



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Caracterización de bioaerosoles emitidos en
biofiltros durante el tratamiento de COV’s por
citometría de flujo”**

Tesis que presenta
Ana Betsabé Flores Barboza

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Ambientales

Director de Tesis:
Dra. Sonia Lorena Arriaga García

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de bioaerosoles emitidos en biofiltros durante el tratamiento de COV’s por citometría de flujo**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada **por Ana Betsabé Flores Barboza** y aprobada el día de mes de 2017 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Sonia Lorena Arriaga García
Director de la tesis

Dr. Aitor Aizpuru
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Guillermo Quijano Govantes
Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Sonia Lorena Arriaga García y bajo el apoyo del proyecto SEP-CONACYT-239622 concedido a la Dra. Sonia Arriaga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 591431 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Dedicatorias

Primeramente, a Dios que me ha acompañado y guiado siempre, por brindarme una familia unida llena de amor y por rodearme de personas maravillosas en cada aventura de mi vida.

A mis abuelos Ventura, Socorro, Fermín y Antonia gracias por darme una vida de hermosos recuerdos y sobre todo llena de amor. A la abuela Antonia en especial por siempre llevarme de su mano y jugar conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres por todo su amor, por los valores que me han inculcado, por siempre apoyarme e impulsarme a seguir mis sueños y principalmente por ser un excelente ejemplo de vida.

A Mague y Miguel por ser mis compañeros de vida y aventuras desde donde están.

A mis hermanas Ada y Alba por ser mis mejores amigas, por impulsarme a ser mejor profesional y personalmente y por siempre tener abrazos en momentos difíciles.

A mi hermano Misael por abrirme su corazón, por enseñarme que siempre se puede salir adelante, por ser el motor de mi familia y compañero de nuevos sueños.

A mis sobrinos Josafat Nahabi, Erick Jazael y Lucas Sebastián por ser mi impulso de vida, por llenar de risas, sueños y alegría mi vida.

Agradecimientos

A CONACYT por la beca académica otorgada para la realización de la tesis.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. y a la División de Ciencias Ambientales por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Muy especialmente a la Dra. Sonia Arriaga por dejarme ser parte de su grupo de investigación, por transmitirme la pasión, entusiasmo y alegría con la que realiza su trabajo. Por la confianza, el apoyo incondicional, los consejos, paciencia, tiempo y por todo el conocimiento transmitido que hicieron que este trabajo mejorara continuamente. Gracias por ser una excelente persona con una gran sencillez y calidad humana.

A las personas que me asesoraron en la realización de este trabajo: a la Dra. Esmeralda López, el Dr. Aitor Aizpuru y el Dr. Guillermo Quijano. Les agradezco el tiempo dedicado, los consejos, aportaciones y el conocimiento compartido.

Agradezco sinceramente a los todos los investigadores de la división que de manera directa o indirecta contribuyeron en mi formación académica, ya sea con clases, ideas o llamadas de atención.

De igual manera me gustaría agradecer la amabilidad, espíritu de servicio y compromiso de la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo, técnico de la división de Biología Molecular por el apoyo y las facilidades para la utilización del citómetro.

Doy gracias a los técnicos académicos M. en C. Dulce Partida Gutiérrez, M. C. Guillermo Vidriales Escobar, Mario Delgado Cardozo, M. C. Alejandra Colunga Álvarez y Q. F. B. Elizabeth Cortez Cedillo por su disposición y apoyo técnico recibido.

A la Dra. Elsa Marcela por ser una excelente persona, ser amable y dedicada. Por ser parte importante de mi formación, confiar en mí y alentarme a realizar el posgrado.

A mis compañeros y amigos de generación Andrea, Alejandra, Beatriz, Karen, Lupita, Mónica, Ángel, Antonio, Augusto, Francisco, Hugo, Javier y Ricardo por brindarme su amistad, tiempo, paciencia, por darnos ánimos hasta el final y sobre todo por las aventuras vividas.

A Blanca, Ale, José, Móni, Mau, Bety, Kasandra, Pancho, Angelito, Cruz, Miguel, Rafa, Pao, Faby, Hugo, Augusto, Mariana, Saúl, Ernesto, Silvia, Joel, Itzel, Nohemi, Deny, Chris, Laurita, Edson y Margarita, por hacer de mi paso por la maestría una experiencia única e inolvidable, pero sobre todo por brindarme una familia lejos de casa.

A mi demás familia que siempre me han apoyado en esta etapa lejos de casa. En especial a Jorge E., Martín, Guadalupe, Sismay, Carol, Refugio, Elena, Rosalba, Noé, Ventura, Deyanira, Pao y Sol.

A mis amigos de toda la vida Sonia, Cinthia, Edgar, Omar, Erik, Lucy, Abel, Sheila, Gustavo, Isidro, Elizabeth, Victoria, Damaris, Isabel, Blanca por ser parte esencial de mi vida y siempre alentarme a más.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iv
Acta de examen	v
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	vii
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. <i>Contaminación de aire</i>	3
2.2. <i>Compuestos Orgánicos Volátiles</i>	5
2.3. <i>Bioaerosoles</i>	6
2.3.1. Fuentes de bioaerosoles	13
2.3.2. Técnicas de caracterización y contabilización de bioaerosoles	14
2.3.2.1. Citometría de flujo y fluorocromos en el estudio de bioaerosoles	18
2.3.3. Tecnologías de control de bioaerosoles	19
2.4. <i>Tratamiento de contaminantes atmosféricos</i>	20
2.4.1. Biofiltros	21
2.5. <i>Emisión de bioaerosoles en la biofiltración</i>	24
3. Justificación	28
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29
5.1. <i>Objetivo general</i>	29
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	29

6. Material y proceso metodológico	30
6.1. <i>COVs Modelo</i>	30
6.1.1. Tolueno (T)	30
6.1.2. Acetato de etilo (AE)	30
6.2. <i>Material de soporte</i>	31
6.3. <i>Biomasa</i>	32
6.4. <i>Muestreadores</i>	32
6.5. <i>Fluorocromos</i>	33
6.6. <i>Sistema de biofiltración</i>	34
6.7. <i>Estrategia experimental</i>	35
6.8. <i>Técnicas analíticas</i>	36
6.8.1. Medición de contaminantes en la fase gaseosa	36
6.8.2. Análisis del lixiviado	37
6.8.3. Determinación de bioaerosoles	37
6.8.4. Análisis de la fase solida de empaque	40
6.9. <i>Desempeño del biofiltro</i>	40
7. Resultados y Discusión	42
7.1. <i>Caracterización del soporte</i>	43
7.2. <i>Desempeño del biofiltro</i>	44
7.2.1. Eficiencia de remoción y capacidad de eliminación del Sistema de biofiltración	44
7.2.2. pH y TOC en Lixiviados	51
7.2.3. SSV en el soporte y Caída de presión	52
7.2.4. Porcentaje de mineralización y Balance de carbono	55
7.3. <i>Bioaerosoles en biofiltros</i>	57
7.3.1. Caracterización de Bioaerosoles por Cultivo en placa	57
7.3.2. Caracterización de Bioaerosoles por Citometría de flujo	59
7.3.2.1. Validación de la técnica de citometría de flujo	59
7.3.2.2. Resultados de bioaerosoles obtenidos por citometría de flujo	62
7.3.2.3. Estudio del efecto del almacenaje en la prueba	68
8. Conclusiones	69
9. Perspectivas	70
10. Bibliografía	71

Lista de tablas

Tabla 1. COVs emitidos en procesos naturales y antropogénicos.	6
Tabla 2. Concentración de bacterias por fuentes antropogénicas.	13
Tabla 3. Características y componentes celulares detectables con CMF.	17
Tabla 4. Características de principales fluorocromos utilizados.	18
Tabla 5. Estudios previos de emisión de bioaerosoles en sistemas de biofiltración.	25
Tabla 6. Composición de la solución buffer fosfato salina.	33
Tabla 7. Etapas de operación del biofiltro.	35
Tabla 8. Caracterización de la perlita.	43
Tabla 9. Balance de carbono.	57
Tabla 10. Preservación de viabilidad por almacenaje.	68

Lista de figuras

Ilustración 1. Tamaño de los bioaerosoles según su clasificación.	7
Ilustración 2. Técnicas dependientes e independientes de cultivo para la identificación de microorganismos.	14
Ilustración 3. Componentes generales de un biofiltro.	21
Ilustración 4. Conexión del impinger AGI 30.	32
Ilustración 5. Bulbo muestreador de gas.	33
Ilustración 6. Sistema de biofiltración.	35
Ilustración 7. Regiones separadas por fluorocromos en citometría.	39
Ilustración 8. Sistemas de biofiltración en laboratorio.	42
Ilustración 9. Eficiencia de remoción y Capacidad de eliminación del biofiltro.	45
Ilustración 10. Estructura molecular del Acetato de etilo y Tolueno.	47
Ilustración 11. Eficiencia de remoción de alimentación total separada por módulos.	50
Ilustración 12. Carbono orgánico total y pH en lixiviados	51
Ilustración 13. Caída de presión y SSV por módulos.	54
Ilustración 14. Porcentaje de mineralización de carbono.	56
Ilustración 15. Bioaerosoles por cultivo en placa.	58
Ilustración 16. Imágenes obtenidas en CMF.	61
Ilustración 17. Cuantificación de Bioaerosoles por citometría de flujo en biofiltro y control, entradas y salidas.	62
Ilustración 18. Células vivas, muertas y comprometidas en la corriente a la entrada del biofiltro.	64
Ilustración 19. Células vivas, muertas y comprometidas en la corriente a la salida del biofiltro.	66

Abreviaturas

UFC	Unidades Formadoras de Colonias
TO	Naranja de Tiazol
PI	Yoduro de Propidio
COV	Compuesto Orgánico Volátil
COVs	Compuestos Orgánicos Volátiles
CMF	Citometría de Flujo
AE	Acetato de Etilo
T	Tolueno
CE	Capacidad de Eliminación
ER	Eficiencia de Remoción
ΔP	Caída de Presión
OMS	Organización Mundial de la Salud
PM	Material Particulado
CO₂	Dióxido de carbono
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
ONU	Organización de las Naciones Unidas
TOC	Carbono Orgánico Total

Resumen

Caracterización de bioaerosoles emitidos en biofiltros durante el tratamiento de COV's por citometría de flujo

Se monitoreó y evaluó un sistema de biofiltración alimentado con vapores de acetato de etilo y tolueno por 180 días. Durante este periodo se estudiaron los efectos de la variación de carga y paros de alimentación de un contaminante sobre la capacidad de eliminación y la emisión de bioaerosoles. A la par, se montó un sistema control alimentado únicamente con aire del compresor y empacado con perlita sin inocular y sin alimentación de contaminantes. Se obtuvieron muestras de bioaerosoles a la entrada y salida de ambos sistemas con un muestreador Impinger AGI-30. Los bioaerosoles se caracterizaron por conteo en placa y por citometría de flujo (CMF) con dos fluorocromos: Naranja de Tioazol (TO) y Yoduro de Propidio (PI) que tiñen células vivas y muertas respectivamente, obteniendo separación por viabilidad y conteo celular.

En la segunda etapa del proceso de biofiltración de acetato de etilo y tolueno, se alimentaron $108 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ de contaminantes presentando, una eficiencia de remoción de acetato de etilo de $\sim 100\%$ y de tolueno de $\sim 80\%$. Durante esta etapa, la concentración de bioaerosoles medida por citometría de flujo mostró un máximo de emisión de 1.2×10^7 células/ m^3 comparado con 1.8×10^3 UFC/ m^3 obtenida por conteo en placa, indicando una diferencia de 4 órdenes de magnitud.

Conforme avanzó el tiempo de operación, aumentó el número de UFC contabilizado por cultivo en placa y en la mayoría de los casos la salida presentó mayores concentraciones que la entrada, comprobando que el sistema emite más bioaerosoles cultivables en comparación de los que hay en el aire de entrada. En CMF no se observó una relación entre el tiempo transcurrido y la concentración de bioaerosoles, la mayor emisión se registró al momento de aumentar la carga de 54 a $108 \text{ g m}^{-3} \text{ h}$. La concentración de bioaerosoles fue disminuyendo lentamente

conforme se alcanzó la estabilidad del biofiltro y en los periodos donde se tenía una alta remoción de contaminantes.

Se comprobó la capacidad del biofiltro control como un sistema que retiene bioaerosoles, la concentración de bioaerosoles disminuyó en las tres primeras etapas de 2×10^3 a 3×10^2 UFC/m³ en el biofiltro control, cuando se contabilizó por conteo en placa. Por CMF se observó una disminución en la concentración en las dos primeras etapas siendo más notoria en la etapa 2 al día 62 de operación, de 7×10^6 a 3.5×10^6 células/m³.

En conclusión, se demostró que el sistema de biofiltración puede ser una fuente de emisión o retención de bioaerosoles, dependiendo de las condiciones de operación y características del aire. La CMF mostró ser una técnica adecuada y muy prometedora que permite el estudio de bioaerosoles no solo en biofiltros, sino que se puede usar en cualquier ambiente en el que se quiera estudiar la carga de microorganismos.

Abstract

Characterization of bioaerosol emissions from a biofilter during treatment of VOCs using flow cytometry

A biofiltration system fed with ethyl acetate and toluene vapors was monitored and evaluated. During this period, the effects of load and shutdown of a contaminant on the elimination capacity and emission of bioaerosols were studied. At the same time, a control system was installed, fed only with air from the compressor and packed with perlite without inoculating and without contaminants. Samples of bioaerosols were obtained at the entrance and exit of both systems with an Impinger AGI-30. The bioaerosols were characterized using Petri dishes and flow cytometry (CMF) with two fluorochromes: Thioazole Orange (TO) and Propidium Iodide (PI) that stain living and dead cells respectively, obtaining separation by viability and cell count.

The second stage of the biofiltration process showing removal efficiency of ~ 100 and ~ 80% for ethyl acetate and toluene respectively and the maximum concentration emitted from bioaerosol was 1.2×10^7 cells/m³ using flow cytometry whit respect to 1.8×10^3 CFU/m³ obtained by plate count, indicating a difference of 4 orders of magnitude.

As the operating time increased, the number of CFUs recorded using plate culture increased and in most cases the output had higher concentrations than the entrance, proving that the system emits more bioaerosols compared to those in the air of entry.

The capacity of the control biofilter was checked as a system that retains bioaerosols, the concentration of bioaerosols decreased in the first three stages from 2×10^3 to 3×10^2 CFU/m³ in the control biofilter using plate count. Using CMF, a decrease in concentration was observed in the first two stages.

In conclusion, it was demonstrated that the biofiltration system can be a source of emission or retention of bioaerosols, depending on the operating conditions and characteristics of the air. The CMF showed to be a suitable and very promising

technique that allows the study of bioaerosols not only in biofilters, but it can be used in any environment.

KEY WORDS. Bioaerosol, Flow Cytometry, Fluorochrome, Ethyl acetate, Toluene, Biofilter.

1. Introducción

La contaminación del aire es un problema evidente que cada día toma más importancia, aumentando junto con nuestra población y con los riesgos que representa para todo el ecosistema que se encuentra inevitablemente en contacto con contaminantes, entre los que destacan: gases de efecto invernadero, compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles, material particulado (PM) y material particulado biológico.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) se presentan en grandes concentraciones en aire de interiores de diversas industrias, afectando la calidad del mismo y por lo tanto la salud de los trabajadores y al ser liberados también perturban el exterior. Actualmente se han buscado diversas alternativas para frenar la emisión de contaminantes provenientes de industrias, siendo los tratamientos biológicos una opción prometedora para remplazar los procesos de purificación fisicoquímicos usados actualmente, debido a su menor costo y menor impacto ambiental. Un biofiltro consiste en hacer pasar el aire contaminado por un material poroso al que se le adhieren microorganismos encargados de metabolizar el contaminante a productos inocuos como CO₂ y agua en su modelo ideal.

Estudios recientes han demostrado que los biofiltros en diversas condiciones de operación despiden una gran cantidad de bioaerosoles, definiéndose estos como partículas sólidas o líquidas de origen biológico suspendidas en un medio gaseoso, ya sea células completas, fragmentos o productos metabólicos, que pueden estar vivos (viables) o muertos (no viables) ^{1,2}. Existen muy pocos reportes que caractericen y cuantifiquen los bioaerosoles emitidos por los sistemas de biofiltración y en todos se han utilizado métodos dependientes de cultivo. Sin embargo, esta técnica presenta un gran problema ya que subestima la cantidad de bioaerosoles reales en el aire, pues se sabe que solo el 1% de bacterias y el 17% de hongos conocidos se pueden cultivar en placa ^{3,4}.

El estudio de bioaerosoles es de gran interés debido a los daños a la salud que provocan, como enfermedades infecciosas, respiratorias y hasta cáncer. Además, es importante resaltar que no solo el material particulado viable puede ocasionar

daños, sino también las partículas no viables, pudiendo tener efectos aún más dañinos. Las micotoxinas, endotoxinas y exotoxinas, por ejemplo, son fragmentos celulares no viables muy tóxicos, causantes de enfermedades que pueden colapsar el sistema inmunológico, respiratorio y la síntesis de proteínas, hasta causar la muerte.

En esta tesis se plantea el objetivo de estandarizar la técnica de citometría de flujo (CMF) como una alternativa a los cultivos en placa, permitiendo caracterizar y contabilizar los bioaerosoles salientes de un biofiltro de una manera más rápida, efectiva y precisa sobre las concentraciones reales en el aire, sin discriminar todas aquellas partículas que no son cultivables o viables.

2. Marco teórico

2.1. Contaminación de aire

Se considera contaminación atmosférica a cualquier agente físico, químico o biológico ajeno o excesivo a su composición o permanencia que pone en riesgo la salud o el bienestar de la población, de la vida animal o vegetal y/o causa perjuicio a los bienes o cambios de clima ⁵. Para que un compuesto o sustancia se considere contaminante se deben tomar en cuenta los siguientes puntos:

- La sustancia es ajena al ambiente
- Concentración
- Excede un tiempo de permanencia
- Interfiere en el confort, salud, bienestar, disfrute de los bienes de las personas, etc.

Son muchas y diferentes sustancias químicas vertidas a la atmósfera que de acuerdo a las condiciones anteriores se consideran contaminantes, por lo que se ha vuelto imposible estudiar cada una de ellas de manera individual, debido a esto se han hecho algunas clasificaciones de los contaminantes en la atmósfera como se muestra a continuación ⁵:

- Según su fuente: Natural o antropogénica
- Por su origen: Primarios; se incorporan al ambiente directamente de la fuente o focos identificables. Secundarios; formados a partir de la reacción entre los contaminantes primarios y/o elementos ambientales ⁶.
- Por su estado físico: Sólidos, líquidos y gaseosos. Los contaminantes sólidos y líquidos se pueden encontrar en forma de partículas y más concretamente en aerosoles.
- Por su naturaleza: Contaminantes físicos, químicos y biológicos.
Físicos: Son manifestaciones energéticas en el medio ambiente.
Químicos: Son compuestos químicos específicos.
Biológicos: Seres vivos o restos de ellos.
- Por su frecuencia: Contaminantes continuos y discontinuos.

- Por su concentración: Contaminantes mayoritarios y trazas.

La contaminación del aire se presenta mayormente en zonas urbanas por la quema de combustibles fósiles o de biomasa en actividades antropogénicas, como las industrias, calefacciones y el transporte. Se evalúa bajo parámetros convencionales identificados como contaminantes criterio: partículas, gases, metales y contaminantes secundarios formados en el aire ⁷, siendo el primero el más estudiado y al cual se le atribuye el aumento de la mortalidad por contaminación ⁸.

Actualmente existen diversos convenios a nivel mundial encargados de que los países disminuyan las emisiones de contaminantes ⁹. Según la OMS se calcula que alrededor de 7 millones de personas mueren por año a causa de la contaminación atmosférica, siendo un gran problema principalmente en países en desarrollo, y desarrollados en menor medida. En cuanto a México la contaminación en el aire no está del todo controlada o regulada, las Normas Oficiales Mexicanas son más permisivas que las de la OMS y existen muy pocos inventarios de calidad de aire en México ^{10,11}.

De manera global se ha encontrado que los habitantes en lugares donde hay una alta contaminación presentan mayores problemas cardíacos, respiratorios y cáncer de pulmón que personas que viven en lugares donde el aire es más limpio ¹⁰. De aquí deriva la importancia de disminuir la contaminación y controlar las emisiones de contaminantes, como material particulado, ozono, dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre ¹⁰, compuestos orgánicos volátiles, compuestos inorgánicos volátiles y bioaerosoles, que son los principales contaminantes que desencadenan problemas al medio ambiente y a la salud humana. Dentro de los factores que afectan la concentración de contaminantes en el aire, se encuentran variables climáticas como la temperatura la cual afecta la producción y dispersión de estos, encontrando que a mayor temperatura en el ambiente más deteriorada esta la calidad del aire ⁸.

2.2. Compuestos Orgánicos Volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) como su nombre lo dice son compuestos que tienen en su estructura principalmente carbono orgánico y se convierten fácilmente en vapores o gases, a 20°C tienen una presión de vapor igual o superior a 0.01 kPas ¹², y menor de 101.3 kPa, suelen contener otros elementos como oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno. Se colocan como el segundo tipo de contaminantes más extenso y diverso después del material particulado en el aire ¹³.

Son liberados por el humano principalmente por la quema de combustibles, siendo los hidrocarburos las especies con mayor presencia dentro de estos ⁶, también son liberados en actividades industriales de disolventes, pinturas, pegamentos, muebles, imprentas, entre otros y en interiores de edificios igualmente se encuentran importantes fuentes de COVs como productos de limpieza, cosméticos, plásticos y pinturas.

Además de las actividades humanas, los fenómenos naturales y las diversas formas de vida liberan estos contaminantes. Algunos de estos COVs son: hidrocarburos alifáticos y aromáticos, especies oxigenadas; cetonas, aldehídos, alcoholes, ácidos, etc. En la Tabla 1, se especifican cada uno de los COVs liberados en los diversos procesos.

Los COVs son precursores de ozono troposférico y destructores del ozono estratosférico, al unirse los COVs y NOx y en presencia de la luz solar, dan lugar a concentraciones elevadas de ozono en el aire que respiramos ¹³.

Tabla 1. COVs emitidos en procesos naturales y antropogénicos ^{6,14}.

NATURALES	DERIVADOS DE ACTIVIDADES HUMANAS
EMISIONES DE VEGETACION	Hidrocarburos
Isopropeno Monoterpenos Pinenos Mirceno Limoneno (tiempo de vida corto) Sesquiterpenos Acetaldehído 2-metil-3-butenol Metanol Etanol Ácido fórmico Ácido acético Acetona Etileno	Benceno Xileno Hexano Estireno Tolueno Nitrobenceno Clorobenceno Anilina Butano Cloruro de vinilo Dicloroetano Isopreno Etano
	Aldehídos
	Acetaldehído Formaldehido
	Clorados
EMISIONES DE OCÉANOS	Tricloroetileno Percloroetileno
Etano Propano Etileno Propileno	Alcoholes
	Metanol Etílico Ispopropílico
EMISIONES DE FUMAROLAS	Cetonas
Metil- (2)butano, (3)pentano, (3)hexano, (3)heptano Normal- pentano, hexano, heptano (2,5)Dimethylhexane Bencenos Tolueno Etilbenceno Xileno Estireno Hexanol Fenol	Metiletilcetona Acetona
	Esteres
	Acetato de metilo Acetato de etilo
	Otros
	Etilenglicol Propano Acetileno Ácido fórmico Ácido acético

2.3. Bioaerosoles

Tanto en procesos naturales como en antropogénicos también se emite material particulado de origen biológico, el cual se define como partículas sólidas o líquidas de origen biológico aerotransportables que contienen células vivas, muertas, toxinas, fragmentos o productos cuyo origen es biológico, de un tamaño aproximadamente de entre 0.01 y 100 μm ¹⁵, en este intervalo están incluidos virus, bacterias, esporas, hongos, polen, insectos, restos y productos celulares de tamaño molecular (Ilustración 1) ¹⁶.

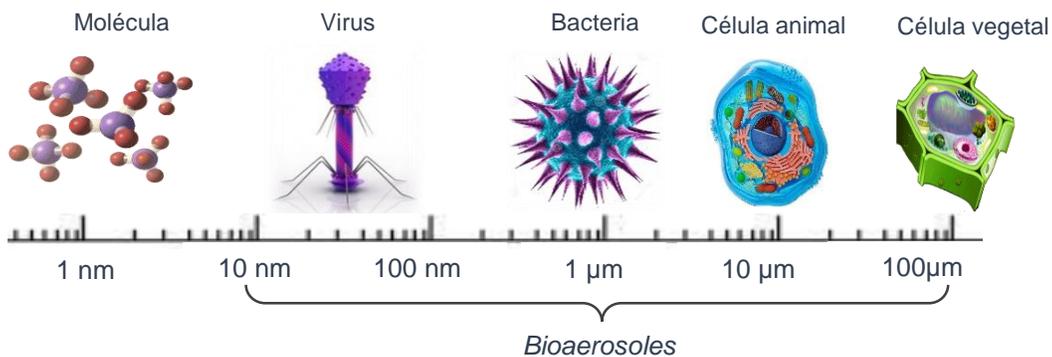


Ilustración 1. Tamaño de los bioaerosoles según su clasificación.

El material particulado biológico contribuye con un 30% del PM¹⁷ siendo un factor clave ya que es el responsable de enfermedades e infecciones atribuidas a la contaminación⁷. Es liberado de manera natural en mayor porcentaje: por la flora, el suelo y los cuerpos de agua y en menores cantidades por las actividades humanas¹⁶ aunque cabe resaltar que al ir aumentando la población este porcentaje crece. Por ejemplo, al presentarse la necesidad de llevar a cabo tratamiento de aguas y de residuos, se incrementa la concentración de material particulado biológico en el ambiente ya que son fuentes importantes de emisión^{1,18,19}.

La contaminación por material particulado biológico o bioaerosoles tiene lugar cuando las partículas se establecen en un ecosistema y cambian sus propiedades, afectando el equilibrio y bienestar de la población. Anteriormente se creía que los microorganismos se encuentran en el aire de manera accidental y que el aire solo era un medio de transporte y dispersión de bioaerosoles, pero ahora se sabe que son capaces de sobrevivir en él ya que se adaptan a un alimento variado y a las condiciones favorables como las que hay en el aire: humedad, intensidad lumínica, la concentración de CO₂ y oxígeno entre otros, que determinaran no solo su presencia sino también su comportamiento, viabilidad y estabilidad^{1,7}. La supervivencia de los microorganismos es muy variable y dependerá de factores climáticos y de la diversidad estructural y metabólica de la célula. Por ejemplo, de manera general los hongos y virus son más resistentes a la desactivación que las bacterias, las bacterias Gram Positivas son más resistentes que las Gram Negativas

debido a que su pared celular es más gruesa, algunas especies de *Bacillus* y *Clostridium* son capaces de sobrevivir por más de un siglo en aire seco, *Mycobacterium* un mes y *Salmonella* solo unos minutos ^{20, 21}.

Un promedio de las concentraciones globales de bioaerosoles en el aire ambiente de exteriores se encuentra entre 10^3 y 10^5 UFC/m³ ^{22, 23}, estas varían a lo largo del año, por las características ambientales en las que se encuentra el ecosistema y los seres vivos que lo habitan¹⁷. En tiempos de polinización las concentraciones se elevan y los factores meteorológicos juegan un papel muy importante siendo afectada directamente por el cambio climático que es consecuencia de la contaminación atmosférica, el incremento en las concentraciones de CO₂ por ejemplo pueden influenciar la producción de polen ⁸. En varios estudios se ha encontrado la más alta concentración de bacterias en el aire ambiente en temporada de verano y la más baja en invierno ²⁴. Entre los microorganismos más encontrados en el aire se encuentran bacterias *Bacillus*, *E. coli* y *Pseudomonas* y hongos como *Aspergillus* ²⁰. No se conocen las concentraciones a las cuales los bioaerosoles se convierten en tóxicos o sobrepasan la tolerancia para los seres vivos, pero el Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional y de Salud (NIOSH) establece como un máximo límite recomendado de 1000 UFC/m³ y un total de bacterias de 500 UFC/m³ ¹⁵, siendo relevante la concentración pero aún más importante es la identidad ya que de esto dependerá el problema que pueden desencadenar.

Los bioaerosoles pueden clasificarse de acuerdo a los impactos causados en la salud como: 1) Agentes infecciosos, 2) Antígenos y 3) Toxinas. Otra manera de clasificarlos es según el estado en el que se encuentren basándonos en la viabilidad:

- a) Viables: Estas son células que se encuentran vivas, por lo que se entiende tienen un metabolismo activo, crecen y son capaces de reproducirse.
- b) No viables: Pueden ser células que se encuentran muertas o son solo fragmentos o productos metabólicos de estas.

Cuando las bacterias en el aire se someten a estrés por falta de nutrientes, agua y fluctuaciones de otros parámetros pueden liberar toxinas o subproductos de descomposición de igual o mayor impacto en el ecosistema ²².

BIOAEROSOLES VIABLES

❖ Bacterias

Son organismos microscópicos unicelulares procariotas con tamaño promedio de entre 0.2 y 3 μm pudiendo llegar algunas hasta 10 μm ^{25, 17} a pesar de su sencilla organización celular cuentan con una pared celular (más compleja, Gram positivas G+) y membrana externa (Gram negativas G-) que les provee de rigidez y protección. Es posible observarlas a simple vista cuando se agrupan formando colonias, se encuentran prácticamente en todos los hábitats por su incontable diversidad y adaptabilidad. Se clasifican según sus propiedades celulares, morfológicas o bioquímicas y por una técnica de tinción se separan en 2 grupos de acuerdo a las características de su pared celular en Gram positivas y Gram negativas y más recientemente por secuencias génicas.

En el aire se han encontrado infinidad de bacterias, no todas causan malestares en los seres humanos, pero hay bacterias específicas causantes de enfermedades graves y patógenas. Olaya et al. (2006) ⁷ identifica diferentes microorganismos en aire ambiente como; *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* principalmente. Estos patógenos son muy agresivos y peligrosos para la salud humana y se les relaciona con infecciones respiratorias, de piel, ojos y neumonías. Algunos géneros de bacterias G+ como *Bacillus* y *Clostridium* producen endosporas, se presentan cuando la bacteria se encuentra en condiciones no favorables que la someten a estrés como falta de nutrientes, humedad y temperaturas extremas, siendo una forma de preservación. Las esporas bacterianas tienen un tamaño entre 0.3 y 2 μm ^{26, 17}, se dispersan usando como medio de transporte el aire y pueden permanecer en el por largos periodos de tiempo (años), permitiendo que colonicen nuevos territorios y dañen la salud de los seres vivos que se encuentran en contacto con el aire, son muy resistentes a condiciones ambientales extremas y hasta procesos de desinfección.

Es importante mencionar que no todas las bacterias son perjudiciales para el ser humano, esto dependerá principalmente de la naturaleza del microorganismo y de las concentraciones en las que se encuentren, son parte de nuestro ecosistema y siempre estamos irremediablemente en contacto con ellas, pero no necesariamente en todos los casos perturban el bienestar de la población. Algunas de ellas desempeñan actividades esenciales de los procesos ecológicos o siendo más claro, por ejemplo, en el caso de las bacterias que se encuentran dentro de organismos más complejos que favorecen a los procesos de digestión o en casos de sinergias con plantas.

❖ Hongos

Son organismos eucariontes con un tamaño entre 10 y 50 μm , sus paredes celulares están compuestas por quitina, son oportunistas y prácticamente se pueden encontrar en cualquier ambiente. Las condiciones cálidas y húmedas favorecen su crecimiento, crecen en gran medida en interiores con estas condiciones causando diversos problemas de salud. Existen 2 grupos principales de hongos que son los mohos y las levaduras.

Los mohos forman parte de los hongos multicelulares filamentosos cuyo crecimiento se reconoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso y su reproducción es por medio de esporas con un tamaño de entre 1 y 20 μm las cuales se dispersan sobreviviendo desde días hasta meses en el ambiente y cuando encuentran condiciones favorables germinan y forman un micelio ²⁷.

Las levaduras son hongos que crecen generalmente por germinación en forma de agregados sueltos de células independientes, cuando crecen sobre un medio sólido forman colonias de aspecto característico parecido al de una colonia bacteriana.

De manera general los hongos pueden ser causantes de deterioros en materiales de construcción, alimentos, papel, obras de arte, actúan como parásitos de plantas y animales, pueden sintetizar gran variedad de tóxicos, provocando infecciones, alergias y alucinaciones.

BIOAEROSOLES NO VIABLES

Como se ha mencionado la viabilidad de las células o bioaerosoles no es un requisito para que causen un efecto adverso en el ecosistema ya que hay compuestos contenidos en los restos celulares o productos de la lisis celular que pueden originar reacciones alérgicas o efectos tóxicos. Ejemplos de esto son las toxinas con un tamaño de entre 2 y 50 nm ²⁸, las endotoxinas, micotoxinas y otros compuestos orgánicos volátiles microbianos ^{16, 15}.

❖ Micotoxinas

Son metabolitos secundarios tóxicos de composición variada liberados por los hongos que son utilizados como defensa a cambios ambientales y contra otros microorganismos. Producen efectos negativos en la salud de animales y humanos sin necesidad de estar presentes en altas concentraciones. Se desconoce aún el mecanismo de liberación de estas toxinas, pero se sabe que un mismo hongo al variar sus condiciones ambientales puede liberar micotoxinas diferentes ²⁹, entre las que se encuentran: Ocratoxina A, Zeralenona, Patulina, Tricotecenos Deoxivalenol, Fumonisinas, Aflatoxinas. Los hongos que las contienen infectan muchas de las veces los campos de cultivo ³⁰, estas toxinas son muy resistentes a la destrucción, cocción o congelación, por lo tanto, las personas los pueden ingerir por medio de plantas o animales que ya están infectados y por entornos colonizados por hongos quedando infectadas y siendo dañadas por los efectos que causan ^{31,29}.

Actualmente diversas organizaciones en varios países estudian la dinámica y concentraciones límites de micotoxinas.

❖ Endotoxinas

Es un lipopolisacárido (lípidos y azúcares), componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, se liberan al ambiente durante la muerte o lisis de las bacterias y en menor medida en su metabolismo normal. Son termoestables y se acumulan en el polvo, tanto en la superficie de los edificios como en el aire ^{32, 33} y pueden permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo (meses) dependiendo de las condiciones y peculiaridades del ambiente. Se han comprobado

los efectos adversos que generan estas endotoxinas como: fiebre, tos, dolor de cabeza, náuseas, irritaciones ³⁴.

❖ Exotoxinas

Son sustancias tóxicas secretadas extracelularmente por microorganismos (bacterias principalmente Gram positivas, hongos y algas) vivos, durante su crecimiento, son sensibles al calor y a anticuerpos, pero con un grado de toxicidad muy alto que con el solo hecho de estar en contacto con el hospedero pueden causar daños sin que el sistema inmune tenga oportunidad de actuar. Pueden provocar desde daños locales hasta afectar varios sistemas, dañando así las células. Entre las exotoxinas más conocidas se encuentran la causante del botulismo por *C. botulinum* productora de la toxina tetanospasmina, la difteria por *C. diphtheriae* que libera la toxina diftérica, tétanos causada por *C. tetani* productora de toxina tetanospasmina y cólera ³⁵.

❖ Virus

Son partículas submicroscópicas, no tienen metabolismo propio y no crecen en un medio de cultivo artificial, es por eso que se consideran no viables, se apoderan del metabolismo de células vivas (bacterias, hongos, plantas y animales) para poder replicarse y son causantes de un sin número de enfermedades víricas, el aire es el principal medio de transporte de estas moléculas. Como su estructura básica se componen de material genético ADN o ARN, cubierta proteica llamada cápside y una bicapa lipídica en algunos casos.

❖ Polen

Es polvo muy fino producido por las flores, contiene el gameto; célula reproductiva masculina de las flores, siendo necesaria para la fecundación de plantas para la formación a semillas. Está formada por materiales muy resistentes que permanecen inalterados por años ³⁶. El principal agente que transporta el polen es el viento siendo capaz de provocar alergias en humanos (polinosis) ³⁷.

2.3.1. Fuentes de bioaerosoles

Las emisiones de bioaerosoles al ambiente pueden ser por fuentes naturales que son muy difíciles de evitar y por fuentes antropogénicas que, si bien es difícil acabarlas, se pueden controlar.

De manera natural los animales y los humanos son una fuente importante de bioaerosoles, la piel de los humanos, animales, excremento, saliva, vegetación, el suelo, cuerpos de agua, materiales y alimentos contaminados pueden dispersar material particulado por medio del aire ³⁸, también son fuente importante de bacterias patógenas al estornudar, toser, durante la descamación de piel y cabello, y al defecar. Muestras tomadas en la Cd. de México revelan presencia de *Escherichia coli* en un 40% del material particulado en el aire, esta bacteria es indicadora de contaminación fecal ³⁹.

En menor medida los bioaerosoles son liberados por actividades antropogénicas en depósitos de basura, compostas, plantas de tratamiento de agua, campos agrícolas, hospitales, zonas muy transitadas y con aglomeración de personas. En contraste, en mayor medida es en la ganadería donde se emiten un 90% de bioaerosoles del total del material particulado en el aire ³⁸.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones que se reportan por el Instituto Nacional de Ecología en conjunto con la SEMARNAT en la Ciudad de México.

Tabla 2. Concentración de bacterias por fuentes antropogénicas ³⁹.

Lugar o sitio	Concentración (UFC/m ³)
Zona urbana	539 – 7.2 x10 ³
Calles transitadas	100 - 13 x 10 ³
Parques	100 – 2.5 x 10 ³
Estación de transferencia de basura	350 - 14 x 10 ³
Planta recicladora de basura	1.1 x 10 ³ – 2.8 x 10 ⁷
Planta de composteo	1 x 10 ³ - 11 x 10 ⁶
Planta de tratamiento de aguas residuales	1 x 10 ² - 2 x 10 ⁵
Zona rural	202 – 3.4 x 10 ³
Campo agrícola	46 - 6.5 x 10 ³
Empacadora de algodón	3.3 x 10 ⁶ - 19 x 10 ⁶

En México no existen normas que establezcan y regulen los límites de emisiones de bioaerosoles en industrias, plantas de tratamiento de residuos o agua. Países europeos y Estados Unidos se están enfocando en estudiar las emisiones de bioaerosoles en plantas de tratamiento, granjas y en actividades agrícolas por los riesgos que representan, pero no ha sido posible establecer límites permisibles o causantes de daño a la salud ² debido a que no existe una metodología estandarizada para el estudio de este material particulado biológico, tanto en recolección como en conteo.

2.3.2. Técnicas de caracterización y contabilización de bioaerosoles

En el aire es importante identificar y contabilizar los bioaerosoles para conocer la calidad del aire, así como lo que sucede con las células o derivados, sus interacciones y sobre todo los problemas que desencadenan. Muy frecuentemente la concentración de bioaerosoles se mide en unidades formadoras de colonias por metro cubico de aire succionado (UFC/m³) ⁷. Existen diversos métodos para llevar a cabo la cuantificación de bioaerosoles, como los mostrados en la Ilustración 2.

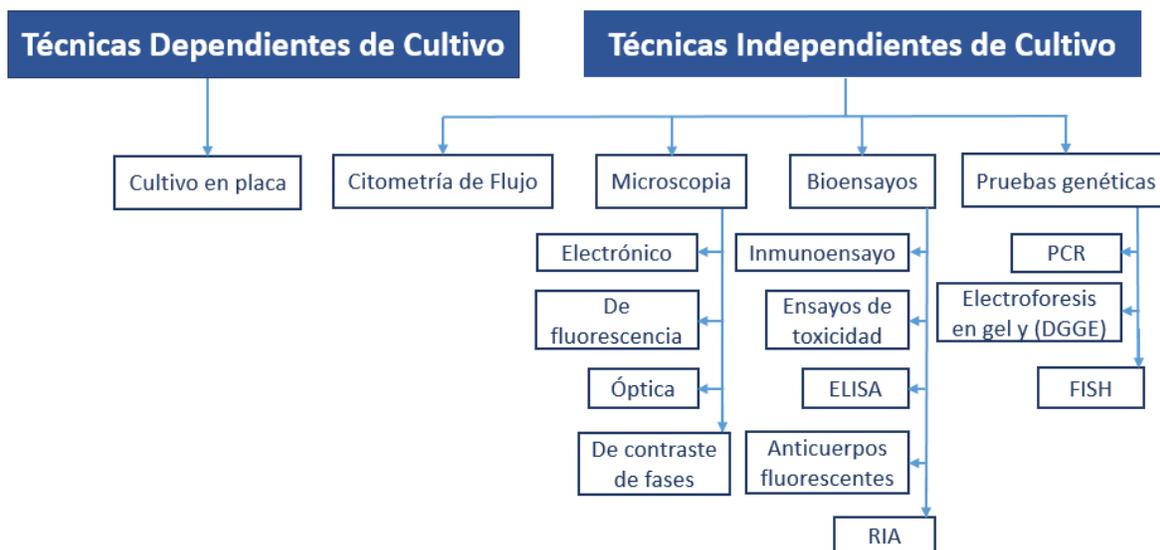


Ilustración 2. Técnicas dependientes e independientes de cultivo para la identificación de microorganismos ^{24,40}.

Las **técnicas dependientes de cultivo**, identifican microorganismos cultivables basándose en aislamientos y el análisis de sus propiedades metabólicas, expresándose como unidades formadoras de colonias después de una incubación adecuada.

Ventajas:

- Permite el estudio de fisiología, bioquímica para confirmar procesos ecológicos de campo.
- Permite evaluar o confirmar las hipótesis de estudios moleculares (por cada cepa).

Desventajas:

- Imposibilidad de llegar a tener una visión precisa de la biodiversidad de ecosistemas complejos.
- Solo se pueden cuantificar e identificar cerca de un 10% de los bioaerosoles presentes en el aire del ambiente ²⁴.
- Se interrumpen interacciones benéficas entre microorganismos.
- Falta de conocimiento sobre las condiciones de los microorganismos en sus hábitats naturales que impiden llevarlas al cultivo.
- Al utilizar los métodos de enriquecimiento y crecimiento en medios microbiológicos, la microbiota originalmente presente en la muestra es sometida a importantes cambios debido a la capacidad de ciertas especies para dominar el entorno y superar a los otros componentes microbianos por lo que las poblaciones numéricamente menos importantes, o en condiciones de estrés, apenas son recuperadas e identificadas.
- Hay un alto riesgo de simplificar y subestimar la ecología de los complejos ecosistemas microbianos.

Las **técnicas independientes de cultivo** se pueden a su vez separar en técnicas moleculares y microscópicas. Las primeras se enfocan en el estudio de la genómica y metagenómica con ayuda de técnicas moleculares, permitiendo comparaciones filogenéticas ⁴¹. Su novedad se basa en la identificación de componentes celulares directamente de las matrices analizadas.

Ventajas

- Mayor conocimiento de la diversidad microbiana.
- Permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución.
- Capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en el sistema sin cultivarlos ni aislarlos, ya que analizan la presencia de su DNA o RNA.
- Estudiando el DNA, es posible definir cuántas y cuáles son las especies microbianas presentes en una muestra específica, mientras que el estudio del RNA permite entender cuál es la parte metabólicamente activa de la población.

Desventajas

- Altos costos de equipo y reactivos.
- Se necesita preparar las muestras y tratarlas con debido cuidado.
- Inversión de un mayor tiempo y estudio.

Las técnicas microscópicas se basan en el estudio de microorganismos directamente de la muestra, haciendo lo microscópico observable para el ojo humano, facilitándolo por medio de contrastes y tinciones.

Ventajas

- Permite el conteo de toda la población celular.
- Permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución.
- Con tintes específicos se puede realizar una clasificación de viabilidad, morfología y separación celular más detallada.

Desventajas

- Se puede perder información si no se homogeneiza la muestra.
- Los tintes tienen que ser corroborados con pruebas previas.
- Equipos costosos.
- Analizador preparado que conozca técnicas y equipos.

Cualquier técnica puede ser de mucha utilidad y dependerá del objetivo de cada estudio para seleccionarla ya que aún no existe una metodología estandarizada para la identificación y cuantificación de manera efectiva de bioaerosoles que permita la comparación de resultados unificada.

Citometría de flujo (CMF)

Es una técnica analítica que hace pasar una cantidad de entre 4000 y 5000 células por segundo en fila dentro de un flujo a través de un aparato que hace la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Realiza mediciones cuantitativas como multiparamétricas en un número adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen ⁴². Utiliza la emisión de fluorescencia y la dispersión de luz y permite observar desde parámetros nucleares, de superficie, citoplasmáticos y extracelulares identificando la mayoría de las características o fragmentos celulares que pueden ser de nuestro interés (Tabla 3).

Tabla 3. Características y componentes celulares detectables con CMF ^{42,43}.

Características celulares	Componentes celulares
Tamaño	Contenido y bases de ADN
Granularidad del citoplasma	Contenido de ARN
Morfología celular	Proteínas (total)
Potencial de membrana	Lípidos
pH intracelular	Antígenos
Viabilidad	Actividad enzimática
Auto fluorescencia	Carbohidratos y receptores de la superficie
Estado redox intracelular	Contenido de PHB
Ciclo celular de poblaciones específicas	Calcio intracelular
Expresión de genes indicadores	Contenido de ergosterol
Densidad de superficie	Receptores nucleares
Pared celular	

La mayoría de las técnicas de citometría de flujo se basan en fluorescencia, funciona básicamente haciendo pasar la célula a través de un rayo de luz, se dispersa y las sustancias químicas fluorescentes que se encuentran adheridas a partes específicas de la célula son excitadas emitiendo una luz con longitud de onda mayor que la fuente de luz, esta luz es recogida e interpretada arrojando los datos

que se han propuesto. Se puede utilizar una amplia lista de fluoróforos para identificar los componentes de interés, cada uno tiene un pico de excitación y emisión con longitud de onda específica, entre los más utilizados se encuentran los mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de principales fluorocromos utilizados ⁴².

Fluorocromo	Nombre químico	Longitud de excitación (nm)	Longitud de emisión (nm)	Aplicación principal
BCECF-AM	2', 7'-bis- (2-carboxietil) -5- (y-6) carboxifluoresceína, éster de acetoximetilo	503	528 (pH 9.0)	pH intracelular
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	345	455	Ácidos nucleicos
DiOC6(3)	3,3'-dihexyloxacarbocianina	484	501	Potencial de membrana
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada; 238 aminoácidos	489	508	Productos intracelulares
FITC	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato	495	519	Detección de proteínas
Hoechst 33342	2'-(4'-etoxifenil)-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato	343	483	Ácidos nucleicos
Nile Red	9-dietilamino-5-benzo [α] fenoxazinona	540	610	Lípidos
PerCP	Peridinina-clorofila-complejo de proteínas; Ácido acético ester	490	675	Conjugado de anticuerpos
Ioduro de Propidio	Ioduro de Propidio	536	617	Ácidos nucleicos Viabilidad
R-Ficoeritrina	Proteína	480, 565	578	Conjugado de anticuerpos
SNARF-1 AM	5- (y-6) -carboxil SNARF-1, éster de acetoximetilo, acetato.	548	635	Potencial de membrana

2.3.2.1. Citometría de flujo y fluorocromos en el estudio de bioaerosoles

La CMF se presenta como una propuesta para el estudio de bioaerosoles, al inicio se creía que no era apta para la medición de concentraciones totales, pero recientemente el desarrollo de tinciones fluorescentes ha vuelto la técnica más precisa y capaz de mostrar datos de las características celulares o de la comunidad, como la viabilidad. Los resultados obtenidos por esta técnica se correlacionan con los resultados obtenidos con la microscopia de epifluorescencia y la qPCR en tiempo real ⁴⁴. Pei-Shih Chen and Chih-Shan Li combinan la CMF y 5 fluorocromos,

aranja de acridina (AO), SYTO-13, yoduro de propidio (PI), YOPRO-1 y cloruro de 5-ciano-2,3-ditolitetrozolio (CTC), utilizaron bioaerosoles modelo con microorganismos específicos de laboratorio, determinando así que SYTO-13 es el más adecuado para determinar concentración total y YOPRO-1 para determinar viabilidad ⁴⁵.

Al evaluar el rendimiento de muestreo de un impinger AGI-30 y un filtro de policarbonato, el primero mostró una retención de microorganismos mayor ⁴⁶. La viabilidad obtenida por la citometría de flujo fue entre 100 a 1000 veces mayor que la obtenida con el cultivo en placa ^{4, 47}.

2.3.3. Tecnologías de control de bioaerosoles

Con el fin de minimizar la concentración de bioaerosoles en el aire se han tomado varias medidas entre las cuales está la búsqueda de una técnica capaz de contabilizar los bioaerosoles totales, la eliminación de las fuentes emisoras, mantenimiento de equipos que pueden ser emisores, control de humedad en el ambiente, promover la ventilación natural, el uso eficiente de filtros y de desinfectantes para la purificación del aire.

Las tecnologías que actualmente se aplican en el tratamiento de bioaerosoles son:

- Filtración: Es una de las tecnologías más utilizadas por sus bajos costos, consiste en retener el material particulado biológico en fibras basándose en el tamaño de estas, se ha demostrado que pueden ser un problema debido a que en algunos casos los microorganismos retenidos pueden llegar a reproducirse y a liberarse en mayor cantidad ²⁴.
- Luz UV: Actualmente es la iniciativa más viable en industrias, oficinas, hospitales y laboratorios, es utilizada como un germicida a 254 nm demostrando ser muy eficiente.
- Oxidación fotocatalítica: En esta tecnología se hace reaccionar el dióxido de titanio con luz ultravioleta provocando la generación de radicales libres con poder oxidante, las especies reactivas con oxígeno son capaces de romper

o dañar células, funciones virales o estructuras provocando la inactivación de los organismos⁴⁸.

- Ozono: El ozono es utilizado como desinfectante principalmente en quirófanos, es liberado por medio de un generador de ozono y así oxida todo tipo de microorganismos patógenos.
- Agentes antimicrobianos: Son diversas sustancias que se aplican en superficies o se liberan en el aire interior para matar microorganismos o inhibir su crecimiento.

En la mayoría de los casos se combinan 2 o más tecnologías para aumentar de manera significativa la eficiencia en la eliminación de bioaerosoles.

Actualmente no solo se quiere eliminar los bioaerosoles liberados sino evitar su liberación, existen tecnologías de arquitectura (diseño) y construcción enfocadas en mejorar la calidad de aire en interiores llamada Indoor airPlus creado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) que ayuda a proteger a los habitantes de los contaminantes en el aire interior, auxiliando a prevenir problemas de salud causado por estos factores. Ofrecen control de la humedad, radón, plagas, sistema de calefacción, ventilación de combustión y materiales adecuados para los edificios.

2.4. Tratamiento de contaminantes atmosféricos

En la actualidad existen diversos tratamientos para eliminar contaminantes atmosféricos y medidas para evitar que sean liberados; fisicoquímicos y biológicos⁴⁹.

En este trabajo nos enfocamos en los tratamientos biológicos de COVs que son utilizados para flujos bajos y con bajas concentraciones de contaminante, son efectivos, económicos y se encuentran bajo investigación. En estos sistemas se hace pasar el aire contaminado a través de un medio o lecho para que la actividad de los microorganismos adheridos al lecho lleve a cabo la oxidación de los contaminantes dando lugar a subproductos de estructura más simple y menos tóxicos como el agua, CO₂ y biomasa¹². Estos sistemas no utilizan productos

químicos y hasta hace poco se creía que no producían residuos peligrosos, simplemente los contaminantes son tomados del aire por los microorganismos que son capaces de metabolizarlos, ocasionando reacciones de oxidación y reducción de las cuales los organismos obtienen energía para su crecimiento o mantenimiento 50.

2.4.1. Biofiltros

Los biofiltros son una tecnología muy prometedora, que se ha consolidado a nivel industrial debido a los bajos costos de operación ¹³, es utilizada para la eliminación total o parcial de contaminantes gaseosos (orgánicos e inorgánicos). Se trata de un biorreactor con la principal característica de tener comunidades microbianas que crecen organizadamente sobre un soporte, los contaminantes entran en contacto con la biopelícula y son biodegradados, generándose productos menos tóxicos.

Para implementar un sistema de biofiltración se deben tener varias consideraciones entre las más importantes para su operación y eficiencia están:

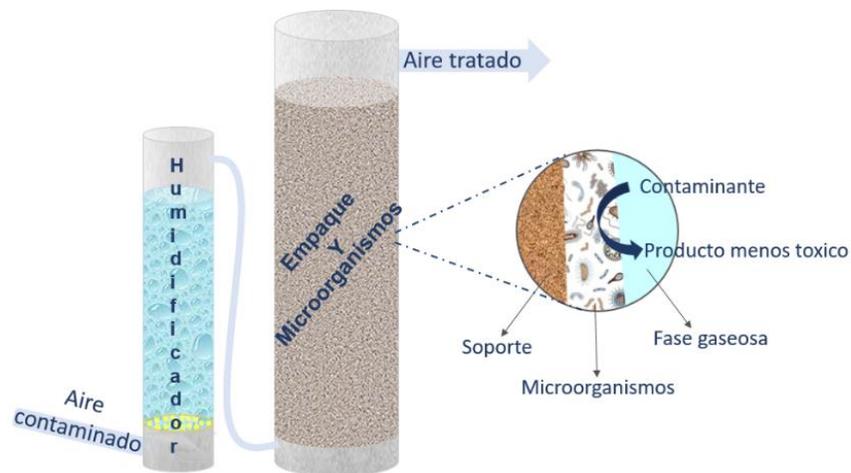


Ilustración 3. Componentes generales de un biofiltro.

- Temperatura: Un cambio repentino o extremo puede matar totalmente los microorganismos y si bien una disminución de temperatura no los mata, si disminuye o paraliza su actividad, por eso es recomendable revisar este

parámetro continuamente. La temperatura óptima de un biofiltro comúnmente se encuentra entre 20 y 40 °C.

- Humedad: Es importante hacer pasar la corriente de aire por un humidificador para lograr un 40-60% de agua en la corriente, cuidando siempre que el agua que se produce tenga una salida libre.
- pH: Va a depender del pH de los flujos de entrada, sobre todo del flujo del contaminante. El óptimo es neutro, cercano a 7.
- Material de soporte: Puede ser orgánico e inorgánico. El primero se debe seleccionar en base a los nutrientes que ofrece cuidando que no interfieran con los contaminantes que se desean eliminar, se ha comprobado que este soporte no es factible debido a que no se controla el suministro de nutrientes y se presenta un taponamiento que disminuye el tiempo de vida.

El soporte de material inorgánico debe ser inerte, como ventaja provee más control en el crecimiento microbiano debido a que los nutrientes son añadidos por el operador de manera continua pero medida ¹².

Para una mejor operación se ha propuesto combinar los dos materiales para evitar que el lecho colapse, el inorgánico servirá como soporte evitando la obstrucción y el orgánico proveerá nutrientes y microbiota para un mejor funcionamiento del biofiltro ⁵¹.

- Microorganismos: Se pueden obtener de dos maneras, del laboratorio con cepas puras y aclimatadas o de ambientes que proveen un consorcio naturalmente, siendo la segunda opción más utilizada con fines de adaptación y supervivencia ya que los primeros son más susceptibles a cambios. Los microorganismos se encuentran organizados y adheridos a la superficie del material de soporte por medio de la secreción de un exopolímero, logran adaptarse y convivir con diferentes especies aprovechando los diversos metabolismos que se encuentran en la comunidad, creando un microambiente que sea benéfico para todas las especies y así tener un mejor desempeño ⁵².
- Mezcla y concentración de contaminantes: Son parámetros de operación esenciales para el buen desempeño del biofiltro, son la fuente principal de

alimento y energía. Se determinan de acuerdo al contaminante a tratar, el volumen del biofiltro y el flujo de entrada.

- Alimentación de macro y micro nutrientes: Los microorganismos necesitan, además de la fuente de carbón (contaminante) nutrientes para sobrevivir y propagarse, aunque no son el suministro principal, son indispensables para sustentar su vida y crecimiento, si estos están escasos el microorganismo puede llegar a morir. Por ejemplo, el nitrógeno es básico para la estructura de paredes celulares, proteínas y ácidos nucleicos y no siempre está presente en la composición del contaminante. Otros importantes son el fósforo, potasio, azufre, magnesio y zinc entre otros.
- Tiempo de residencia: Se describe como el tiempo en el que el flujo de aire recorre el biofiltro desde la entrada hasta la salida y es ajustado de manera que este tiempo sea el suficiente para transformar los contaminantes. Los tiempos de residencia en biofiltros industriales o comerciales se encuentran en un rango de 25 segundos, en trabajos de experimentación se manejan rangos de entre 18 a 90 segundos, este parámetro se varía para obtener mejores rendimientos ^{49,53}.

Es importante monitorear cada uno de los parámetros mencionados, todos son de igual importancia y el cambio en alguno puede colapsar el sistema.

Las ventajas que presenta el proceso de biofiltración son los bajos costos de operación e instalación y altas eficiencias de eliminación ⁵⁰. Teniendo como desventajas el requerimiento de espacio, la dificultad para controlar algunos parámetros y obtener muestras representativas de las emisiones y de los microorganismos (es muy dependiente del lugar y las condiciones), la puesta en marcha y determinación de parámetros puede demorar ⁵⁰, puede presentar taponamiento el cual disminuye la vida útil del biofiltro e incrementa los gastos de operación. Otro problema de los biofiltros es la emisión de bioaerosoles ^{54,55}.

2.5. Emisión de bioaerosoles en la biofiltración

La emisión de bioaerosoles en biofiltros está documentada y es más impactante para la salud humana que la propia contaminación por compuestos orgánicos volátiles que comúnmente se remueven en estos sistemas ⁵⁵. Las cantidades de material biológico liberado por el biofiltro son tan solo un poco más altas que los bioaerosoles encontrados en aires de interiores ^{56, 57}.

Actualmente se han reportado algunos estudios de bioaerosoles emitidos en biofiltros que se enlistan en la Tabla 5.

Zilli et al. (2005) ⁵⁶ reportaron que la emisión de bioaerosoles no depende de la velocidad superficial del gas que determina el tiempo de residencia, pero las condiciones de carga de contaminante si tuvieron un gran efecto aumentando el contenido de biomasa en el sistema y con esto las emisiones de bioaerosoles. La concentración de bioaerosoles en el efluente del biofiltro fueron ligeramente mayores en comparación con el aire interior del laboratorio (1×10^3 UFC/m³).

En el caso de Ottengraf et al. (1991) ⁵⁷ el estudio se llevó a cabo a gran escala en 6 filtros industriales con un filtro control a escala laboratorio. La concentración de bioaerosoles en aire interior fueron del mismo orden de magnitud que las del aire a la salida de los biofiltros en las industrias. Los resultados variaron en los diferentes biofiltros por lo que en algunos casos los bioaerosoles aumentaron al transcurrir el proceso de biofiltración y en otros disminuyeron. A mayor carga de entrada de contaminante al biofiltro mayor emisión de bioaerosoles y a mayor concentración de microorganismos en la entrada del biofiltro menor concentración a la salida.

Tabla 5. Estudios previos de emisión de bioaerosoles en sistemas de biofiltración.

Contaminante	Empaque/ Microorganismos	Recolección	Caracterización	Concentración UFC/m ³	Referencia
Benceno	Turba y vidrio, caña y vidrio / <i>Pseudomonas sp.</i>	AGI-impinger Filtro de membrana 0.45 µm	Cultivo en placa	1-4x10 ³	⁵⁶ Zilli et al., 2005.
COVs nivel piloto y Acetona a nivel laboratorio	Escala real: Composta, mezcla de turba, ramas abono orgánico y poliestireno Escala laboratorio: partículas de composta, poliestireno y lodo activado / Consorcio microbiano	Millipore all-glass impinger Filtro de membrana 0.45 µm	Cultivo en placa	10 ³ y 10 ⁴	⁵⁷ Ottengraf et al., 1991.
Pentano	Vermiculita y <i>Fusarium solan</i>	Membrana de esterres de celulosa 0.45 µm	Cultivo en placa	4.5x10 ³ - 1.8x10 ⁴	⁵⁵ Vergara et al., 2016.
Pentano	Vermiculita / <i>Fusarium solan</i>	Membrana de esterres de celulosa 0.45 µm	Cultivo en placa	1.3 x10 ³	⁵⁴ Vergara et al., 2016.
Clorobenceno	Bambú / Consorcio microbiano	M Air T-Millipore Instrument Co impinger	Cultivo en placa	1.38 x10 ³	⁵⁸ Wang et al., 2012.
Hexano	Perlita con cubierta de ZnO / Consorcio de hongos	Merck Millipore	Cultivo en placa	2.4x10 ³ - 9x10 ⁴	⁵⁹ Saucedo Lucero et al., 2016.
Tolueno	Perlita y Tezontle / Consorcio Microbiano	Impinger AGI-30	Microscopia de epifluorescencia	6x10 ⁵ - 1x10 ⁸	⁶⁰ Esquivel et al. 2017.

Vergara et al. (2016) ^{54,55} mostraron que la concentración de bioaerosoles a la salida del biofiltro superó en un orden de magnitud a la del aire interior y aire ambiente (1 y 1.2×10^3 UFC/m³ respectivamente). Se evaluó el efecto en la adición de medio mineral, la carga de entrada del contaminante y el tiempo de residencia en la emisión de bioaerosoles fúngicos. El aumento en la periodicidad de adición de medio mineral aumentó la eliminación de contaminante y disminuyó la emisión de esporas. En cuanto a la carga de contaminante se encontró que, a mayores concentraciones de pentano en la entrada, mayor emisión de esporas. Y a menor tiempo de residencia se aumentó la emisión de esporas. Otro artículo de los mismos autores, reporta el efecto que tiene la humedad y la temperatura en la emisión de bioaerosoles en biofiltros con el mismo empaque. La disminución de la humedad del biofiltro de 80 a 50% incrementó la formación de esporas a la salida del reactor y el cambio en la temperatura de 25°C a 35°C mostró un aumento en la emisión de esporas.

Wang et al. (2012) ⁵⁸ reportaron la combinación de la tecnología UV como pretratamiento a la biofiltración, obteniendo mejores eliminaciones de contaminante y una disminución en la emisión de bioaerosoles en estos sistemas híbridos, debido a que el ozono producido en la etapa de pretratamiento UV actuó como desinfectante.

Saucedo-Lucero et al. (2016) ⁵⁹, utilizaron un proceso de pos-tratamiento al biofiltro, fotolítico y fotocatalítico con la perlita impregnada con ZnO, este proceso ayudó a la desactivación de esporas emitidas a la salida del reactor. Sin embargo, en este proceso se registró la desactivación del catalizador lo cual limitó el tratamiento de los bioaerosoles. La alta humedad repercutió en una menor emisión de esporas en la fase gaseosa.

Esquivel Saúl et al. (2017) ⁶⁰ realizaron un estudio de emisión de bioaerosoles en 2 biofiltros con diferente empaque, tezontle y perlita e inoculados con un consorcio microbiano. Utilizaron microscopia de epifluorescencia para la caracterización y conteo de los bioaerosoles emitidos y con ayuda de tres fluorocromos, Calcofluor-White Stain para teñir hongos y esporas de hongos, Syto

13 para bacterias y Yoduro de hexidium que tiñe bacterias G+. En este estudio se comprueba que los métodos dependientes de cultivo subestiman la cantidad de microorganismos y al usar métodos independientes de cultivo se tiene una cantidad de bioaerosoles mas acercada a la concentración real.

3. Justificación

Debido a que son escasos los estudios de caracterización de bioaerosoles en aire ambiente y de interiores, así como también en procesos de biofiltración, con pocos estudios reportados en este último proceso; y aunado a que las metodologías basadas en métodos dependientes de cultivo han sido las más utilizadas para caracterizar bioaerosoles subestimando la cantidad de bioaerosoles reales. En este trabajo se propone una técnica de análisis independiente de cultivo; la citometría de flujo con fluorocromos con la cual se espera tener un conteo más real y certera de los bioaerosoles emitidos en biofiltros diferenciando entre bacterias vivas y muertas.

4. Hipótesis

La Citometría de Flujo acoplada a fluorocromos es una técnica independiente de cultivo que permitirá cuantificar bioaerosoles de una manera más rápida y precisa en comparación con las técnicas dependientes de cultivo, permitiendo cuantificar tanto bioaerosoles viables como no viables del flujo saliente del biofiltro y aire ambiente (entrada). Existen fluorocromos capaces de diferenciar células viables y no viables de muestras de bioaerosoles.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Estudiar la caracterización de bioaerosoles emitidos en un biofiltro que trata una mezcla de COVs modelo por medio de Citometría de Flujo como un método alternativo a los métodos de cultivo en placa.

5.2. Objetivos específicos

- ✓ Monitorear el desempeño de un biofiltro que trata Acetato de etilo y Tolueno.
- ✓ Identificar la carga de contaminantes con mejor desempeño del biofiltro.
- ✓ Estudiar el efecto de la mezcla de contaminantes y de cada uno por separado en el desempeño del sistema.
- ✓ Encontrar los fluorocromos adecuados para el conteo y caracterización de bacterias viables y no viables.
- ✓ Caracterizar los bioaerosoles emitidos en un biofiltro por citometría de flujo en base al contenido de células viables.
- ✓ Determinar el efecto de parámetros de operación como carga y paros de alimentación del contaminante en la emisión de bioaerosoles durante el proceso de biofiltración.
- ✓ Caracterizar los bioaerosoles en un sistema de filtración control (Filtro sin inocular y sin contaminante).
- ✓ Establecer las condiciones de almacenaje y de parámetros en el equipo de CMF adecuadas para el estudio.
- ✓ Comparar el conteo celular obtenido con la técnica de cultivo en placa y la citometría de flujo de las muestras de bioaerosoles colectadas.

6. Material y proceso metodológico

6.1. COVs Modelo

Los contaminantes modelo tolueno y acetato de etilo han sido frecuentemente usados en estudios previos de biofiltración. Son disolventes orgánicos frecuentemente identificados en varias industrias como la del recubrimiento y pintura, industrias farmacéuticas, de tintas de impresión, productos domésticos, de aseo y adhesivos ⁶¹. En este estudio se seleccionó estos dos contaminantes en relación equimolar.

6.1.1. Tolueno (T)

Se utilizó tolueno (FERMONT 06605) con 99.9% de pureza, fórmula química $C_6H_5CH_3$, PM 86.18 g mol⁻¹ y densidad de 0.86 g mL⁻¹. Pertenece al grupo de los hidrocarburos aromáticos, es un líquido incoloro con un olor particular, menos denso que el agua e inmiscible en ella, sus vapores son más densos que el aire y es liberado de manera muy fácil por su alta volatilidad. Se presenta de manera natural en el petróleo crudo y en algunos árboles, es utilizado como disolvente en pinturas, barnices, revestimientos, hules, gomas, poliestireno, ceras, aceites y resinas, como materia prima para la elaboración de medicamentos, colorantes, perfumes, detergentes y es aditivo de combustibles ⁶². Es biodegradable y a condiciones ambientales de temperatura y presión es estable.

A concentraciones bajas o moderadas puede causar daños ligeros al sistema nervioso. En las fichas internacionales de seguridad química se establece un límite permisible en ambientes laborales de 50 ppm equivalente a 192 mg m⁻³ ⁶³.

6.1.2. Acetato de etilo (AE)

Acetato de etilo (J. T. Baker 11405) con 99.8% de pureza, fórmula química $CH_3COOCH_2CH_3$, PM 88.11 g/mol y densidad de 0.89 g/mL. Es un éster muy volátil, líquido incoloro con olor a frutas, inflamable, menos denso que el agua y el aire y poco miscible en ella. Es utilizado en las industrias de tintas, impresión, thinner, solventes de pinturas, adhesivos, pegamentos, farmacéutica, de esencias, películas y en la elaboración de piel artificial entre otras, ampliamente liberado cuando es utilizado como disolvente o solvente ⁶⁴.

En caso de inhalación causa efectos de malestar como dolores de cabeza, náuseas, pérdida de la conciencia y aun a concentraciones bajas causa anemia. Se ha establecido un límite de exposición de 400 ppm (1400 mg m^{-3})⁶⁵.

6.2. Material de soporte

Se utilizó perlita de origen mineral, es un vidrio volcánico amorfo, con su característica principal de ser un material inerte, libre de sales, con una composición de: 70-75% SiO_2 , 12-15% Al_2O_3 , 3-4% Na_2O , 3-5% K_2O , 0,5-2% Fe_2O_3 , 0,2-0.7% MgO , 0,5-1,5% CaO , presenta un pH de 7.5, una superficie porosa que facilita la retención de agua y la formación de biopelículas permitiendo mantener la humedad necesaria y la óptima operación del biofiltro.

La perlita ya se ha utilizado ampliamente en el grupo de investigación, arrojando resultados favorables al proceso. Se tamizó y se seleccionó un tamaño superior a 3.3 mm. Para obtener datos específicos de la perlita que se utilizó, se hicieron pruebas para determinar densidad seca y húmeda, porcentaje de retención de agua y espacio vacío.

Para el pH se trituró 1 gramo de perlita, se le agregaron 5 mL de agua desionizada y se mezcló por 5 minutos. Se midió el pH de la solución con el potenciómetro.

Para obtener la densidad de la perlita se taró la balanza con una probeta de 500 mL, se llenó con perlita procurando que se tenga el menor espacio vacío y se pesó, obteniendo g/mL.

Para determinar la densidad húmeda, el porcentaje de retención de agua y el espacio vacío, se dejó saturar la perlita en agua por 24 horas. Para la densidad húmeda se llenó una probeta con la perlita húmeda y se pesó obteniendo g/mL. El porcentaje de retención de agua se obtuvo pesando 5 g de perlita húmeda y se metieron a la estufa a 105°C por 24 horas, cumplido este lapso de tiempo se volvió a pesar. La obtención de espacio vacío se midió al agregar perlita húmeda en una probeta y llenar los espacios vacíos con agua midiendo el volumen de agua agregado.

6.3. Biomasa

Se utilizó como inóculo lodo de un proceso microbiológico rico en microorganismos de la planta de tratamiento de aguas residuales del Parque Tangamanga I San Luis Potosí, SLP. El inóculo es un cultivo mixto con la finalidad de lograr una mezcla diversa de microorganismos para un mejor rendimiento, una mayor resistencia y adaptación a los cambios.

6.4. Muestreadores

Para recolectar los bioaerosoles se utilizó un muestreador por burbujeo o impinger AGI-30 (Ace Glass, Inc.) de vidrio. Es ampliamente utilizado para la captación de bioaerosoles ya que permite reducir el estrés al que se someten los microorganismos atrapados. El impinger se unió a una bomba de vacío que aumenta la velocidad del flujo para permitir un mejor contacto y choque entre el líquido de captura y las partículas (Ilustración 4). Para las tomas de muestra se estableció un flujo de aire de 12.5 L/min (flujo sónico); 3.3L de la salida del biofiltro y 9.2 L de aire exterior, durante 30 minutos.

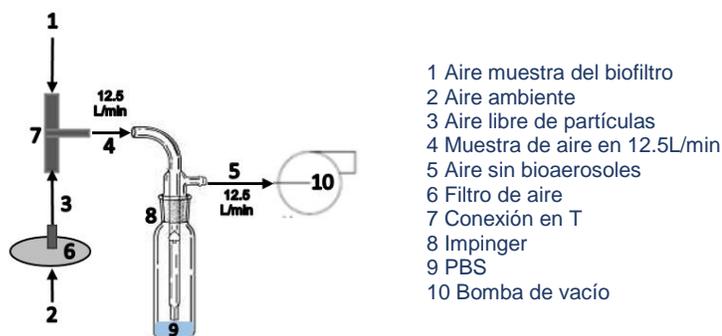


Ilustración 4. Conexión del impinger AGI 30.

El líquido de captura utilizado es una solución amortiguadora con fosfatos y sales (PBS) previamente utilizado para colección y almacenamiento de bioaerosoles debido a que es capaz de mantener las células vivas y sobre todo no altera su concentración o modifica el metabolismo celular debido a que su composición es parecida a las del líquido extracelular en mamíferos y los grupos fosfatos mantienen el pH estable. El PBS se preparó de acuerdo a la Tabla 6⁶⁶, posteriormente se filtró con una membrana (MILIPORE AAWP02500) de esteres

mezclados de celulosa, hidrófila con tamaño de poro de 0.22 μm y se esteriliza a 120°C por 20 min.

Tabla 6. Composición de la solución buffer fosfato salina.

Sales	Concentración (g/L)
NaCl	8
KCl	0.2
KH_2PO_4	0.2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26
Ajustar pH a 7.4 con NaOH 10 M	

Para la recolección de contaminantes gaseosos; tolueno, acetato de etilo y CO_2 , se utilizaron bulbos de vidrio con volumen de 500 mL.

Ambos muestreadores se desinfectaron en autoclave previamente.



Ilustración 5. Bulbo muestreador de gas.

6.5. Fluorocromos

En la literatura se encontraron diferentes combinaciones de fluorocromos que sirvieron como base para iniciar con el estudio en CMF.

- Calcofluor White para teñir hongos y esporas ⁶⁷.
- Syto 13 marca bacterias ^{68,45}.
- Yoduro de Propidio (PI) penetra células bacterianas de membrana dañada ⁶⁹.
- Yoduro de Hexidium tiñe bacterias G+ ⁶⁸ o con una preparación diferente es capaz de teñir todas las células ⁷⁰.
- Naranja de Acridina (AO) pinta todas las bacterias ^{44, 45}.
- Oregon Green conjugated wheat germ agglutinin marca bacterias G+ ⁷⁰.
- Naranja de Tiazol (TO) Tiñe células bacterianas ⁶⁹.

Se probaron las diferentes combinaciones de fluorocromos propuestas en la literatura y se realizaron unas más a nuestro criterio buscando la más funcional en base a los objetivos propuestos. No se obtuvieron los resultados esperados, se cree que debido a que algunos estudios de la literatura no fueron llevados a CMF y no se especifican condiciones muy específicas del análisis de la muestra.

Después de las pruebas se decidió trabajar con PI y TO por ser los únicos fluorocromos que se observaron adecuadamente por citometría de flujo, no se empalmaron y se logró obtener una completa separación de las células teñidas.

6.6. Sistema de biofiltración

Se montaron 2 reactores, ambos consistieron de 3 módulos de vidrio en forma cilíndrica, de 8.5 cm de diámetro por 27 cm de altura, con un volumen efectivo empacado de 1.1 litros. El volumen total empacado del biofiltro fue de 3.3 L con una altura de 81 cm. La Ilustración 6, muestra el diagrama experimental utilizado. Ambos sistemas operaron en flujo descendiente con un tiempo de residencia de 60 segundos y un flujo de 3.3 L/min. Un reactor se inoculó con lodo y se alimentó con la mezcla de solventes (tolueno y acetato de etilo) y el otro fue un reactor control alimentado con aire ambiente únicamente y sin inocular.

Adicionalmente para suministrar nutrientes y mantener la humedad óptima del sistema se adicionó medio mineral compuesto por sales NaNO_3 18 g, KH_2PO_4 1.3 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.38 g, CaCl_2 0.055 g, y elementos traza $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.012 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0023 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0015 g, H_3BO_3 0.0015 g, a un pH de 7. La alimentación de contaminantes se realizó con 2 saturadores de vidrio, uno con cada compuesto, controlados con medidores de flujo.

Se monitorearon los bioaerosoles en la fase gaseosa, a la entrada de los reactores y a la salida por un muestreador AGI-30 impinger. Se midió periódicamente el contenido de biomasa en el reactor, el contenido de carbono orgánico total en lixiviados y la concentración de contaminantes a la entrada y salida del reactor por cromatografía de gases.

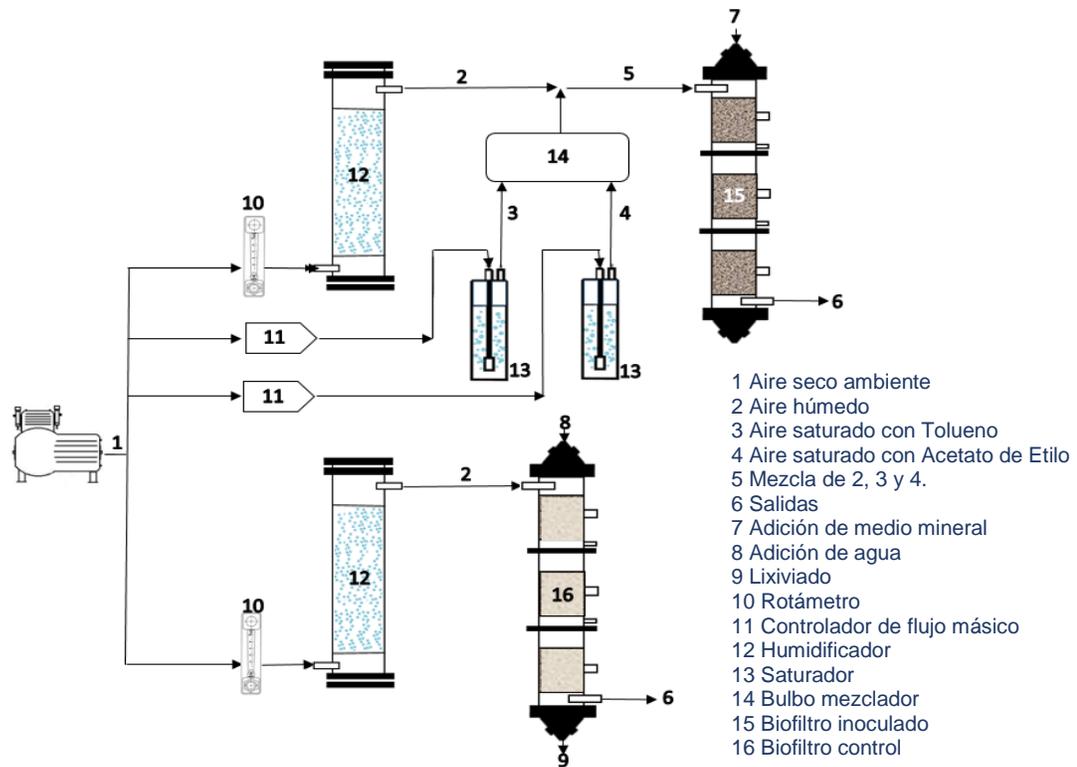


Ilustración 6. Sistema de biofiltración.

6.7. Estrategia experimental

Se operaron 5 etapas experimentales, las cuales son resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7. Etapas de operación del biofiltro.

Etapa	Característica	Tiempo de Retención (s)	Carga aplicada ($\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$)		Periodo operación (días)
			Tolueno	A. de etilo	
1	Arranque	60	27	26	0-35
2	Aumento de carga 1		55	52	36-70
3	Aumento de carga 2		82	79	89-108
4	Efecto del paro de alimentación de Acetato		82		109-149
5	Efecto del paro de alimentación de Tolueno			79	151-171

La etapa 1 consistió en el arranque del reactor, esta etapa operó los primeros 35 días, alimentando una carga de $54 \text{ g m}^{-3} \text{ h}$ ($27 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ T}$ y $26 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ AE}$). Posteriormente se inició la etapa 2 y 3 donde se probaron los efectos de la carga de alimentación en la emisión de bioaerosoles. La etapa 2 operó del día 36 al 70 con una carga de $108 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($55 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ T}$ y $52 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ AE}$). Al término de la etapa 2 hubo un paro de alimentación de contaminantes, solo se alimentó aire del compresor y el riego del medio mineral siguió igual. La etapa 3 operó con una carga de $162 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($82 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ T}$ y $79 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \text{ AE}$) durante los días 89-108.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la eficiencia de remoción de contaminante en estado estacionario al aplicar la última carga, se continuó con el efecto de paros de alimentación de acetato de etilo (etapa 4), suministrando solo tolueno a una carga de $82 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, esta etapa operó del día 109-149. La etapa 5 consistió en la alimentación de acetato de etilo a $79 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ del día 151 al 171.

6.8. Técnicas analíticas

En la fase gaseosa se tomaron muestras a la entrada y salida del biofiltro para determinar la cantidad de contaminantes: CO_2 , tolueno, acetato de etilo y bioaerosoles en cada corriente.

6.8.1. Medición de contaminantes en la fase gaseosa

La concentración de contaminantes en fase gaseosa se determinó en un cromatógrafo de gases Thermo Scientific TRACE 1300 equipado con una columna BD-624 de polaridad intermedia y el software Chromeleon. La concentración de COVs se determinó con un detector de ionización de flama (FID), como gas acarreador se usó nitrógeno a 3.5 mL/min . Las temperaturas a las que opero el equipo fueron $100 \text{ }^\circ\text{C}$ en el horno, $180 \text{ }^\circ\text{C}$ de inyección y 180°C con el detector y una presión de 28.4 kPA . La concentración de CO_2 se determinó en el detector de conductividad térmica (TCD), teniendo como gas acarreador nitrógeno con flujo de 3.5 mL/min a temperaturas de 100°C en el horno, en el inyector 200°C y en el detector 250°C y una presión de 117.8 kPA . En ambos análisis se inyectaron 0.2 mL de muestra con una aguja de precisión analítica de $500 \text{ }\mu\text{L}$ (Pressure-Lok de VICI).

6.8.2. Análisis del lixiviado

El volumen del lixiviado previamente colectado en el cono del fondo del biofiltro se midió con una probeta, la lectura de pH se realizó en un potenciómetro y posteriormente se vertió en tubos falcón de 15 mL para almacenaje y congelación.

El carbono orgánico total (COT) se midió para conocer que fracción de los contaminantes o subproductos se lixivian en la fase acuosa, se determinó en el equipo TOC-V CSN SHIMADZU acoplado a un analizador de sólidos, el cual arroja resultados directos en mg/L.

El procedimiento de medición del TOC en los lixiviados es el siguiente:

1. Preparación de muestra:
 - i. Se descongela la muestra
 - ii. Se centrifuga durante 3 min a 13300 rpm.
 - iii. Se toman sobrenadante y se filtra con 0.22 μm de diámetro de poro hasta conseguir 1 mL de muestra.
 - iv. Se hace una dilución 1:20 con agua desionizada en los viales de vidrio del automuestreador analizador de TOC.
2. Análisis en el equipo:
 - i. Se especifica el intervalo de medición a utilizar seleccionando la recta de calibración adecuada. El resultado obtenido es un valor directo de TOC expresado en mg/L que el equipo calcula automáticamente.

6.8.3. Determinación de bioaerosoles

1. Concentrado de muestras

Una vez capturados los bioaerosoles en el líquido PBS del impinger, los 20 mL se pasaron a 17 tubos eppendorf con 1 mL cada uno y se centrifugaron durante 30 minutos a 13300 rpm, se eliminó el sobrenadante dejando 150 μL en cada tubo para pasarlos posteriormente a 2 tubos eppendorf con 1.25 mL cada uno. Se tomaron muestras del sobrenadante para medir la pérdida de células por CMF.

Preparación de muestra

La tinción de muestras se hizo por medio de un kit de viabilidad celular, que contenía Naranja de tiazol (TO) 42 $\mu\text{mol/L}$ en dimetilsulfoxido (DMSO), Yoduro de propidio (PI) 4.3mmol/L en agua y perlas contadoras.

Se tomaron 0.5 mL de muestra y se agregó 5 μL de cada colorante, TO penetra en todas las células y PI no es permeable en la membrana celular por los que solo logra ingresar en células dañadas (muertas), estos colorantes aumentan considerablemente la visibilidad y la separación de células en CMF.

Los fluorocromos después de su utilización se almacenaron a 4°C y se protegieron de la luz y durante la preparación de las muestras permanecieron en hielo.

2. Cuantificación y clasificación de bioaerosoles

Previamente al análisis de las muestras se realizaron algunas pruebas para observar el comportamiento del citómetro y poder dar veracidad a los datos.

Se realizó una corrida de muestras control: Solución PBS preparada y Solución PBS preparada + Fluorocromos. Adicionalmente se realizaron pruebas con microorganismos *E. coli*, en etapa de reproducción y crecimiento y una después de un tratamiento térmico para matar las células. Con estas pruebas identificamos y delimitamos las zonas de tinción y las perlas contadoras, identificando las regiones de células muertas por la alta intensidad de fluorescencia de PI, la región que corresponde a las células vivas ya que son las marcadas con TO, y las células que se tiñen con ambos fluorocromos y que son las que se encuentren con la membrana comprometida.

La Ilustración 7 es un ejemplo de cómo se separan las regiones de acuerdo a los fluorocromos utilizados (BD Cell Viability Kit), en el filtro 3 (FL3-H) se observa la intensidad de fluorescencia de PI, y en el filtro 1 (FL1-H) la de TO. La región R1 no se considera dentro de la fluorescencia del tinte ya que es muy baja y puede ser ruido causado por la auto fluorescencia de moléculas debido a la sensibilidad del equipo, y no necesariamente por la propia tinción en células.

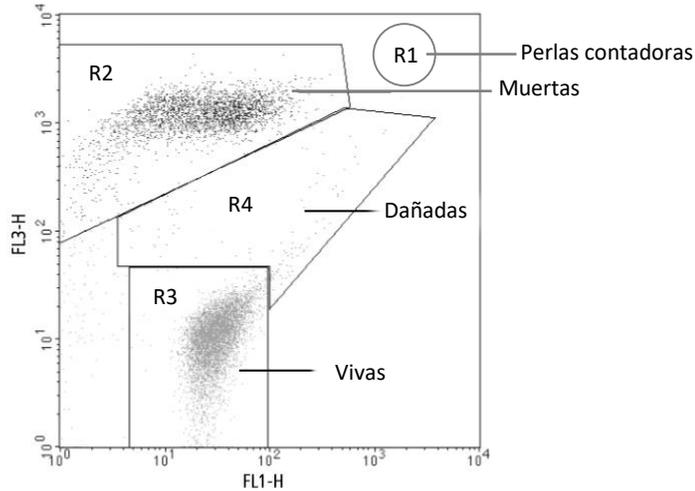


Ilustración 7. Regiones separadas por fluorocromos en citometría, donde se muestra en que región se agrupan las células acorde a sus características.

Se debe tomar en cuenta que los fluorocromos elegidos (PI y TO) tienen alcance solamente a nivel de bacterias, al referirnos a células nos referimos a bacterias. Una vez realizado el análisis, se procedió a hacer el cálculo de concentraciones celulares donde se aplican las siguientes formulas:

$$\text{cel totales}/\mu\text{L} = \frac{(\text{eventos en R2} + \text{R3} + \text{R4}) * (\text{perlas en el test} * \mu\text{L agregados})}{(\text{Eventos en R1}) * \text{volumen de muestra}}$$

$$\text{cel vivas}/\mu\text{L} = \frac{(\text{eventos en R3}) * (\text{perlas en el test} * \mu\text{L agregados})}{(\text{Eventos en R1}) * \text{volumen de muestra}}$$

$$\text{cel muertas}/\mu\text{L} = \frac{(\text{eventos en R2}) * (\text{perlas en el test} * \mu\text{L agregados})}{(\text{Eventos en R1}) * \text{volumen de muestra}}$$

$$\text{cel comprometidas}/\mu\text{L} = \frac{(\text{eventos en R4}) * (\text{perlas en el test} * \mu\text{L agregados})}{(\text{Eventos en R1}) * \text{volumen de muestra}}$$

$$\text{Concentración de bioaerosoles} \left(\frac{\text{células}}{\text{m}^3 \text{ de aire}} \right)$$

$$= \frac{\text{no. células contadas}}{\text{Flujo de gas} * \text{tiempo de recolección}}$$

6.8.4. Análisis de la fase solida de empaque

El contenido de humedad se determinó tomando 2 gramos de empaque (por triplicado), se colocó en la estufa a 100°C por 24 horas y se vuelven a pesar. El contenido de humedad se determina por diferencias de peso y para determinar el porcentaje se divide entre el peso inicial de la muestra y se multiplica por 100 como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\%Humedad = \frac{P.inicial - P.final}{P.inicial} * 100$$

Las mediciones de biomasa total en soporte del biofiltro se realizaron en seguida de las de humedad, las muestras una vez determinada la humedad se colocaron en una mufla a 550°C por 2 horas. La biomasa se determinó por diferencia de peso de acuerdo a:

$$\%Biomasa = \frac{P.antes\ de\ mufla - P.despues}{P.antes\ de\ mufla} * 100$$

Donde P.: Peso (g)

6.9. Desempeño del biofiltro

La eficiencia de remoción (ER) que nos indica el porcentaje de contaminantes eliminados, se basa en diferencias de concentraciones en la entrada y salida del biofiltro de acuerdo a la sig. formula:

$$ER = \frac{(C_{Ent} - C_{Sal})}{C_{Ent}} * 100$$

Donde: C_{Ent} : Concentración de entrada en $g\ m^{-3}$. C_{Sal} : Concentración de salida en $g\ m^{-3}$.

La capacidad de eliminación (CE) nos revela la cantidad de contaminante que es eliminada en un tiempo y volumen efectivo de reactor y se calcula de acuerdo a:

$$CE = \frac{(C_{Ent} - C_{Sal}) * Q}{Volumen\ de\ reactor}$$

Donde: C_{Ent} : Concentración de entrada en $g\ m^{-3}$. C_{Sal} : Concentración de salida en $g\ m^{-3}$.
Volumen efectivo de reactor en m^3 . Q: Caudal en m^3/min .

Los cálculos se realizaron para cada módulo de los biofiltros, para cada contaminante y la mezcla.

La producción de CO₂ (PCO₂) se calculó de acuerdo a la sig. ecuación:

$$PCO_2 = \frac{(C_{Salida} - C_{Entrada}) * Q}{Volumen\ de\ reactor}$$

La mineralización y balances de carbono nos indican el destino del carbono contenido en el contaminante, se calcula en porcentaje de acuerdo a un balance estequiométrico de la reacción en una ecuación teórica de mineralización de AE y T.

Tolueno



Acetato de etilo



De las ecuaciones anteriores se calcula la producción teórica de CO₂ en la oxidación completa siendo de 3.348 y 1.99 g de CO₂ producido/ g de compuesto consumido respectivamente. Con estos números se puede calcular el porcentaje de mineralización usando la siguiente formula.

$$Mineralización\ (\%) = \frac{g\ CO_2\ experimentales}{g\ CO_2\ teórico} * 100$$

El balance de carbono se obtuvo teóricamente de acuerdo a las 3 vías a las que se puede dirigir el carbono del sustrato.

$$C_{sustrato\ entrada} = C_{CO_2} + C_{biomasa} + C_{lixiviados}$$

La caída de presión se midió con un manómetro en U.

7. Resultados y Discusión



Ilustración 8. Sistemas de biofiltración en laboratorio.

7.1. Caracterización del soporte

De la caracterización básica de la perlita se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de la perlita.

Parámetro	Dimensión	Unidades
Tamaño de partícula	4	mm
Densidad perlita seca	123	kg/m ³
Densidad perlita húmeda	281	
% en peso de humedad	43	%
pH	7.35	
Espacio vacío	0.45	

Los parámetros obtenidos coinciden con los resultados previamente reportados en el grupo de investigación, Jiménez Lucero et al. (2014) ⁷¹ reporta densidades de 150 g/L perlita seca y 270 g/L de perlita húmeda, Gutiérrez Acosta et al. (2009) ¹³ obtuvieron un pH de 7.5 y un espacio vacío de 0.56 y por ultimo García Pérez et al. (2013) reportaron una capacidad de retención de agua de un 60%. Por lo tanto, los resultados obtenidos para este soporte son consistentes con los reportados previamente.

El material de soporte cumple con las características adecuadas para ser utilizado como soporte de comunidades microbianas que se desarrollan durante la biofiltración de COVs, principalmente por ser un material estable e inerte que permite el control del crecimiento microbiano, por ser altamente poroso da una distribución rápida y uniforme de los flujos y gran capacidad de retención de agua de poco más del doble de su peso ayudando a que la humedad del lecho se mantenga ¹³.

7.2. Desempeño del biofiltro

El biofiltro se operó por 180 días; este lapso de tiempo se dividió en 5 etapas en las que en las primeras 3 etapas se estudió el efecto de la carga de contaminantes (etapas 1, 2 y 3) y en las etapas 4 y 5 se realizaron paros de alimentación de un contaminante AE o T, de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 7.

7.2.1. Eficiencia de remoción y capacidad de eliminación del Sistema de biofiltración

En la Ilustración 9 se puede observar el desempeño del biofiltro en función de la ER y CE a través del tiempo para ambos contaminantes AE y T. El paro de alimentación consistió en suspender la entrada de COVs y solo permitir el paso de aire ambiente.

El AE en las etapas 1, 2 y 3 mostró una eficiencia de eliminación arriba del 95% cuando se alimentó con 26, 53 y 79 g m⁻³ h⁻¹ respectivamente. Se puede ver claramente en la gráfica de CE que las líneas amarillas que representan la carga de alimentación están muy cerca de las líneas de CE en las primeras 3 etapas lo que confirma el casi 100% de eliminación. Durante la etapa 4 se suspendió la alimentación de AE por 40 días. En la etapa 5, se alimentaron 79 g m⁻³ h⁻¹ de AE y la ER bajó a 87%, esto puede ser debido a que el sistema colapsó porque el lecho perdió espacio vacío y se compactó, lo cual fue observado cuando se desmontó el reactor.

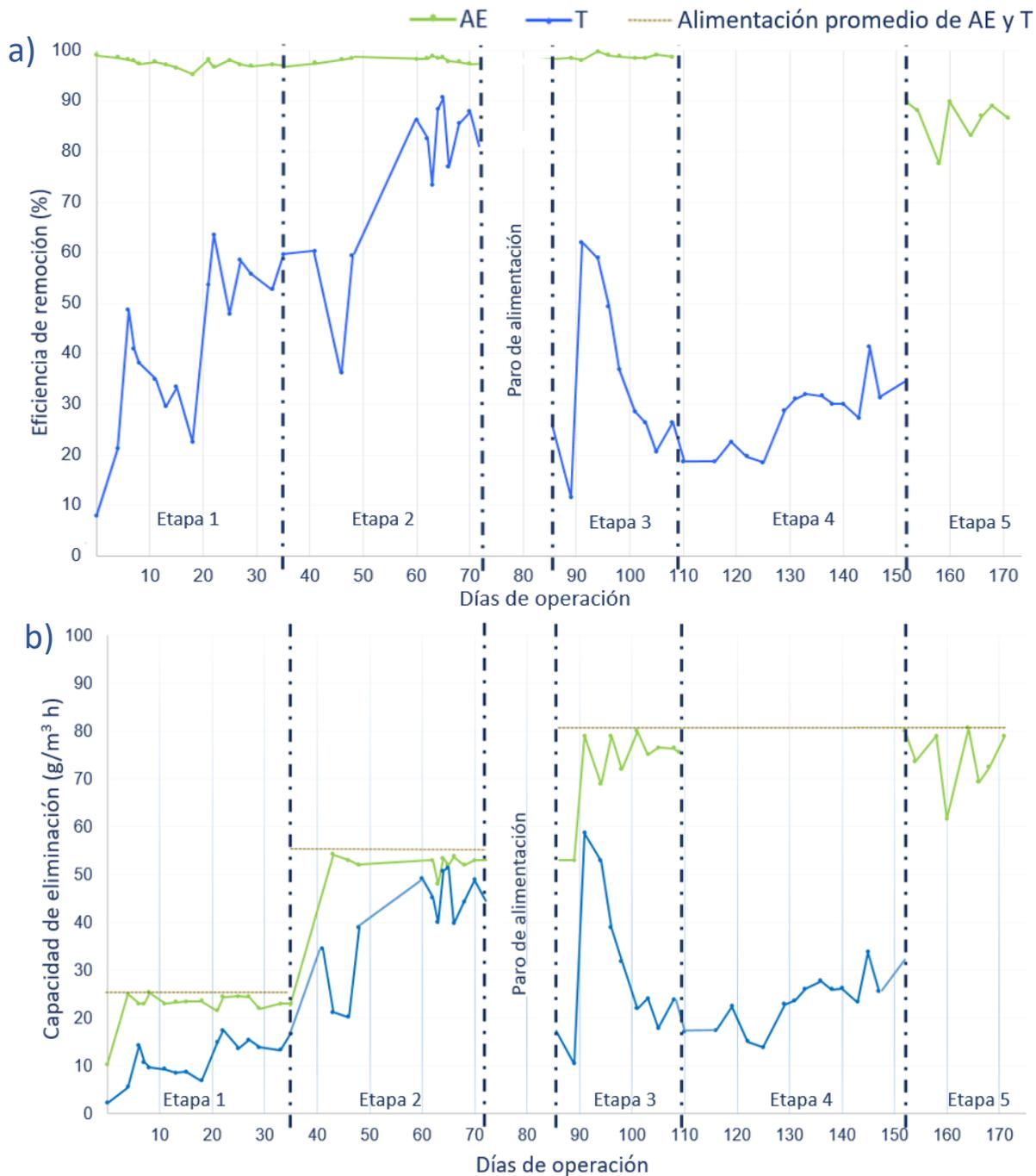


Ilustración 9. a) Eficiencia de remoción y b) Capacidad de eliminación del biofiltro.

El tolueno en cambio mostró ER y CE menores y comportamientos muy variables. En la etapa 1 ($28 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) se alcanzó una ER en estado estacionario de 55%. En la etapa 2 con carga de $55 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ alcanza una ER estable de 85% siendo esta etapa 2 la más eficiente para la degradación de tolueno, mostrando una CE

más cercana a la carga que se alimenta. En la etapa 3 el día 89 de operación se tuvo una caída muy notoria hasta un 10% ER, esta caída se debió a un intento por ajustar el pH del lecho a 7 lo que al parecer no cambió ya que al recolectar la última muestra de lixiviado se mantenía arriba de 9 y la ER se recuperó solo un día a 60% para caer progresivamente hasta promedios estables cercanos a 20%, esto es debido a que al aumentar significativamente la cantidad de contaminantes y debido al paro que se tuvo, la alta cantidad de AE alimentada inhibió el consumo de T, la comunidad consumidora de AE se vio beneficiada y fue predominante. En la etapa 4 se suspendió la alimentación de AE y se alimentó solo tolueno con la misma carga de la etapa anterior teniendo valores más constantes y alcanzando un promedio de 33% de ER y una CE de $25 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Posteriormente, no se observó un aumento importante en la ER de Tolueno debido al proceso de readaptación al consumo de tolueno por los microorganismos, pero también es importante mencionar que el biofiltro estaba en etapa de decaimiento por el largo periodo de operación que trabajó, anteriormente esto ya había sido reportado en el grupo de investigación por Jiménez et al. (2014)⁷¹ donde se establecieron condiciones óptimas en 2 biofiltros, al inicio de este trabajo los experimentos con una carga de $60 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ se obtuvo una ER de 97%, y después de un aumento en la carga de alimentación a $140 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, al no verse un aumento en la CE, se regresó el biofiltro a las condiciones óptimas de carga esperando que los reactores se recuperaran y suban su ER. Sin embargo, no fue así, después de un periodo de tiempo considerable, se concluyó que los biofiltros no son sistemas estables y que su desempeño está en función de su historial, siendo el tiempo de operación el factor de mayor importancia. Resultados similares se obtuvieron por Song et al. (2005)⁷² en el que al poco tiempo de llegar a un estado estacionario se disminuye la ER atribuyéndolo al deterioro en la actividad microbiana, modificada a su vez por cambios en las características del lecho empacado, principalmente al espacio vacío y la acumulación de metabolitos, siendo estas las principales desventajas de los biofiltros. En ambos estudios se trabajó solo con alimentación de Tolueno.



Ilustración 10. Estructura molecular de a) Acetato de etilo y b) Tolueno.

Los resultados obtenidos en cuanto a mayor degradación de AE que de T son los esperados, debido a que el acetato de etilo es un compuesto alifático con carbonos primarios y oxígeno, es decir de más fácil degradación. En cambio, el tolueno es un compuesto aromático con anillo bencénico con carbonos secundarios y un carbono terciario (Ilustración 10). Por lo tanto, es de esperarse que una estructura de carbonos primarios presente más reactividad que una estructura de carbonos secundarios. Siendo más fácilmente degradable el AE que el T.

Álvarez Hornos et al. (2009)⁶¹ y Zhao et al. (2008)⁷³ concluyeron que en una mezcla en iguales cantidades peso-peso de acetato de etilo y tolueno, el AE es inhibitorio en la eliminación de T, el AE se elimina totalmente, mientras que la remoción de T dependió del tiempo de residencia y se vio afectado por la presencia del AE, esto a cargas entre $65\text{-}195\text{ g m}^{-3}\text{ h}^{-1}$ y tiempos de retención entre 30-90 s, condiciones que son comparables con el presente trabajo.

En otro estudio realizado por Hwang et al. (2003)⁷⁴, al combinar cepas puras de bacterias (*Rhodococcus fascians*, *Rhodococcus sp*, y *Pseudomonas putida*) evitando la competencia de la comunidad microbiana por el sustrato, se alcanzó una eficiencia de remoción de 100% de acetato de etilo rápidamente y de tolueno por encima de 80% pero en un periodo de tiempo más largo, se trabajó con una mezcla de 1:10 cargas de Acetato de etilo: Tolueno⁷⁴.

Para que ambos contaminantes sean degradados de manera completa evitando la inhibición, se debe trabajar con relaciones molares muy diferentes. Con una relación molar mayor de AE y menor de T, el AE será rápidamente degradado sin importar la concentración y los microorganismos tendrán que usar T como fuente de carbono al agotarse el AE y al estar en baja concentración alcanzara una eficiencia de eliminación alta. Al invertir la relación alimentando mayor concentración de T y una menor concentración de AE, los microorganismos

terminarán rápidamente de utilizar AE como fuente de carbono y tendrán que utilizar T en mayor medida, obteniendo remociones altas de ambos contaminantes.

El resultado global del reactor depende del desempeño de cada módulo y cada uno depende del módulo anterior. En este sistema compuesto se pudieron observar los siguientes resultados del desempeño de los módulos a lo largo de las 5 etapas (Ilustración 11).

En el módulo 1 el AE fue eliminado en mayor medida con ER arriba de 85% durante las primeras 3 etapas, independientemente que en cada etapa aumentó la carga se tuvo una ER casi completa. En la etapa 5 la ER descendió notoriamente por debajo del 50% por la desadaptación al contaminante (40 días sin alimentarse) o por el propio decaimiento del biofiltro debido a la compactación del lecho. En este módulo, demasiada biomasa y caída de presión afectaron la eliminación global del biofiltro.

El tolueno presentó una ER aproximada de 15% en la etapa 1 y 2 aumentando hasta un 25% al final de la segunda etapa en el estado estacionario. En la Etapa 3 se observó una disminución en el desempeño del reactor llegando hasta presentar una eficiencia de remoción del 10% al final de la etapa, la disminución en la ER se atribuye al aumento en la concentración de AE. Durante la etapa 4, se mantuvieron ER bajas de T menores de 20%, este comportamiento fue debido a que el lecho del biofiltro se compactó, presentando así zonas muertas de degradación de T y AE.

En el módulo 2 se eliminó el AE restante hasta alcanzar el 98% de eliminación en la etapa 1, 2 y 3. En la etapa 5 aumentó la eficiencia de remoción en el módulo 2, haciendo este el trabajo del módulo 1, pero no se alcanza la total eliminación de AE debido a que el módulo no estaba adaptado a trabajar con altas concentraciones de AE, pero se presume puede aumentar la ER con el paso del tiempo hasta un 100%. La ER de T permaneció en la etapa 1 por debajo del 20%, en la etapa 2 al disminuir el % de eliminación del AE debido a que llega muy poco a este módulo, aumentó significativamente el consumo de T por encima de 30% de remoción. Este módulo fue el que presentó la mayor actividad para la eliminación de T. En la etapa 4 también se presentó el mismo comportamiento, al aumentar la ER del AE

disminuyó la del T, confirmando que el alto consumo de AE inhibió el consumo de T.

En el módulo 3 en las 3 primeras etapas no hubo presencia de AE ya que fue consumido en los 2 primeros módulos al 100% como ya se mencionó. El consumo de T fue del 30% en las 2 primeras etapas y en la etapa 3 y 4 se mantuvo por debajo del 20%. En la etapa 5 solo hubo presencia de AE que es fácilmente degradable y aun así no se presentó eliminación, esto debido a que no existe una comunidad de microorganismos consumidores de este compuesto ya que este contaminante no llegó a este módulo.

En el módulo 1 y 2 se puede observar claramente que para AE, al disminuir la ER en el módulo 1, aumenta la del módulo 2, lo anterior debido a que los módulos dependen del desempeño del módulo anterior y se adaptan a trabajar con las concentraciones resultantes, en este caso se elimina todo el contaminante en los 2 primeros módulos. Para el T también se puede ver esto, en el primer y segundo módulo la eliminación está por debajo del 20% y en el tercero aumenta, no en gran medida, pero si se muestra por encima de un 25% sin caídas tan drásticas. La ER se mantuvo normalmente por encima del 10%, siendo influenciada esta alta ER en el módulo 3 por la ausencia de AE.

Entre los 3 módulos a simple vista no se observa una diferencia notoria, se puede ver más entre etapas, en las que la etapa 2 es la que presentó un mejor desempeño, esto más por la capacidad de eliminación máxima y por las condiciones de cada módulo, siendo afectado por las cargas alimentadas y el tiempo de operación.

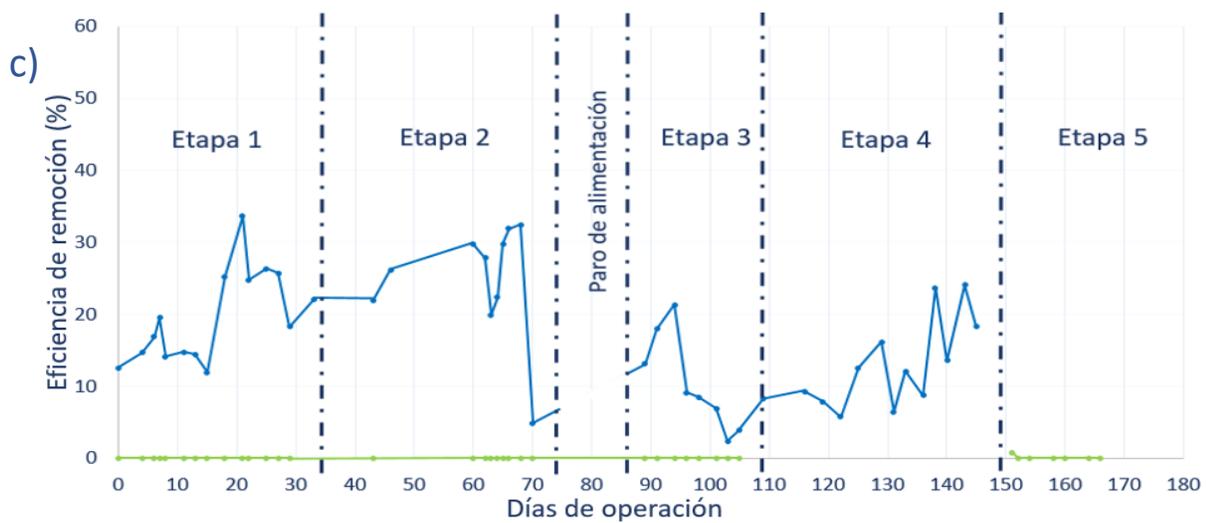
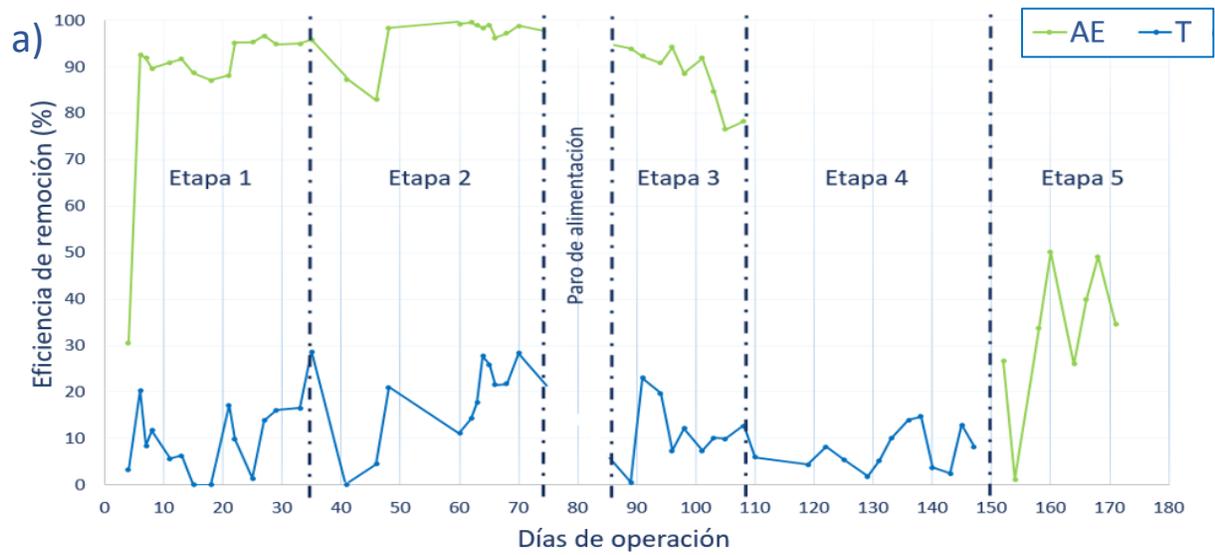


Ilustración 11. Eficiencia de remoción de alimentación total separada por módulos. a) Módulo 1. b) Módulo 2. c) Módulo 3.

7.2.2. pH y TOC en Lixiviados

Los lixiviados fueron colectados 2 veces por semana después de la adición de medio mineral y se caracterizaron en términos de pH y del contenido de carbono orgánico total (TOC) (Ilustración 12). El pH promedio se encontró superior a 7 a lo largo de la operación del reactor, al igual que en trabajos previos en los que se trató solo tolueno^{71,75}. El valor de pH presentado se atribuye a la fuente de nitrógeno utilizada en el medio nutritivo (NO_3^-) que genera iones hidroxilo (OH^-) durante su asimilación por la biomasa. El pH básico favorece la solubilización del CO_2 gaseoso formado durante la mineralización del tolueno y el acetato de etilo, así una parte del CO_2 formado reacciona con el agua para dar ácido carbónico, el cual se convierte en bicarbonato (HCO_3^-).

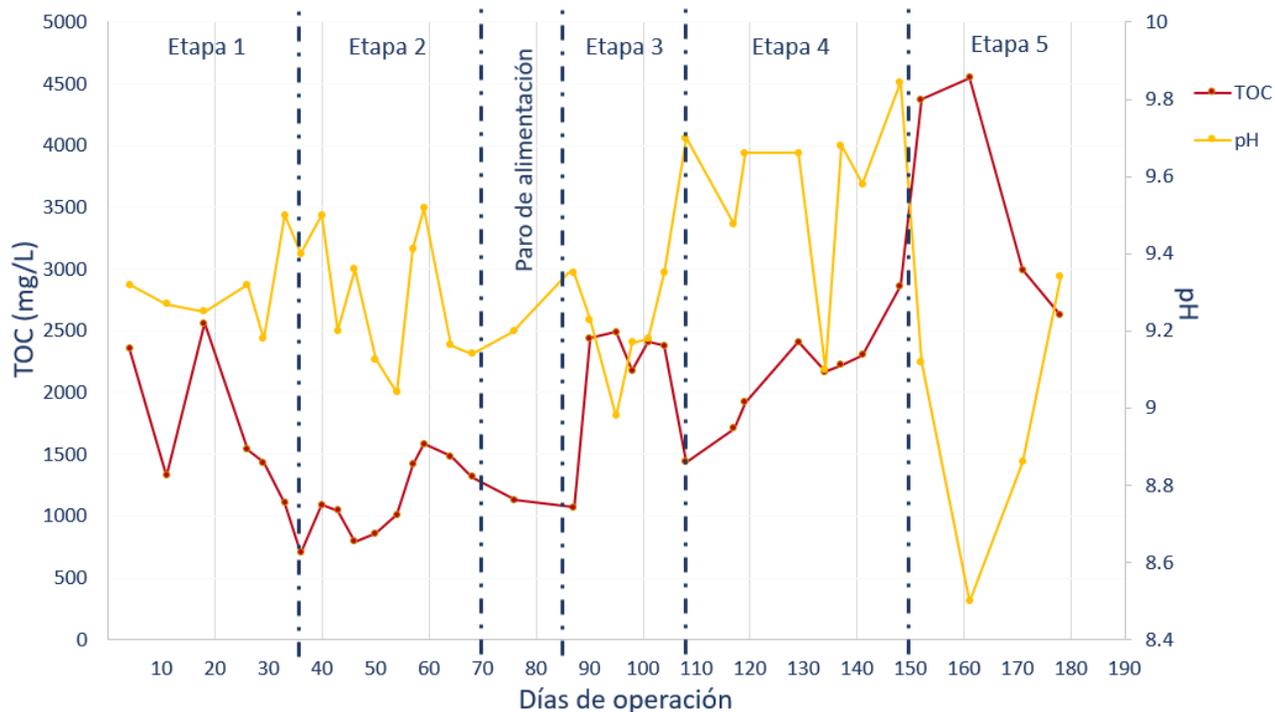


Ilustración 12. Carbono orgánico total y pH en lixiviados

En las 2 primeras etapas en las que se alimentaron ambos contaminantes el pH promedio se encontró en 9.4. Al inicio de la etapa 3 disminuyó el pH a 9, pero rápidamente aumentó hasta 9.7 y se mantuvo en este valor promedio durante la etapa 4. En el día 154 de operación al inicio de la etapa 5 se presentó una disminución en el pH, en esta etapa los riegos de medio mineral fueron menos

frecuentes, lo que también pudo haber influenciado el desempeño de remoción de AE, ya que los microorganismos requieren más nitrógeno para tener una actividad metabólica alta, a menos nitrógeno menos actividad y menos iones OH^- ⁷⁵

Relacionando el pH con el TOC se puede observar que al aumentar el TOC disminuye el pH y viceversa.

El TOC al inicio de la etapa 1 de arranque es un poco incierto y no se debe atribuir a arrastre de contaminante o subproductos a la fase líquida debido a que en esta etapa se tienen residuos de compuestos orgánicos contenidos en el lodo de la planta de tratamiento. Después de 25 días de operación el TOC comenzó a descender y a mostrarse estable lo que nos indica que los subproductos orgánicos del inóculo ya habían sido desechado en los lixiviados. En la etapa 2, el TOC disminuyó en comparación con las etapas 1 y 3, donde se alcanzó una mayor eliminación de ambos contaminantes. Se puede atribuir este comportamiento a que la biomasa se encontraba en crecimiento y bien adherida al soporte, el contaminante fue transformado exitosamente, teniendo las mejores condiciones de funcionamiento del biofiltro en un tiempo de operación corto, sin influencia del historial.

En la etapa 3, 4 e inicios de la 5, el TOC aumentó gradualmente en lixiviados, al igual que la carga en cada etapa, altas cargas de contaminante en la alimentación favorecen altas cargas de TOC en la fase líquida, esto puede ser debido al arrastre de contaminante, subproductos (ácido acético, benzoico o carbónico) que también justifican la caída en el pH y el crecimiento de biomasa.

7.2.3. SSV en el soporte y Caída de presión

Los sólidos suspendidos volátiles se relacionan indirectamente con la cantidad de biomasa dentro del sistema de biofiltración, esta medición se llevó a cabo al finalizar cada etapa en cada módulo. La caída de presión (ΔP) se midió cada semana (Ilustración 13).

El aumento en la caída de presión en el sistema se atribuyó al crecimiento de biomasa. Al inicio después de la inoculación cada módulo contenía la misma

cantidad de sólidos volátiles $20 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$, al finalizar la etapa 1 los SSV fueron de $22 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$, en la etapa 2; $49 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$, en la etapa 3; $48 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$, en la 4; $50 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$, en 5; $70 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$ estos valores promedio se registraron a lo largo de la operación del biofiltro. En general la cantidad de SSV fue aumentando conforme pasó el tiempo, en la etapa 2 se tuvo un aumento muy importante de más del doble en los SSV presentes a lo largo del reactor relacionado con el aumento en la carga de alimentación y a la alta tasa de eliminación registrada para ambos contaminantes. Los microorganismos se encontraban con un metabolismo activo importante y el reactor en las mejores condiciones de operación. En la etapa 5 al re-suministrar AE también se presentó un aumento muy importante en SSV pero no en la ER, debido a que se genera biopelícula capaz de degradar el AE y los organismos encargados de eliminar el tolueno se inactivaron y saturaron el lecho aumentando la caída de presión en el sistema.

Durante la segunda etapa el módulo 1 presentó un crecimiento de biomasa muy notorio debido a la alta asimilación de AE en este módulo, a pesar del aumento en la carga se eliminó un 97% en las 3 primeras etapas. En la etapa 4 al solo alimentar tolueno disminuyó un poco la eficiencia en el módulo 1 pero siguió aumentando la concentración de biomasa en los módulos 2 y 3, hasta llegar a la etapa 5, en la que los 3 módulos alcanzaron la misma cantidad de SSV de $66 \text{ mg}_{\text{SSV}}/\text{g}_{\text{soporte}}$ aproximadamente. Sin embargo, en esta etapa, aunque la concentración de biomasa fue mayor, se presume que gran parte de esta estaba inactiva debido a que la degradación de los contaminantes era baja y no se recuperó.

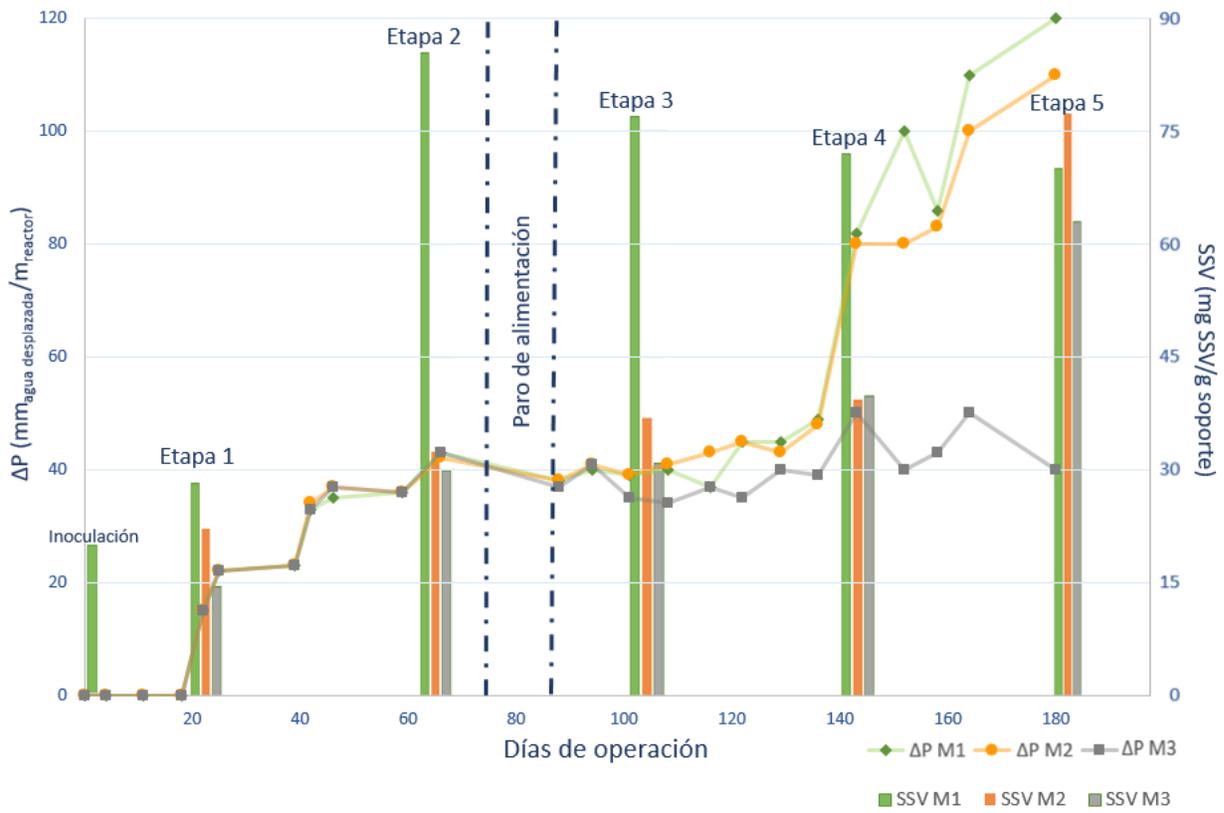


Ilustración 13. Caída de presión y SSV por módulos.

La caída de presión aumentó 20 mm durante la etapa 1 ya que comenzó a establecerse la comunidad microbiana, lo que disminuyó el paso de aire libremente sobre el soporte. En las siguientes etapas (2, 3 y 4) la caída de presión se mantuvo estable, y aumentó progresivamente pero no de manera muy significativa en los 3 módulos. En la etapa 5 al solo alimentar AE se observó un aumento en la caída de presión de los 2 primeros módulos, debido obviamente al alto consumo de AE y por tanto alto crecimiento de biomasa. Sin embargo, esto no se vio reflejado en el contenido de SSV debido probablemente al crecimiento desigual por el riego mal distribuido debido al taponamiento de lecho.

La humedad del lecho se mantuvo entre 70% y 82% a lo largo del tiempo de operación y en todos los módulos, sin mostrar cambios importantes.

7.2.4. Porcentaje de mineralización y Balance de carbono

El porcentaje de mineralización nos indica cuanto carbono presente en los contaminantes es convertido a CO₂ comparándolo con el que se debe producir teóricamente para darnos una idea general de lo que está pasando en el biofiltro y realizar los balances de carbono (Ilustración 14).

En el caso de la etapa 1, el porcentaje de mineralización sobrepasa el 100% debido a que el carbono (subproductos de degradación) presente en el lodo activado es degradado y contribuye al CO₂, siendo la salida de carbono más alta que la alimentación. Se obtuvieron porcentajes de remoción muy elevados de hasta 700%. Debido a esto solo se tomaron en cuenta los gramos de carbono teóricos que se debieron producir con el AE y T consumido asumiendo un 100% de mineralización debido al poco crecimiento en la biomasa durante esta etapa y a una adaptación previa con la que se descarta la pérdida por adsorción en la perlita.

Tomando en cuenta estas consideraciones se obtiene un 57% de mineralización global

En las etapas 2, 3, y 5 se presentaron porcentajes de mineralización por debajo del 100%.

En la etapa 4 se presentaron valores por encima del 100% y se atribuyen a la respiración endógena, esto es una auto-oxidación después del agotamiento de las reservas de alimento o bien se atribuye a la muerte celular, los microorganismos metabolizan su material celular sin reposición, ocurriendo una destrucción de sus células, esto por la suspensión de AE como la principal fuente de carbono y debido al exceso de biopelícula en el lecho. Esto puede también confrontar la hipótesis de que se crea nueva biomasa para degradar T y la ya adaptada se ve afectada por el cambio de composición del aire contaminado, generando CO₂ excedente por autoconsumo de células muertas.

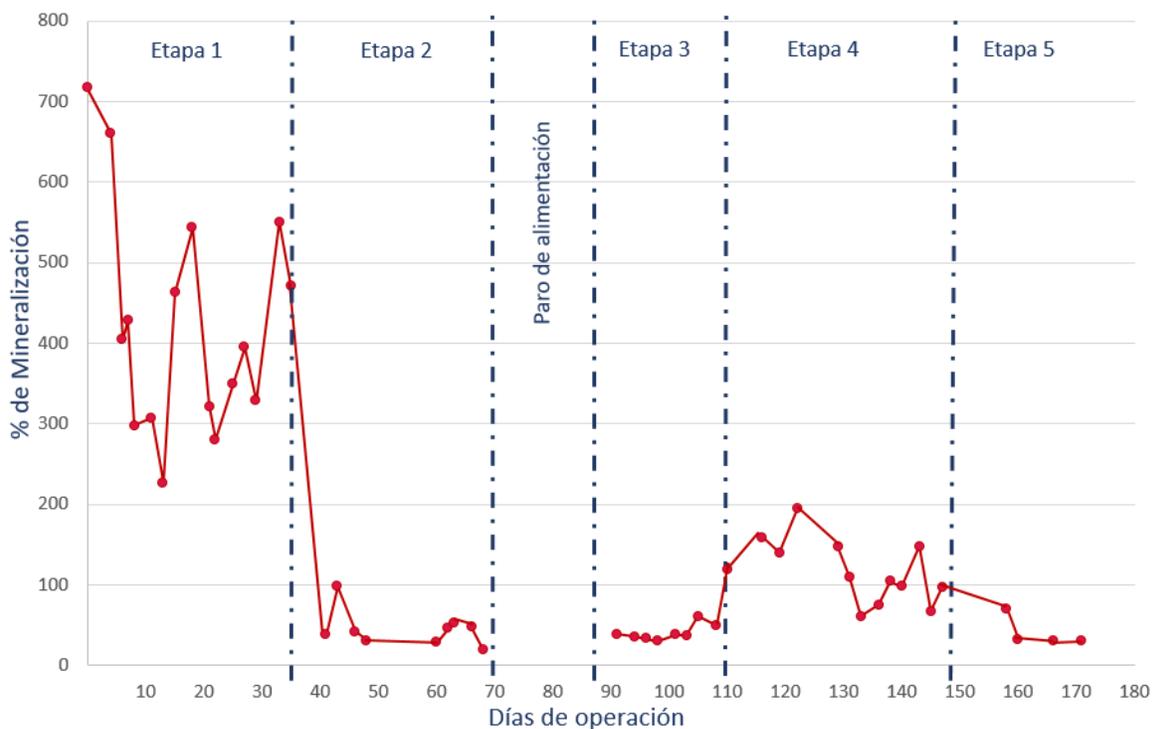


Ilustración 14. Porcentaje de mineralización de carbono.

El balance de carbono se realiza tomando en consideración la eliminación de carbono y las salidas de carbono como lixiviado, biomasa o subproductos en todo el periodo de operación de manera global. Con ayuda del programa OriginPro se integró el área bajo la curva de la capacidad de eliminación de cada una de las etapas por separado, arrojando la cantidad de compuesto que es eliminado en el periodo de operación con unidades de $\text{g día/m}^3\text{h}$, con factores de conversión y el volumen empacado del biofiltro se logran obtener los gramos (g) de contaminante consumidos y de acuerdo a la proporción de carbono en cada compuesto se obtienen los gramos de carbono consumidos durante toda la operación. En cuanto a la recuperación se obtiene el área bajo la curva de la producción de CO_2 y de igual manera los gramos de carbono contenidos en el CO_2 , sumando los de lixiviados y los proporcionales a la biomasa, para así tener un balance de carbono global (Tabla 9).

Tabla 9. Balance de carbono.

Unidades	Tolueno consumido	Acetato de Etilo consumido	Total de carbono consumido	CO ₂ producido	Carbono en lixiviados	Biomasa	Carbono recuperado
(g C)	215.65	226.59	442.24	253.42	11.70	61.9	327.02
%			100	57.30	2.65	13.99	73.94

El balance global indica que se obtiene un porcentaje de recuperación de carbono del 74% atribuyendo el 26% restantes a carbono no contabilizado como CO₂ disuelto en el lixiviado debido al pH básico presentándose como carbono inorgánico, en subproductos no contemplados en la cromatografía y en menor porcentaje a biomasa en lixiviados que no es contabilizada al filtrar las muestras para las pruebas de TOC.

En estudios previos Covarrubias et al. ⁷⁶ al tratar AE obtiene un 94% de recuperación, cuantificando el AE adsorbido y la biomasa en el lecho, un porcentaje de recuperación en forma de CO₂ de 70%, en biomasa 22% y en lixiviados 1.1%. Jiménez et al. ⁷¹ en la purificación de T reporta una recuperación de 86%, con un 0.98% en lixiviados, 9% en biomasa, 76% en forma de CO₂.

Los resultados obtenidos en este estudio son proporcionales a los antes mencionados donde principalmente el carbono se recupera en forma de CO₂, biomasa y en menor proporción en carbono orgánico en lixiviados, teniendo pérdidas en forma de subproductos.

7.3. Bioaerosoles en biofiltros

7.3.1. Caracterización de Bioaerosoles por Cultivo en placa

La Ilustración 15 muestra los promedios de las concentraciones medidas de bioaerosoles en cada una de las etapas por cultivo en placa. De manera general se observa una tendencia creciente de emisión bioaerosoles al pasar el tiempo de operación y además, a la salida del reactor se encuentra una mayor cantidad de bioaerosoles.

En la etapa 1 se tiene una gran cantidad de bioaerosoles en la salida, esto se debe a que el lodo no está bien adherido al soporte y el flujo de aire arrastra microorganismos con metabolismo activo, la salida muestra casi 8 veces más

cantidad de UFC/m³ que la entrada. En la etapa 2 se observa que ambas corrientes disminuyen la concentración de bioaerosoles, en la entrada se registró una reducción en la emisión de bioaerosoles del 40% y en la salida de más del 60% de disminución respecto a la etapa 1. En las siguientes etapas (3 y 4) se puede ver un aumento en la concentración de ambas corrientes gradualmente. Con base a lo mencionado anteriormente no podemos indicar que los resultados del conteo de microorganismos en placa es el total de bioaerosoles en la muestra, solo se contabilizan las células cultivables presentes. Los resultados indican que en la entrada se tienen menos microorganismos cultivables que en la salida, y si bien es un buen parámetro de aproximación de lo que se tiene en las corrientes no se puede tomar como un número de microorganismos absoluto. En la etapa 5 se observó un emparejamiento entre la corriente de entrada y salida, lo que nos indica que la viabilidad de los microorganismos está comprometida.

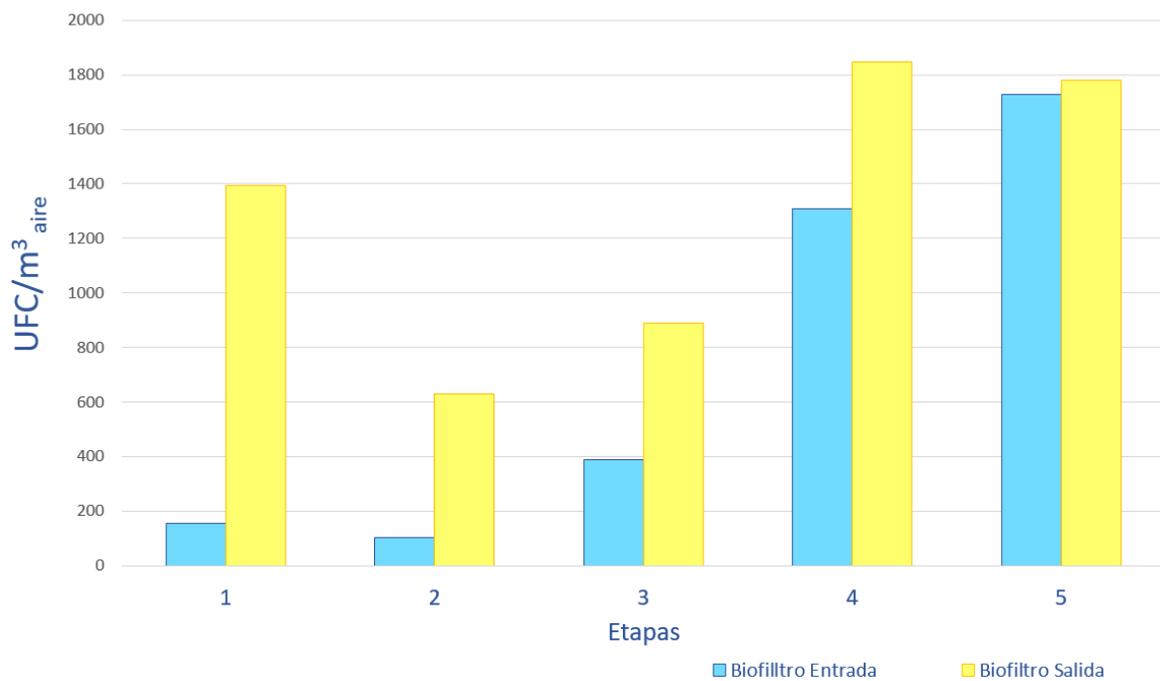


Ilustración 15. Bioaerosoles por cultivo en placa.

Los resultados obtenidos son muy similares a los reportados anteriormente ⁵⁴⁻
⁵⁹ donde se obtienen UFC/m³aire con magnitudes de 10³ y 10⁴ al igual que en este

estudio. Vergara et al. ⁵⁴ reporta que en los días de operación donde hay ER altas se tiene una menor cantidad de bioaerosoles, lo que también sucede en la etapa 2, donde se alcanzan porcentajes de eliminación de 100% para AE y superiores a 80% de T, indicando que cuando hay una alta eficiencia del biofiltro con condiciones favorables para los microorganismos las células viables cultivables no son desprendidas del reactor.

En el paro de alimentación que se llevó a cabo al término de la etapa 2 se observó una disminución en la emisión de bioaerosoles durante la primera semana de la etapa 3, seguida de una regulación cercana al promedio que se muestra en la ilustración 15 en el tiempo restante a la etapa 3. Esto pudo deberse al estrés que estuvieron sometidos los microorganismos y al no tener alimento, la biopelícula pudo haberse desprendido durante el periodo de paro y posterior a este la concentración de UFC disminuyó como se observó en el estudio de Esquivel et al. (2017) ⁶⁰ para después tener una operación estable y una emisión de microorganismos dependiente de las condiciones de operación.

7.3.2. Caracterización de Bioaerosoles por Citometría de flujo

7.3.2.1. Validación de la técnica de citometría de flujo

Para validar la técnica de citometría fue necesario primeramente realizar una serie de pruebas para garantizar que los fluorocromos tiñeran exactamente lo que se indica en la literatura y descartar el error del equipo que se puede presentar debido a la sensibilidad del mismo. Se corrieron y analizaron las pruebas como se indica en la Ilustración 16, de estas pruebas se logró delimitar las zonas a las que corresponde cada variante y sobre todo lograr separarlas sin interferencia. Las células vivas son de un cultivo de *E. coli* a 24 horas de su inoculación y las células muertas son *E. coli* aplicando un tratamiento térmico.

La imagen a) es una muestra solo de PBS para dimensionar la sensibilidad del equipo, como se observa el equipo detecta cualquier partícula por muy pequeña que sea, pero está delimitada dentro de los rangos de 10 en los que se descarta fluorescencia según el protocolo de uso de los fluorocromos y debido a que son partículas muy finas con poca fluorescencia pero que no se puede tomar como

fluorescencia debida a los fluorocromos. En la imagen b) se agrega PI y TO a una muestra de PBS filtrado y esterilizado sin muestra celular mostrando que las partículas de analizadas se recorren un poco en el eje Y en la intensidad de PI, esto debido a que es un fluorocromo con una alta intensidad de fluorescencia y el hecho de solo estar presente ya muestra un poco de fluorescencia sin necesidad de que este adherida en si a células. En la imagen c) solo se corre una muestra con células tanto vivas como muertas con la finalidad de descartar auto fluorescencia de las células mostrando partículas en el rango menor de 10 en ambos ejes.

Las imágenes d, e y f son células vivas. En d) las células se tiñen solo con TO mostrando la fluorescencia esperada solo en el eje X de intensidad de fluorescencia para TO que tiñe todas las células. Cuando se tiñen solo con PI en la imagen e) no se observa fluorescencia y cuando se tiñen con ambos (f) la fluorescencia solo se presenta por parte de TO.

En las imágenes g, h e i se evalúan células muertas. En g) se observa como TO tiñe todas las células, vivas y muertas y PI marca solo células muertas mostrando una intensidad de fluorescencia alta en el eje Y, una vez que se tiñen con los 2 fluorocromos se ve un solapamiento de ambos tintes, esto es debido a la alta cantidad de células, este comportamiento también se observa en el inciso j en el que se tienen células vivas y muertas teñidas con ambos fluorocromos.

En la imagen k) se tiene una muestra tomada del biofiltro teñida con TO y PI mostrando que la concentración celular en las muestras que se van a estudiar es muy baja y esto da paso a tener una mayor separación de fluorocromos. Por último, se requería comprobar si el error de solapamiento en los fluorocromos se debía a la concentración celular, para esto se aplicó tratamiento térmico a la muestra tomada del biofiltro, se tiñó con ambos tintes y se puede observar claramente que el TO no presenta problemas de solapamiento a la hora de la tinción con una concentración celular menor.

Una vez realizadas las pruebas con los tintes adecuados se prosiguió al análisis de cada muestra previamente colectada y almacenada a -20°C .

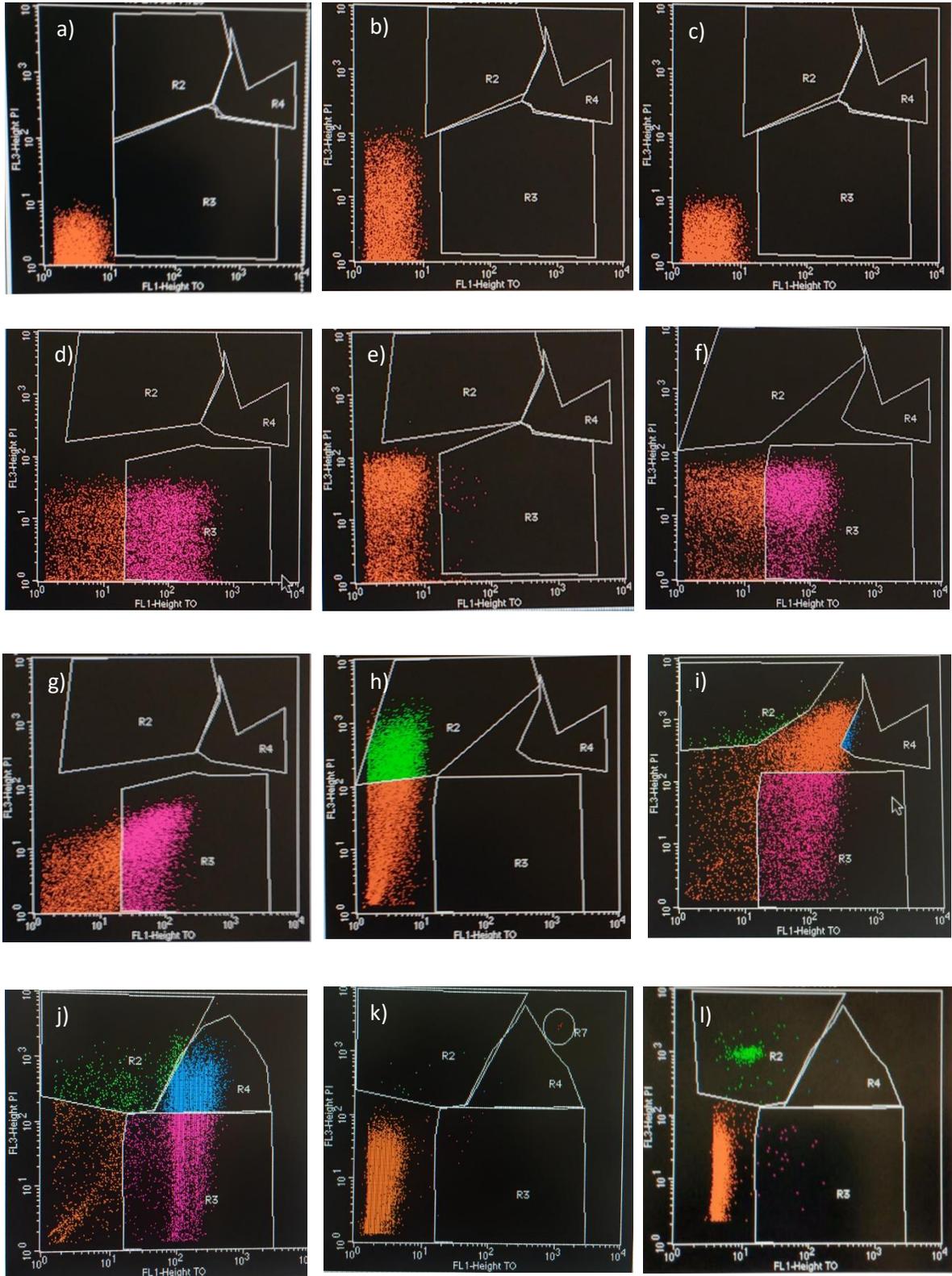


Ilustración 16. a) PBS de toma de muestra. b) PBS con adición de PI y TO. c) Células vivas. d) Células vivas teñidas con TO. e) con PI. f) y con PI y TO. g) Células muertas teñidas con TO. h) con PI. i) con PI y TO. j) Células vivas y muertas teñidas con TO y PI. k) Muestra del biofiltro con perlas. l) Muestra biofiltro con tratamiento térmico teñida con TO y PI.

7.3.2.2. Resultados de bioaerosoles obtenidos por citometría de flujo

Los resultados que se presentarán de Citometría de Flujo solo incluyen las células bacterianas contenidas en las muestras de bioaerosoles, las células fúngicas no fueron cuantificadas. Como se puede observar (Ilustración 17), en las pruebas de citometría de flujo se obtuvieron resultados sin una tendencia aparente a lo largo del tiempo, teniendo la mayoría de los datos un promedio de 5 millones de células/m³, tampoco se pudo confirmar que una corriente en específico (entrada o salida) contiene mayor cantidad de células en todo el tiempo de operación, en comparación con el cultivo en placa que muestra una mayor cantidad de microorganismos cultivables en la salida.

El biofiltro en la etapa 1 muestra una mayor cantidad de células en la entrada que en la salida, indicando que el biofiltro es capaz de retener bioaerosoles ¹. Esto puede deberse a la porosidad y a la humedad alta que aun presenta el biofiltro que facilita la retención de los bioaerosoles, la biopelícula está bien adherida al soporte y el medio mineral pasa libremente por todo el lecho arrastrando la biopelícula inerte sin necesidad de que se dirija a la corriente de aire.

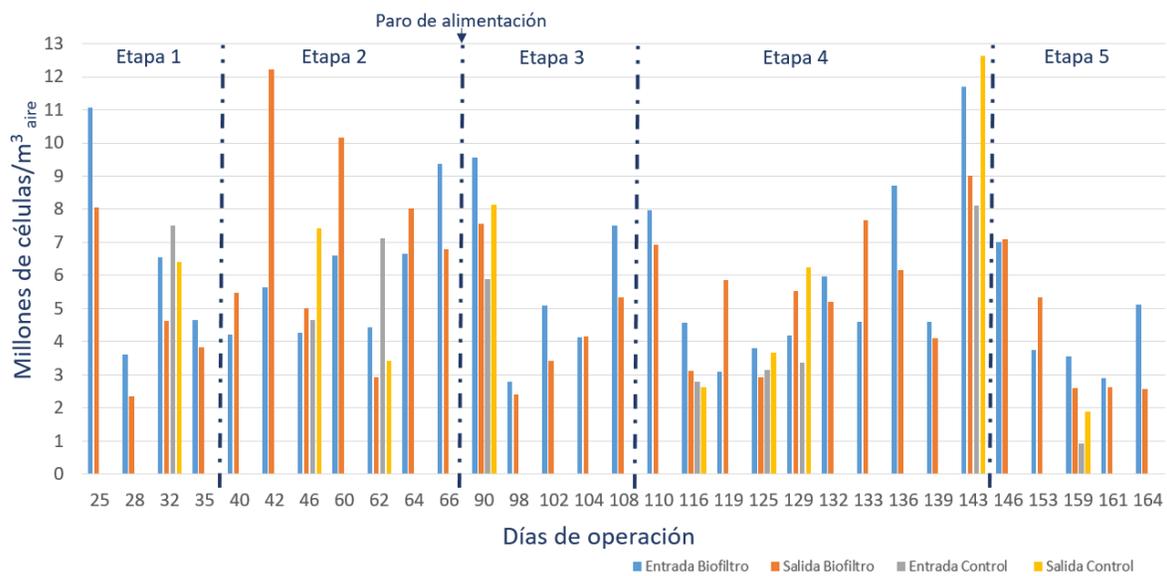


Ilustración 17. Cuantificación de Bioaerosoles por citometría de flujo en biofiltro y control, entradas y salidas.

En la etapa 2 hasta el día 63 se tuvieron salidas con más microorganismos que en la entrada, esto es nuevo ya que Vergara et al. (2012)⁵⁵ asegura que cuando se presentan ER mayores como el caso de la etapa 2 los microorganismos no son arrastrados en la corriente de aire. Al finalizar esta etapa y durante la 3, se invierte el comportamiento, aunque con una menor diferencia. Durante la etapa 3 una vez arrancado el biofiltro nuevamente y alcanzando un poco de estabilidad en el día 98 se observó una disminución en la cantidad de microorganismos en las corrientes, pero sobretodo no se observan diferencias en entradas y salidas. En la etapa 4 se alternan los días en los que se presentan mayores cantidades en la entrada y en la salida, esto puede deberse al paro de alimentación de AE y al colapso del sistema, así como también a variaciones de humedad y de presiones en el lecho. En la etapa 5 se tuvo un pico de disminución de bioaerosoles en todas las corrientes, lo anterior puede ser atribuido al paro de alimentación de T, pero también a un aspecto de cambio físico del empaquetamiento del lecho, se observó un orificio con el cual se permite el paso de aire libremente sin contacto con el lecho. En la etapa 5, el lecho ya no tiene porosidad y solo se permite el paso del aire y agua por las paredes.

De manera general se observó una relación entre entradas y salidas, pareciendo que la entrada y la salida están comportándose de una manera similar, pero en diferentes magnitudes, se tiene un aumento en la entrada y a su vez se observa un aumento en la salida, en la mayoría de las ocasiones, de manera más clara al final de la etapa 4 y en la etapa 5 donde se tiene un aumento de microorganismos en las corrientes para luego tener una disminución importante en todas las muestras. Esto bien puede deberse a la velocidad y la calidad del aire de entrada o bien puede estar influenciado por el aire ambiente. Con esto nos referimos a que la corriente de aire que requiere el impinger es complementada con aire ambiente filtrado, pero puede ser que el filtro utilizado no sea capaz de retener todos los microorganismos que se presentan en el aire ambiente y es por eso que el contenido de bioaerosoles en las corrientes presentan una similitud.

La corriente de entrada del filtro control muestra similitud con la muestra de entrada al biofiltro, lo que indica que son entradas parecidas en cuanto a

composición de bioaerosoles, ya que ambas provienen del mismo compresor. En cuanto a la salida esta tiene picos con diferencias importantes atribuyendo esto a que la humedad en el lecho del filtro control facilitó el crecimiento de hongos y estos fueron los responsables de aumentar la concentración de células salientes del filtro control. En cambio, en el biofiltro experimental, la biomasa se retiene o fija en el soporte para poder formar una biopelícula capaz de degradar los contaminantes que se estaban alimentando y por eso la concentración a la salida del biofiltro control al inicio de la operación era menor que la entrada, no así en el biofiltro experimental.

En la Ilustración 18 se puede ver la concentración de bioaerosoles a la entrada del biofiltro en función de las células vivas, muertas y comprometidas.

Las células con membrana comprometida no tuvieron una variación importante a lo largo del tiempo de operación, manteniéndose por debajo del millón de células/m³ de aire. En la etapa 1 se tuvo una cantidad de células muertas más alta que las células vivas y en las etapas 2, 3 y parte de la 4 la cantidad de células vivas fue la predominante, al final de la etapa 4 se tuvo un aumento importante en las células muertas, y en la etapa 5 se puede decir que fueron de igual cantidad las células muertas y las vivas.

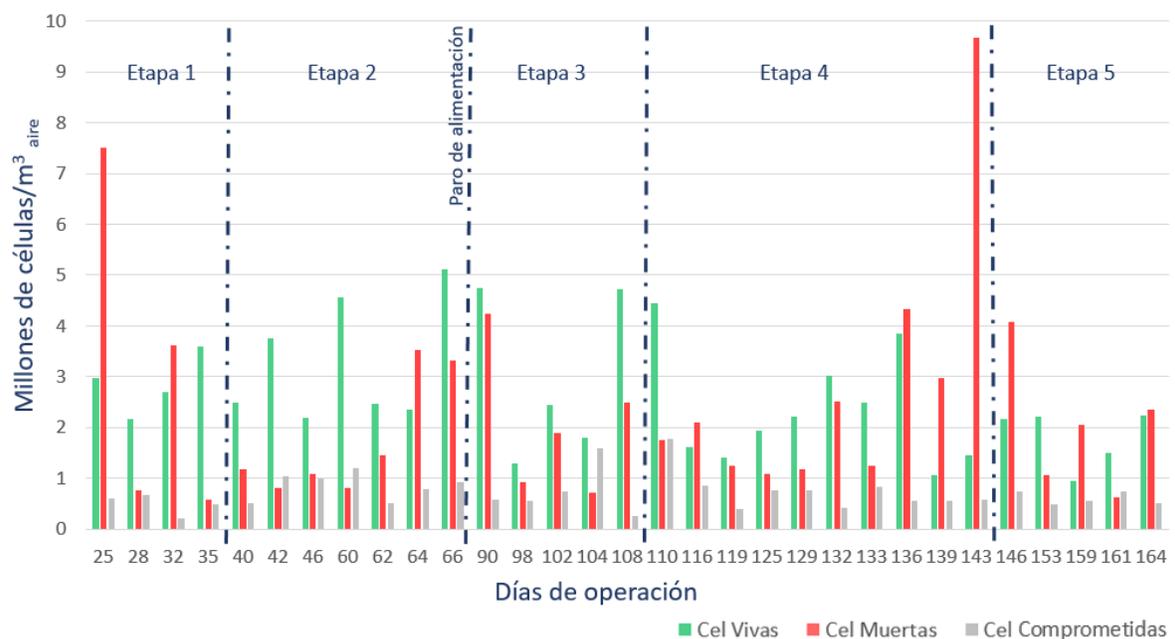


Ilustración 18. Células vivas, muertas y comprometidas en la corriente a la entrada del biofiltro.

La calidad de la corriente de entrada se debe más a cuestiones ambientales y a la operación del compresor y del humidificador, ya que no se filtró el aire en la entrada por cuestiones de costo en la operación y para determinar si el biofiltro era capaz también de retener bioaerosoles presentes en aire ambiente, acorde a lo observado, la respuesta es sí.

La caracterización de la corriente de salida se muestra en la ilustración 19, en las 3 primeras etapas se presentó una mayor cantidad de células vivas en los bioaerosoles y a partir de la etapa 4 y 5 la cantidad de células muertas aumentó, esto comprueba lo que anteriormente se ha dicho, que a partir de la etapa 4 se tuvo un decaimiento en el biofiltro, ya que en las corrientes de aire se tuvo una mayor cantidad de microorganismos muertos. Lo anterior, se atribuye directamente a los paros de alimentación de AE y T aplicados en las etapas 4 y 5, y también a cuestiones hidrodinámicas de compactación del lecho, sobre todo en la etapa final de operación. Durante la etapa 2, que fue la etapa en la cual se registró la mayor eficiencia de degradación de ambos contaminantes, se emitieron mayor cantidad de células vivas, aunque la cantidad de sólidos suspendidos volátiles no es la mayor dentro del biofiltro, pero nos indica que la mayoría de los microorganismos dentro del reactor presentaban un metabolismo activo lo que confirma la alta actividad de los mismos en esta etapa comparada con las etapas posteriores. Los trabajos en los que se contabilizan bioaerosoles en biofiltros por medio de cultivo en placa pueden comprobar que si se emiten bioaerosoles vivos del reactor ya que con el flujo de salida se obtiene una alta cantidad de microorganismos en el cultivo.

En la corriente de salida, se presentó el mismo comportamiento que en la entrada, los 135 primeros días la corriente de entrada está compuesta principalmente por células vivas y al finalizar la etapa 4 y durante la 5 las células muertas fueron las dominantes. Las células comprometidas se mantienen bajo un millón de células por m^3 a excepción de la etapa 2, en la que hay un aumento importante, llegando hasta 2.5 millones.



Ilustración 19. Células vivas, muertas y comprometidas en la corriente a la salida del biofiltro.

El comportamiento del biofiltro no es tan predecible como en los estudios anteriores de Vergara et al. (2012)^{54,55} donde se afirma que las salidas tienen una mayor concentración de microorganismos que la entrada. En el estudio dependiente de cultivo se ve este comportamiento y solo puede ser atribuible a que los microorganismos dentro del biofiltro al estar en condiciones controladas y no ser tan dinámicos son más fácilmente cultivables que los encontrados en el aire ambiente y considerando que el aire que entra a nuestro sistema proviene del exterior por medio de un compresor y no del interior, se puede justificar que sea tan dinámico y tan poco estable. Otra cosa importante es que los estudios previamente realizados en biofiltros, toman muestra del aire interior como estándar y no se percatan cual es la cantidad de microorganismos reales en la entrada del biofiltro⁵⁴, ya que esta corriente viene de un compresor normalmente y debido a las condiciones de humedad de este sistema, también se puede dar el cultivo de células en este equipo. Con este estudio se puede decir que la calidad del aire en la entrada dependerá más de las condiciones previas al biofiltro como el compresor, el humidificador y sobretodo el ambiente.

La disminución de microorganismos en la salida del biofiltro es muy evidente ya que, tanto en condiciones ambientales como en reportes anteriores ⁵⁴, la humedad favorece a la disminución en la cantidad de bioaerosoles emitidos, las gotas de agua atrapan los bioaerosoles y los llevan a la fase líquida o para el caso de partículas sólidas estas son capaces de atrapar también microorganismos.

El estudio de bioaerosoles por medio de citometría de flujo supera por 3 órdenes de magnitud los resultados obtenidos en cultivo en placa, lo que nos puede dar una cifra más acertada de los microorganismos reales que se encuentran en el aire, diferenciando entre vivos o muertos. Sin embargo, en estas muestras faltó determinar la concentración de bioaerosoles fúngicos, por lo cual las concentraciones reportadas aquí podrán ser mayores si se hubiesen contabilizado la fracción de hongos presente en los bioaerosoles. Ya que comprobamos que el cultivo en placa subestima la cantidad de bioaerosoles reales en el aire, dado que se ha reportado que solo el 1% de bacterias y el 17% de hongos conocidos se pueden cultivar en placa ^{3,4}.

El estudio de Esquivel et al. (2017) ⁶⁰, con epifluorescencia en un biofiltro empacado con perlita reportó resultados de 6×10^5 a 7×10^7 células/m³ de aire, lo que es comparable con los resultados obtenidos en este estudio en el que se reportó una concentración de 2 a 12×10^6 células/m³ de aire sin contabilización de hongos. Los resultados muestran diferencias de un orden de magnitud que se atribuyen a las diferentes condiciones de operación, pero ambos estudios muestran una mayor cantidad que en el cultivo en placa, lo que hace relevante y necesario desarrollar estudios de cuantificación y caracterización de bioaerosoles por métodos independientes de cultivo.

7.3.2.3. Estudio del efecto del almacenaje en la prueba

Recordando que las muestras de bioaerosoles se colectaron en PBS. Se hicieron varias pruebas de almacenaje de 48 hrs a temperatura ambiente, refrigerador y ultra congelador para evitar en mayor medida la perdida de viabilidad.

Tabla 10. Preservación de viabilidad por almacenaje.

Almacenaje 48 hrs	% Preservación de viabilidad
Temperatura ambiente	9%
Refrigerador (4°C)	58%
Ultra congelador (-80°C)	70%

Como indicador de viabilidad se analizaron 6 muestras recién tomadas, usando como parámetro las células vivas como 100% de viabilidad, luego, se destinan 3 triplicados a cada uno de los almacenajes durante 48 horas, para su posterior análisis y obtención de preservación de viabilidad.

A temperatura ambiente las células en PBS perdieron un 91% de viabilidad ya que a temperatura ambiente las células tienden a seguir con su reproducción de manera normal, pero esto no puede llevarse a cabo porque se encuentran en un medio falto de nutrientes. A 4°C ocurre lo mismo, solo se detiene un poco el metabolismo celular, pero se requieren aun así de un medio nutritivo ya que debido al tiempo se pueden ver afectados los microorganismos. A -80°C cualquier actividad biológica queda detenida, evitando la muerte, las pérdidas del 30% que se tienen son debido a los cristales de hielo que se forman y dañan las células, esto es evitable con glicerol, pero debido a la aguja fina que usa el citómetro de flujo no se permite su uso para proteger las muestras.

Estas pruebas de perdida de viabilidad se realizaron para ver el efecto del almacenaje de las muestras, para este estudio las muestras fueron congeladas a -80°C una vez que se tomaron y se analizaron posteriormente debido a la disponibilidad del equipo. Por lo que, bajo este resultado se tendría que corregir las concentraciones de bioaerosoles reportados tomando en cuenta la perdida de viabilidad por el almacenaje de la muestra.

8. Conclusiones

El acetato de etilo fue el contaminante más fácilmente biodegradable (ER~100%) respecto al tolueno (ER~50%).

Los resultados de bioaerosoles obtenidos en cultivo de placa son comparables con los reportados previamente en cuanto a concentración (10^3 UFC/m³_{aire}). Respecto a emisión, también se corrobora que se obtienen más UFC en la corriente de salida de aire del biofiltro que en la proveniente del aire ambiente, comprobando que la concentración de bioaerosoles cultivables en el aire de salida del biofiltro es mayor que a la entrada.

El uso de una técnica independiente de cultivo como la Citometría de Flujo acoplada a fluorocromos es adecuada para la cuantificación de bioaerosoles ya que permite resultados más precisos, independientemente de la viabilidad y cultivabilidad de las células. En este sentido, el PI y TO fueron fluorocromos adecuados para caracterizar los bioaerosoles en base a la viabilidad celular.

Se establecieron las condiciones de almacenaje adecuadas en comparación con las muestras recién tomadas, siendo la preservación a -80°C la que presenta menor daño a la célula, siendo ésta la más adecuada para conservar muestras de bioaerosoles para analizarlos posteriormente.

Se lograron establecer los parámetros adecuados en el equipo de CMF para el estudio a bajas concentraciones y lograr la separación con los fluorocromos propuestos por determinar la viabilidad de los microorganismos.

Las concentraciones de bioaerosoles determinados por CMF indican una densidad celular al menos tres órdenes de magnitud mayor que la obtenida por técnicas dependientes de cultivo en placa. De esta manera se demuestra que la CMF permite un conteo celular más cercano a la concentración real de bioaerosoles.

El biofiltro control no muestra una clara disminución de bioaerosoles en la corriente de aire como se esperaba.

9. Perspectivas

Es importante cuantificar las células fúngicas y para eso es necesario un citómetro equipado con un láser capaz de detectar Calcofluor- White que arrojará una concentración más exacta de las células reales en las muestras. Para esto también es importante analizar los diversos factores que influyen en el conteo en el citómetro de flujo, para tener una metodología optimizada validada que sea comprobable y repetible en cualquier muestra.

Escalando los resultados obtenidos en este estudio, es importante estandarizar los métodos de cuantificación actuales que se tienen para medir bioaerosoles. Estos en su mayoría están basados en métodos de cultivo en placa los cuales subestiman la concentración real de bioaerosoles, ya que menos del 10% de las células presentes en las muestras es cultivable, sería necesario que las agencias pertinentes estandaricen los métodos de cuantificación y caracterización de bioaerosoles para establecer normas ambientales actuales y homogéneas para el tipo de técnica de caracterización y cuantificación que se use.

10. Bibliografía

1. Sánchez-Monedero MA, Roig A, Cayuela ML, Stentiford EI. Emisión de bioaerosoles asociada a la gestión de residuos orgánicos. 2006;10(1):39-47.
2. Walser SM, Gerstner DG, Brenner B, et al. Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols - A systematic review. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(7):577-589. doi:10.1016/j.ijheh.2015.07.004.
3. Bridge P, Spooner B. Soil fungi diversity and detection.pdf. *Plant Soil*. 2001;232(1):147-154. doi:10.1023/A:1010346305799.
4. Chi M-C, Li C-S. Fluorochrome in Monitoring Atmospheric Bioaerosols and Correlations with Meteorological Factors and Air Pollutants. *Aerosol Sci Technol*. 2007;41(7):672-678. doi:10.1080/02786820701383181.
5. Fernandez Espinosa AJ. *Especiación Química Y Física E Metales En La Materia Particulada Atmosférica: Aplicación Al Estudio de La Contaminación Ambiental de La Ciudad de Sevilla*. Sevilla; 2001.
6. Figueruelo J, Marino M. *Química Física Del Ambiente Y de Los Procesos Medioambientales*. Barcelona, España; 2004.
7. Olaya D, Perez F, Sarmiento H, Pachon J. Caracterización cualitativa-cuantitativa de bioaerosoles relacionados con factores meteorológicos y material particulado en puente. 2006.
8. Ballester F. Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Rev Esp Salud Publica*. 2005;79(2):159-175.
9. ONU. Organización de las Naciones Unidas. <http://www.un.org/es/index.html>. Published 2016. Accessed June 21, 2015.
10. OMS. OMS | Organización Mundial de la Salud. *WHO*. 2016. <http://www.who.int/es/>. Accessed June 21, 2016.
11. Secretaria de Salud. Normas Oficiales Mexicanas.
12. Sánchez S, Orduz S. Sistemas biológicos para el manejo ambiental: Alternativas de control para contaminantes atmosféricos. :27-34.
13. Guitierrez O, Arriaga S. “ Efecto del material de empaque en la biofiltración de una mezcla de vapores de hexano , tolueno y metil-etil- cetona ”. 2009.
14. Tassi F, Capecchiacci F, Giannini L, Vougioukalakis GE, Vaselli O. Volatile organic compounds (VOCs) in air from Nisyros Island (Dodecanese Archipelago, Greece): Natural versus anthropogenic sources. *Environ Pollut*. 2013;180:111-121. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.023.
15. Kalogerakis N, Paschali D, Lekaditis V, Pantidou A, Eleftheriadis K, Lazaridis M. Indoor air quality - Bioaerosol measurements in domestic and office premises. *J Aerosol Sci*. 2005;36(5-6):751-761.

doi:10.1016/j.jaerosci.2005.02.004.

16. Esquivel S, Arriaga S, Aizpuru A. ¿Bioaerosoles en interiores? Un peligro para la salud. 2015:3.
17. Reyes J, Romero E, Reyes L, Pérez A, Aguirre C. Bioaerosoles depositados vía húmeda-seca en la zona metropolitana del valle de Toluca. *El ININ hoy*. 2005:16-23.
18. Lehtinen J, Tolvanen O, Nivukoski U, Veijanen A, Hänninen K. Occupational hygiene in terms of volatile organic compounds (VOCs) and bioaerosols at two solid waste management plants in Finland. *Waste Manag*. 2013;33(4):964-973. doi:10.1016/j.wasman.2012.11.010.
19. Li J, Zhou L, Zhang X, Xu C, Dong L, Yao M. Bioaerosol emissions and detection of airborne antibiotic resistance genes from a wastewater treatment plant. *Atmos Environ*. 2016;124:404-412. doi:10.1016/j.atmosenv.2015.06.030.
20. De La Rosa M, Mosso M., Ullán C. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Obs Medioambient*. 2002;5:375-402. doi:10.5209/REV_OBMD.2002.V5.22909.
21. Vélez-pereira AM, Camargo Y. COMPORTAMIENTO AERODINÁMICO Y. 2016;(November 2008).
22. Escalante G, Mondaca A. Viabilidad de bioaerosoles del desierto de atacama en aguas de lagos patagónicos. 2014.
23. Burrows SM, Butler T, Jöckel P, et al. Bacteria in the global atmosphere – Part 2: Modelling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmos Chem Phys Discuss*. 2009;9(3):10829-10881. doi:10.5194/acpd-9-10829-2009.
24. Ghosh B, Lal H, Srivastava A. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environ Int*. 2015;85:254-272. doi:10.1016/j.envint.2015.09.018.
25. Pérez M, Mota M. Morfología y estructura bacteriana. :23-42.
26. Carrera M, Zandomeni RO, Fitzgibbon J, Sagripanti J. Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. 2007;102:303-312. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03111.x.
27. Vivas K. Evaluación De La Calidad Microbiológica Del Aire De Una Planta Procesadora De Alimentos. 2010.
28. Henkel JS, Baldwin MR, Barbieri JT. Toxins from Bacteria. 2013:1-29.
29. Lazo RF, Sierra G. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:7-11.
30. Osorio AM, Santiago C, Wood GE. Programa de la FDA en Micotoxinas y

Requisitos de Importación.

31. Méndez-Alores A, Moreno-Martínez E. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia*. 2009;1-7.
32. PYROSTAR. El impacto de las endotoxinas en el cuerpo humano.
33. Bakutis B, Monstvilienė E, Januskeviciene G. Analyses of airborne contamination with bacteria, endotoxins and dust in livestock barns and poultry houses. *Acta Vet Brno*. 2004;73(2):283-289. doi:10.2754/avb200473020283.
34. Pérez I, Salinas E, Osorio Á. Endotoxinas, Daño Imperceptible. 2006.
35. Guitart R. *Tóxicos Los Enemigos de La Vida*. España; 2014.
36. REMA. Red Mexicana de Aerobiología UNAM - Polen.
37. Cariñanos P, Sánchez-Mesa JA, Prieto-Baena JC, et al. Pollen allergy related to the area of residence in the city of Córdoba, south-west Spain. *J Environ Monit*. 2002;4(5):734-738. doi:10.1039/b205595c.
38. Sales E, Cambra-López M. Airborne particulate matter and bioaerosols in poultry and rabbit houses: quantification, characterization and reduction measures. 2014.
39. Rosas I, Salinas E, Martínez L, Eslava C, Cravioto -Alejandro. Bacterias en la atmósfera. *SEMARNAT*. 2007.
40. Solà XG. Medición de contaminantes biológicos en aire.
41. Diaz Cardenas C. Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyaca. 2011.
42. Salgado M. Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). *IbtUnamMx*. 2002. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf>.
43. BARRERA RAMÍREZ LM, DRAGO SERRANO ME, PÉREZ RAMOS J, et al. CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2004;17(1):42-55.
44. Chen P-S, Li C-S. Real-time monitoring for bioaerosols—flow cytometry. *Analyst*. 2007;132(1):14-16. doi:10.1039/B603611M.
45. Chen P-S, Li C-S. Bioaerosol characterization by flow cytometry with fluorochrome. *J Environ Monit*. 2005;7(10):950-959. doi:10.1039/b505224f.
46. Chen P-S, Li C-S. Sampling Performance for Bioaerosols by Flow Cytometry with Fluorochrome. *Aerosol Sci Technol*. 2005;39(3):231-237. doi:10.1080/027868290925534.
47. Lange JL, Thorne PS, Lynch N. Application of flow cytometry and fluorescent

- in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(4):1557-1563.
48. Ibáñez PF. Desinfección con reactores solares : experiencia operativa. :259-276.
 49. Devinny JS, Deshusses MA, Webster TS. *Biofiltration for Air Pollution Control.* Lewis Publishers; 1999.
 50. EPA, CATC. Uso de biorreactores para controlar la contaminación del aire. 2004:3-24.
 51. Taylor P, Gracy S, Hort C, Platel V, Gidas MB. Volatile Organic Compounds (VOCs) Biofiltration with Two Packing Materials VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (VOCs). 2010;(October 2014):37-41. doi:10.1080/09593332708618719.
 52. Betancourth M, Botero E, Rivera S. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb Med.* 2004;35(Supl 1):34-39.
 53. EPA. *USING BIOREACTORS TO CONTROL USING BIOREACTORS TO CONTROL.*; 2003.
 54. Vergara-Fernández A, Salgado-Ísmodes V, Pino M, Hernández S, Revah S. Temperature and moisture effect on spore emission in the fungal biofiltration of hydrophobic VOCs. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012;87(6):778-784. doi:10.1002/jctb.3762.
 55. Vergara-Fernández A, Hernández S, Muñoz R, Revah S. Influence of the inlet load, EBRT and mineral medium addition on spore emission by *Fusarium solani* in the fungal biofiltration of hydrophobic VOCs. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012;87(6):778-784. doi:10.1002/jctb.3762.
 56. Zilli M, Camogli G, Nicoletta C. Detachment and emission of airborne bacteria in gas-phase biofilm reactors. *Biotechnol Bioeng.* 2005;91(6):707-714. doi:10.1002/bit.20571.
 57. Ottengraf SPP, Konings JHG. Emission of microorganisms from biofilters. *Bioprocess Eng.* 1991;7(1-2):89-96. doi:10.1007/BF00383584.
 58. Wang C, Xi JY, Hu HY. Reduction of Toxic Products and Bioaerosol Emission of a Combined Ultraviolet-Biofilter Process for Chlorobenzene Treatment. *J Air Waste Manage Assoc.* 2009;59(4):405-410. doi:10.3155/1047-3289.59.4.405.
 59. Saucedo-Lucero JO, Quijano G, Arriaga S, Muñoz R. Hexane abatement and spore emission control in a fungal biofilter-photoreactor hybrid unit. *J Hazard Mater.* 2014;276(January):287-294. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.040.
 60. Esquivel-Gonzalez S, Aizpuru A, Patrón-Soberano A, Arriaga S. Characterization of bioaerosol emissions from two biofilters during treatment

- of toluene vapours using epifluorescence microscopy. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017;123:78-86. doi:10.1016/j.ibiod.2017.06.007.
61. Álvarez Hornos FJ. *Tratamiento de Emisiones a La Atmósfera de Acetato de Etilo Y Tolueno Mediante Biofiltros de Turba.*; 2009. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 62. *Hoja de Seguridad Tolueno.* Vol 92.
 63. Fichas Internacionales de Seguridad Química Tolueno. (li).
 64. *Hoja de Seguridad de Acetato de Etilo.*
 65. *Fichas Internacionales de Seguridad Química Acetato de Etilo.*; 1994.
 66. Springorum a. C, Clauß M, Hartung J. A Temperature-Controlled AGI-30 Impinger for Sampling of Bioaerosols. *Aerosol Sci Technol.* 2011;45(10):1231-1239. doi:10.1080/02786826.2011.588275.
 67. Sigma-Aldrich. *18909 Calcofluor White Stain Product Information.*
 68. Mason DJ, Shanmuganathan S, Mortimer FC, Gant VA. A fluorescent gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(7):2681-2685.
 69. BD™ Cell Viability Kit STORAGE. 2015.
 70. Holm C, Mathiasen T, Jespersen L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. 2004:935-941. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02346.x.
 71. Jiménez L. Evaluación de la repetibilidad del proceso de biofiltración de vapores de tolueno, y del efecto de paros de aire y contaminante. 2014.
 72. Song J, Kinney KA. Microbial response and elimination capacity in biofilters subjected to high toluene loadings. 2005:554-559. doi:10.1007/s00253-005-1956-8.
 73. X., Zhao L. W, D. L. Biofiltration of toluene in the absence and the presence of ethyl acetate under continuous and intermittent loading. *J Chem Technol Biotechnol.* 2008;82(May):1115-1121. doi:10.1002/jctb.
 74. Hwang SCJ, Lee CM, Lee HC, Pua HF. Biofiltration of waste gases containing both ethyl acetate and toluene using different combinations of bacterial cultures. *J Biotechnol.* 2003;105(1-2):83-94. doi:10.1016/S0168-1656(03)00190-1.
 75. Wang C, Kong X, Zhang X. Mesophilic and thermophilic biofiltration of gaseous toluene in a long-term operation : Performance evaluation , biomass accumulation , mass balance analysis and isolation identification. *J Hazard Mater.* 2012;229-230:94-99. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.069.
 76. Covarrubias I, Arriaga G. Effect of the continuous of ozone in a “ Título de la

addition biofilter treating ethyl acetate vapors. 2016.