado con el reportado por Bitzi y col. (1991) de 0.81 g biomasa/g isopropanol. En el caso de acetato de etilo es similar al reportado por Kwok y col. (1998).

En el caso de tolueno y acetato de etilo, el modelo de Andrews mostró correlacionar adecuadamente los datos experimentales cuando se tiene un efecto de inhibición, sin embargo para el isopropanol fue necesario la utilización del modelo de Monod con inhibición para determinar los parámetros cinéticos.

A partir del consorcio se lograron aislar 5 cepas, de las cuales se identificaron 3, dos correspondieron a *Pseudomonas putida*, capaz de degradar acetato de etilo y tolueno y la tercera cepa fue *Entoreobacter clocae* que tiene la capacidad de utilizar isopropanol. Cepas de *Pseudomonas* similares a las aisladas del consorcio han sido ampliamente reportadas como microorganismos capaces de degradar muy diversos compuestos contaminantes.

Cuando se plantearon los objetivos de este trabajo, la biofiltración aún era incipiente y algunos de sus más importantes logros no habían sido esclarecidos o peor aún ni siquiera planteados, ya que la mayoría de los trabajos se enfocaban a tratar de demostrar que la técnica de biofiltración para el tratamiento de gases contaminados con compuestos orgánicos volátiles era la tecnología del futuro y hoy es ese futuro, donde la biofiltración es una aplicación real y que cada día compite con otras tecnologías para ser una opción más en el tratamiento de efluentes gaseosos. Es por esta razón que al lector con experiencia en biofiltración los resultados aquí mostrados le parecerán poco innovadores. Sin embargo la mayoría de estos resultados permitieron sustentar al menos dos trabajos en el campo de la biofiltración que hoy en día son ampliamente reconocidos en el medio. El avance de esta tecnología se debió fundamentalmente a que se abordaron temas de investigación básica a cerca de materiales de empaque, microorganismos, cinéticas de degradación de diferentes contaminantes entre otros.

Actualmente los principios que rigen el proceso de la biofiltración han sido entendidos. Sin embargo cada día hay nuevos retos para esta tecnología, como son la operación de biofiltros bajo condiciones extremas de temperatura, pH y contaminantes más recalcitrantes, lo cual sugiere trabajar con nuevos microorganismos capaces de soportar dichas condiciones. Por otro lado, las condiciones de proceso que generan los contaminantes (fuentes intermitentes) requieren de nuevas propuestas respecto a la configuración de los sistemas de biofiltración, lo que da como resultado sistemas de biofiltración combinados y con mejores sistemas de control que permitan mantener altas eficiencias por largos periodos de operación.

§ V BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, S. (1970) Experimental microbial ecology. Academic Press. N.Y.
- Abbott, B.J. Clamen, A. (1973) The relationship of substrate, growth rate and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 15:117-122.
- Acuña, M. E., Pérez, F. Auria, R. Revah, S. (1999) Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol. Bioeng.* 63:175-184.
- Albert, A. L. (1990) Curso básico de toxicología ambiental. LIMUSA Noriega.1a. reimpression. México. pp 7-19.
- Alvarez PJ, Vogel TM. (1991) Substrate interactions of benzene, toluene and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl Environ Microbiol.* 57:2981-2985.
- Andrews, J. F. (1968) A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 10:707-723.
- Arcangeli, J. P., Arvin, E. (1992) Modeling of toluene biodegradation and biofilm reactor. *Wat. Sci. tech.* Vol. 26. pp 617-626.
- Arcangeli, J. P., Arvin, E. (1992) Toluene biodegradation and biofilm growth in an aerobic fixed-film reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 510-517.
- Arvin, E., Jensen, B.K. Gundersen, A. (1989) Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. And Environ. Microbiol.* 57(10): 2981-2985
- Auria, R., Morales, M., Villegas, E., Revah, S. (1993) Influence of mould growth on the pressure drop in aerated solid-state fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 1007-1013.
- Auria, R., Frere, G., Morales, M., Acuña, M. E., Revah, S. (2000) Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 448-455.
- Bailey, E. J. Ollis, F. D. (1986) Biochemical engineering fundamentals. 2^{da} ed. Mc Graw-Hill international Editions.
- Baltzis, B.C., Shareefdeen, Z. (1993) Modeling and preliminary desing criteria for packed-ben biofilter. *Air & Waste Management Association/Denver/1993.*
- Bitzi, U., Egli, T., Hamer. G. (1991) The biodegradation of mixtures of organic solvents by mixed and monocultures of bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 1037-1042.
- Bohn Biofilter Corp. (1991) Soil bed engiennering. Tucson Arizona.

Bohn H.L. (1993) Biofiltration: Design principles and pitfalls. En Proceedings of the 86 th Annual Meeting of Air and Waste Management Association, Denver, Colorado.

Bohn, H. L. Bohn, H. K. (1999) Moisture in biofilters. Environmental Progress. 18:156-161

Bravo, H. A., Sanchez, P. A., Sosa, E. R., Torres, E. R. (1997) Air pollution problem in the Mexico city metropolitan zone: photochemical pollution. In Proceedings of the 1997 Air Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition Toronto, Ontario. June 8-13. 1997.

Bureau, Van. , T, B., Bijl, J. J. W., (1986) VT- Biofilter.

Cárdenas-González, B., Ergas, J. S., Switzenbaum, S., M. (1999) Characterization of compost biofiltration media. Journal of the Air & Waste Management Association. 49: 784-793.

Claus, D., Walker, N. (1964) The decomposition of toluene by bacteria. J. Gen. Microbiol. 36: 107-122.

Comisión Ambiental Metropolitana, Zona Metropolitana de la ciudad de México, (1997), Informe anual de la calidad del aire 1996, México.

Corsi, L.R., Seed, L. (1995) Biofiltration of BTEX: Media, substrate, and loadings effects. Environmental Progress. 14: 151-158.

Cox, H. H.J., Moerman, R. E., van Baalen, S., van Heiningen, WNM., Doddema, H. J., Harder, W. (1996) Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. Biotechnol. Bioeng. 53: 259-266.

Choi, Y-B. Lee, J-Y. Kim, H-S. (1992) A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents : experimental results and mathematical analysis. Biotechnol. Bioeng. 40:1403-1411.

Devinny, J. S., Deshusses, M. A., Webster, T. S. (1999) Biofiltration for air pollution control. New York: Lewis Publishers. Devinny JS, Deshusses MA, Webster TS. 1999. Biofiltration for air pollution control. New York: Lewis Publishers. pp. 299.

Diks, R.M.M., Ottengraf, S.P.P., and van den Oever, A.H.C. (1991).The influence of NaCl on the degradation rate of dichloromethane by *Hyphomicrobium sp.*, Biodegradation, 5, 129.

Diks R. M. M. and Ottengraf S. P. P., (1991) Eindhoven. Verification studies of a simplified model for the removal of dichloromethane from waste gases using a biological trickling filter. Bioprocess Engineering 6:93-99.

Duetz, W.A. de Jong, C. Williams, P.A. van Andel, J.G. (1994) Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2858-2863.

Erickson, E.L. (1979) Energetic efficiency of biomass and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* 21:725-743.

Fernández, M.M. Aguilar, M.I. Carrique, J.R. Tortosa, J. García, C., López, M. Pérez, J.M. (1998) Suelos y medio ambiente en invernaderos. *Horticultura* No. 125 diciembre.

García-Peña, E.I. (2002) Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

García-Peña, E.I., Hernández, S. Favela, E. Torres, R. Auria, and S. Revah. (2001) Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1 *Biotechnol. Bioeng.* 76 :61-69

Gobi International (2000) Toluene. Southbank House Black Prince Road, London SE1 7SJ, Inglaterra.

Hodge, D.S. Medina, V.F. Islander, R. L. Deviny, J.S. (1991) Treatment of hydrocarbon fuel vapors in biofilters. *Environmental Technology* Vol. 12, pp. 655-662.

Hodge, D.S. Deviny, J.S. (1994) Biofilter treatment of ethanol vapors. *Environ. Prog.*, 13(3)167.

Inoue, A., Horikoshi, K., (1989) A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Letters to Nature.* 338:264-266.

Inoue, A., Yamamoto. M., Horikoshi, K. (1991) *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Applied and Environmental Microbiology* . Vol. 57. No. 5. pp 1560-1562.

Jackson, M.L. (1970) Análisis químico de suelos. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Jeannin, C., Mangeot, A., Verain, A. (1986) Ingeniería farmacéutica. Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp. 208-243.

Jennings, P. A. Shoeyink, V. L. Chian, E. S. K. (1976). Technical model for a submerged biological filter. *Biotechnol. Bioeng.* 18:1249-1273.

Jol. A., Dragt, A.J. (1988) Biotechnological elimination of volatile organic compounds in waste gases. DECHEMA, *Biotechnology conferences 2-VCH* Verlagsgesellschaft, pp 373-389.

Kaurichev, I.S. (1984) Prácticas de Edafología. Editorial Mir Moscú.

- Kelly, J. C. Bienkowski, R.P., Saylor, S.G. (2000) Kinetic analysis of a toluene-degrading bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism *Biotechnol. Bioeng.* 69: 256-265.
- Koneman, W. E., Allen, D. S., Dowell, R. V., Sommers, M. H. (1989) *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. 3ª Reimpresión. México D.F.
- Kwok W.K., Picioreanu C., Ong S.L., van Loosdrecht M.C., Ng W.J. y Heijnen J.J. (1998) Influence of biomass production and detachment forces on biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 4, 400-407.
- Leson G, Winer AM. (1991) Biofiltration an innovative air pollution control technology for VOC emission. *J Air Waste Manage Assoc* 41: 1045-1054.
- Livingston, A.G. (1991) Biodegradation of 3,4-dichloroaniline in a fluidized bed reactor and a steady-state biofilm kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 260-272.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275
- Mac Faddin, J. F. (1990) *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. México D.F.
- Manual de operación de laboratorio. (1986) Planta industrializadora de desechos sólidos. D.D.F.
- Manahan Stanley E., (1991) *Environmental chemistry*. Ed. Lewis Publishers. 5 Ed. pp. 320-331.
- Martin. G, P. Le cloirec, M. Lemasle, J. Cabon (1989) Retention de Produits Odorants Sur Tourbes. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. Vol. 4, pp. 373-378.
- Mallakin, A., Ward, O. P. (1996) Degradation of BTEX compounds in liquid media and in peat biofilters. *Journal of Industrial Microbiology*. 16:309-318.
- Mirpuri, R. Jones, W. Bryers, J.D. (1997) Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* 53:535-546.
- 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.* 60:483-491.
- Múgica-Alvarez, V., Ruiz-Santoto, M., Aguirre-Saldivar, R. (1997) Determinación de los perfiles de emisión de diversas fuentes y su aplicación en los modelos receptores. *Revista de educación química*. pp. 87-93.

Muller, J.C. (1988) Biofiltration of gases a mature technology for control of a wide range of air pollutants. A report to the National Research Council of Canada. 2:51-79.

Oh, Y-S. Shareefdeen, Z. Batlzis, B.C. (1994) Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnol. Bioeng.* 44:533-538.

Olmos. D.A. (1989) Reportes en biotecnología: Manual de métodos de análisis. No. 5 Ed. UAM-ORSTOM

Ottengraf, S.P.P. Van Den Oever, A. H. C., (1983) Kinetics of organic compound removal from waste gases with a biological filter. *Biotechnol. Bioeng.* 25:3089-3102.

Ottengraf, S. P. P., Meesters, J. J. P., Van Den Oever , A. H. C., Rozema, H. R. (1986) Biological elimination of volatile xenobiotic compounds in biofilters. *Bioprocess Engineering.* 1, 61-69.

Ottengraf, S. P. P., (1987) Biological systems for waste gas elimination. Elsevier Publications, Cambridge. 132-136.

Ottengraf, S.P.P. Disks, R. (1990) Biological purification of waste gases. *Chimica oggi.* pp. 41-45.

Pearson, C.C. Phillips, V.R. Green, G. Scotford, I.M. (1992) A minimum-cost biofilter for reducing aerial emissions from a broil-chicken house. En: *Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda.* Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, 245-254.

Pedersen, R.A. (1996) Biological removal of toluene in waste gas reactors. Ph.D. thesis. Institute of Environmental Science and Engineering Technical University of Denmark.

Pirt, J.S. (1975) Principles of microbe and cell cultivation. 1^{era} Ed. Blackwell scientific publications.

Pitt, J. I., Christian, J. H. B. (1968) Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microbiol.*, 16:1853-1858.

Polybac Corporation (1988) Biomass Engineering. Product Information Booklet. USA.

Ramirez Russ Lacquer by Design ©Professional Refinishing Magazine 2000 (<http://www.woodfinishingsupplies.com/Lacquer%20by%20Design.htm>)

Reardon, F. Kenneth., Mosteller, C. Douglas, Rogers Bull Julia D. (2000) Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida*. *F1. Biotechnol. Bioeng.* 69: 385-400.

Rieneck M.G. (1992) Mikrobiologische Methoden zur Charakterisierung von Biofiltermaterialien. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp 85-95.

Riveros, R. H., (1995) Contaminación atmosférica en la ciudad de México. Primer Coloquio Binacional México Japón Sobre Gestión Ambiental: Contaminación Atmosférica. México 25-26 de Enero de 1996.

Rodney, L., Pennington, P.E. (1996) A smorgasbord of VOC and HAP control options. Environmental Protection. pp 32-33.

Rogers, B.J., Reardon, F.K. (2000) Modeling substrate interactions during the biodegradation of mixtures of toluene and phenol by *Burkholderia* species JS150. Biotechnol. Bioeng. 70 : 428-435.

Romieu, I., Ramirez. M., Meneses, F., Ashley. D., Lemire, S., Colome, S., Fung, K., Hernández-Avila. M. (1999) Environmental exposure to volatile organic compounds among workers in Mexico city as assessed by personal monitors and blood concentrations. Environmental Health Perspectives. 107. pp 511-515.

Ruddy, N. E., Carrol, A. L., (1993) Select the Best VOC Control Strategy. Chemical Engineering Progress., July 28-35.

Sabo, F., Fisher, K. Baumeister, R. (1993) VDI Berichte NR 1034, pp. 521-539

Salemink, R. (1990) Technical and economical comparison of VOC control techniques. Clair Tech. Netherlands.

Schelchshorn, J. y Vinke, A. (1989) Erfahrungsbericht über die mikrobielle Entschwefelung von Biogasen auf Klaranlagen nach dem BiopurIC-Verfahren. En: VDI Berichte 735: Biologische Abgasreinigung, Praktische Erfahrungen und Neue Entwicklungen, DVI-Verlag, Düsseldorf pp 285-292.

Scriban, R. (1985) Biotecnología. Ed. Manual Moderno. México, D.F.

Seinfeld, H. J., (1990) The Environment and Chemical Reaction Engineering. Chemical Engineering Science. 45:2045-2055.

Shareefdeen, Z., Baltzis, B. C., Oh, Y. S., Bartha, R. (1993) Biofiltration of methanol vapor. Biotechnol. Bioeng. 41:512-524

Shen, T. T., Nelson, T. P., Schmidt C. E., (1990) Assessment and Control of VOC Emissions from Waste Disposal Facilities. Issue I. 20: 43-76.

Shuler, M.L. Kargi, F. (1992) Bioprocess engineering: basic concepts. New York: Prentice-Hall.

Smith, M.R. Ewing, M Ratledge, C. (1991) The interactions of various aromatic substrates degraded by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643: synergistic inhibition of growth by two compounds that serve as growth substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:536-538.

van Groenestijn JW, Hesselink PGM. (1993) Biotechniques for air pollution control. *Biodeg.* 4:283-301.

van Lith C. (1989) Design criteria for biofilters . En Proceedings of the 82nd Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, AWMA, Pittsburg, 1989.

van Lith, C., Leson, G., and Michelsen, R., (1997). Evaluating design options for biofilters. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 47(1), 37.

Veicht, S.E. Platt, M.W. Er-El, Z. Goldberg, I. (1988) The growth of *Pseudomonas putida* on m-toluic acid and on toluene in batch and in chemostat cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 587-592.

Wang, Si-jing. Loh, Kai-Chee. (1999) Growth Kinetics of *Pseudomonas putida* in Catabolism of Phenol and 4-Chlorophenol in the Presence of a Conventional Carbon Source. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 437-447.

Weckhuysen, B. Vriens, L. Verachtert, H. (1993) The effect of nutrient supplementation on the biofiltration removal of butanal in contaminated air. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:395-399.

Williams, T., Miller, F. C. (1992) Biofilters and facility operations. *Biocycle.* pp. 75-79.

Yágodin, B.A. (1982). *Agroquímica*. Editorial Mir Moscú. Vol. I.

§ VI ANEXOS

Anexo A

 Contenido de materia orgánica

Para ésta prueba, 0.05 g de turba se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 10 mL de dicromato de potasio 1 N y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó enérgicamente durante un minuto y se dejó reposar alrededor de 30 minutos. Después se agregaron 200 mL de agua destilada, 10 mL de ácido fosfórico al 95%, 0.2 gramos de fluoruro de sodio (NaF) y algunas gotas del indicador difenilamina al 1%, obteniendo una coloración púrpura. Finalmente, se tituló con sulfato ferroso amoniacal ((NH₄)₂FeSO₄) 0.5 N.

La cuantificación de materia orgánica se efectuó mediante la siguiente expresión:

$$\%MO = 10 - (P * N * F) \left(\frac{0.7}{M} \right) \quad \dots A1$$

donde:

M: Peso de la muestra (g)

T: Volumen de sulfato ferroso amónico utilizado para titular el blanco

P: Volumen de sulfato ferroso amónico utilizado para titular el problema

N: Normalidad del sulfato ferroso amónico.

0.69 = Porcentaje de efectividad del método

F: Factor (Vol. de K₂Cr₂O₇) / T(N)

Anexo B

Determinación del contenido de nitrógeno

Mineralización de la muestra

Para la mineralización, se utilizaron 0.2 gramos de turba (tamizada) los cuales se colocaron en papel filtro Whatman N° 42 y se transfirieron al interior de un microbalón Kjeldahl; 5 mL de ácido sulfúrico (98%), 0.07 g de selenio, 0.1 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y 0.2 g de sulfato de cobre (CuSO_4) se adicionaron para completar la mezcla. El microbalón se colocó en el digestor y se llevó a ebullición, hasta adquirir un color verdoso, una vez alcanzado este punto se continuó la ebullición durante 30 minutos, se dejó enfriar y se prosiguió con la destilación.

Destilación

Una vez que la mezcla estuvo fría, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se mezcló (es conveniente utilizar un baño de hielo). El contenido fue vertido en el microdestilador y se añadieron lentamente 15 mL de hidróxido de sodio al 50%. La destilación se mantuvo hasta recolectar 25 mL de destilado en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, el cual contenía 5 mL de ácido bórico al 4% y 4 gotas de indicador. El destilado fue aforado a un volumen de 50 mL con agua destilada y titulado hasta el vire con una solución de ácido clorhídrico 0.02 N.

El contenido de nitrógeno fue calculado empleando la siguiente ecuación:

$$\%N = (a - b) \left(\frac{0.28 * 100}{m} \right) \quad \dots B1$$

donde:

a: Volumen (mL) de HCl 0.02 N consumidos en la muestra digerida

b: Volumen (mL) de HCl 0.02 N consumidos para el blanco

m: Peso (mg) de la muestra para la microdigestión de nitrógeno

100 = Factor para llevar a porcentaje

0.28 = Miligramos de nitrógeno por cada 100 mL.

Anexo C

☑ Determinación de fósforo

Para este análisis se empleó un gramo de turba finamente molida, el cual se colocó en un crisol con 5 mL de nitrato de magnesio 1N ($Mg(NO_3)$). La mezcla se quemó bajo la flama de un mechero de Bunsen hasta que no se observaron vapores. Posteriormente la muestra se calcinó a 500 °C durante 36 hrs. Las cenizas fueron disueltas en 10 mL de ácido clorhídrico 6 N y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Alícuotas de 2 mL de ésta solución se utilizaron para realizar el análisis que se describe a continuación: se agregaron 3 mL de agua destilada, 2 mL de molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$), 1 mL de la solución diluida de cloruro estanoso y se mezcló mediante un agitador vórtex; posteriormente las muestras fueron dejadas en reposo durante 6 minutos y se leyó absorbancia en el espectrofotómetro (Espectronic 20) a una longitud de onda de 660 nm. (Manual de operación de laboratorio. Planta industrializadora de desechos sólidos, 1986)

Para la interpretación de las lecturas fue necesario realizar una curva de calibración, esta se realizó de la siguiente manera:

Curva estándar para la determinación de fósforo

Nº Tubo	Solución Diluida de fósforo (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración (ppm)
1	0.2	4.8	0.2
2	0.4	4.6	0.4
3	0.6	4.4	0.6
4	0.8	4.2	0.8
5	1	4	1

A todos los tubos, se les agregó 2 mL de solución extractora, 2 mL de molibdato de amonio y un mL de solución diluida de cloruro estanoso. Posteriormente los datos de absorbancia se grafican contra la concentración para obtener la curva estándar.

La cuantificación de fósforo se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$ppmP = (A * D * L) \quad \dots C1$$

donde:

A: ppm de fósforo en la solución (las cuales se encontraron extrapolando en la curva estándar)

D: mL de solución extractante (para el caso de del problema fue HCl 6 N)

L: mL totales de la dilución a la que se llegó

Anexo D

 Estudio del contenido de potasio

Para dicha cuantificación se emplearon, 10 g de turba tamizada. Los cuales se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de acetato de amonio 1 N ($\text{CH}_3\text{COO-NH}_4^+$). La mezcla se agitó durante media hora. Una tercera parte se filtró en papel Whatman N° 1. Después se adicionaron 30 mL de acetato de amonio a la solución restante, agitándose 20 min. Posteriormente se filtro la mitad y se agregaron 20 mL de acetato de amonio para filtrar completamente.

Para conocer la cantidad preliminar de potasio, se usó de la siguiente ecuación:

$$ppmK = (F * L) \quad \dots D1$$

donde:

F: Factor o múltiplo conocido

L: Lectura en el galvanómetro medidor para la muestra problema

La concentración de potasio en turba se determinó con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg de K}}{100 \text{ gramos de suelo}} = \left(\frac{A * V * 100}{1000 * C} \right) \quad \dots D2$$

donde:

A= Cantidad de K_2O (lectura x múltiplo)

V= Volumen tomado de la extracción para el análisis (mL)

C= Peso del suelo tomado para preparar la extracción (g)

100 = Factor de conversión a 100 g de suelo

1000 = Factor de conversión a 1 mL de extracción.

Anexo E

Determinación de proteína (método de Lowry)

El volumen analizado fue de 1 mL. La muestra se colocó en un tubo de ensaye y se le agregó 1 mL de NaOH 1 N, se tapó y se colocó en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se usó hielo para detener la reacción. Una vez fría la muestra, se agregaron 5 mL de una solución compuesta por:

- 50 mL de solución A: 20 g de carbonato de sodio en 1000 mL de NaOH 0.1 N.
- 1 mL de solución B: 2 g de tartarato de sodio y potasio en 100 mL de agua destilada.
- 1 mL de solución C: 1 g de sulfato de cobre en 100 mL de agua destilada.

La nueva mezcla fue agitada en el vórtex y se dejó reposar en la obscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó un mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua destilada, se agitó y se dejó reposar en la oscuridad 30 minutos finalmente se midió la absorbancia a 750 nm.

Anexo F

 Ficha de identificación de microorganismos

El formato siguiente enumera las características comúnmente observadas en las colonias, útiles para la identificación bacteriana preliminar:

- Número de la cepa:

- Medio de cultivo empleado:

- OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS (Crecimiento en cajas Petri):

- Diámetro de la colonia

Forma:

Elevación:

Color:

Tamaño:

Borde:

Edad:

Opacidad:

Olor (eventualmente):

- OBSERVACIONES AL ESTEREOSCOPIO: (Características de la superficie)

- OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

Tipo de microorganismo:

Tinción de GRAM:

Tipo de arreglo:

Tamaño del microorganismo:

Movilidad y características del o del los flagelo (s):

- PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE APOYO:

. Catalasa :

. Oxidasa :

. Tipo de metabolismo:

- COMENTARIOS:

- PREVIA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA:

Como observación, la forma de describir las características más importantes es de la siguiente manera:

TAMAÑO: diámetro en mm.

FORMA: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.

ELEVACIÓN: plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme, umbilicada.

BORDE: entero, ondulado, lobulado, aserrado, filamentoso, rizado.

COLOR: blanco, amarillo, negro, naranja, etc.

SUPERFICIE: brillante, mate.

OPACIDAD: opaca, translúcida, transparente, etc.

CONSISTENCIA: butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza, etc.

Anexo G

Tinción de Gram

Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire. El centro de la colonia a estudiar se tomó con el extremo de un alambre recto, esta se mezcló con una gota de agua o solución fisiológica y se extendió sobre un portaobjeto a fin de dispersar los microorganismos. El material biológico debe de ser fijado al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjetos 3 o 4 veces por la llama de un mechero Bunsen.

El preparado se colocó sobre un soporte de tinción y se cubrió la superficie con solución de cristal violeta. Luego de un minuto de exposición al colorante, se lavó bien con agua destilada y se cubrió el preparado con yodo de Gram durante un minuto, se lavó nuevamente con agua. Se sostiene el portaobjeto entre el pulgar y el índice y se baña la superficie con unas gotas del decolorante acetona-alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta. Después de lavar con agua corriente la superficie fue cubierta con safranina durante un minuto, para después lavar con agua.

Para terminar se colocó el preparado en posición vertical, dejando que escurra el exceso de agua y que el extendido seque. El preparado se examinó con un microscopio modelo Optiphot-2 de Nikon, empleando un objetivo 100 X con aceite de inmersión. Otras características útiles para la identificación preliminar de las bacterias aisladas comprenden: el tamaño y la forma de las células bacterianas, así como la disposición de las mismas y la presencia de estructuras específicas u organelos.

Debe tenerse cuidado con los extendidos coloreados con la técnica de Gram, ya que las reacciones de tinción pueden ser variables, en particular con colonias muy jóvenes o más viejas. Así mismo, la formación de grupos y cadenas de cocos Gram positivos puede ser menos pronunciada en colonias tomadas de una superficie de agar que en extendidos provenientes de cultivos en medio líquido.

Para evitar cualquiera de estos problemas se realizaron los extendidos de cultivos desarrollados tanto en placa como en caldo nutritivo con un tiempo de incubación de 24 horas.

Anexo H

 Prueba de glucosa (Oxidación-Fermentación)

Tabla 2.3 Datos para la comparación de resultados en la prueba de glucosa (Koneman y col., 1989)

Reacción	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo cubierto o sellado
Oxidación (O)	Abierto	Amarillo	Verde
Fermentación (F) anaerogénica	Cubierto	Amarillo	Amarillo
Fermentación (F) anaerogénica	Cubierto	Amarillo (G)	Amarillo (G)
Ni fermentación (F) Ni Oxidación (O)	Ninguno	Azul o Verde	Verde
Fermentación (F) y Oxidación (O)	Ambos	Amarillo (G)	Amarillo (G)