

**IPICYT**

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

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**“Efecto del material de empaque en la biofiltración de  
una mezcla de vapores de hexano, tolueno y metil-etil-  
cetona”.**

Tesis que presenta

**Olga Brígida Gutiérrez Acosta**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Aplicadas**

En la opción de:

**Ciencias Ambientales**

Directora de Tesis:

**Dra. Sonia Lorena Arriaga García**

Asesores de Tesis:

**Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios**

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

**Dr. Armando Almendárez Camarillo**

San Luis Potosí, S.L.P., México, septiembre de 2009.



## Constancia de aprobación de la tesis

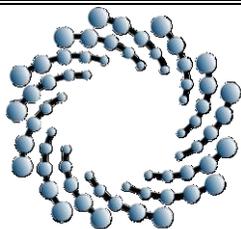
La tesis “**Efecto del material de empaque en la biofiltración de una mezcla de vapores de hexano, tolueno y metil etil cetona**”, presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias Aplicadas, en la opción de Ciencias Ambientales, fue elaborada por **Olga Brígida Gutiérrez Acosta**, y aprobada el **31 de agosto de 2009** 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  
(Directora de tesis)

Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios  
(Asesor de tesis)

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo  
(Asesor de tesis)

Dr. Armando Almendárez Camarillo  
(Asesor de tesis)



**IPICYT**

## **Créditos Institucionales**

Fondos Mixtos Guanajuato otorgó apoyo financiero para la realización de este trabajo, mediante el proyecto FOMIX 2007-69240 concedido a la Dra. Sonia Lorena Arriaga García.

Esta tesis fue elaborada en los laboratorios 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.

Durante la realización de este trabajo, la autora Olga Brígida Gutiérrez Acosta recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 211827) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Se agradece al Dr. Sergio Casas Flores, Profesor Investigador del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C, por facilitar el trabajo realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa. Dicho laboratorio pertenece a la División de Biología Molecular del mismo Instituto.

Se agradece al Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios, Profesor Investigador del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., por facilitar el material necesario para la síntesis del poliuretano modificado con almidón, así como su asistencia técnica durante la síntesis de este material.

Se agradece al Dr. Armando Almendárez Camarillo, Profesor Investigador del Instituto Tecnológico de Celaya, por sintetizar y proporcionar el polipropileno reforzado con fibras de agave.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 025 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de septiembre del año 2009, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Armando Almendárez Camarillo</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>Instituto Tecnológico de Celaya</b>
<b>Dra. Sonia Lorena Arriaga García</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Olga Brígida Gutiérrez Acosta**

sobre la Tesis intitulada:

*Efecto del material de empaque en la biofiltración de una mezcla de vapores de hexano, tolueno y metil-etil-cetona*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Sonia Lorena Arriaga García**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de septiembre de 2009.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Borjila Marín**  
Secretario Académico



*Dedicada a mis padres, y Con especial cariño para mis sobrinos: Dulce Maria, José Manuel, José Rogelio, Carmen Cecilia, Germán Alain, Pablo Samuel, Laura Regina, y Lucero del Consuelo.*

*Para Olga Valentina, César Uñaki y Emiliano Alonso, como ejemplo para que aspiren siempre a ser mujer y hombres de bien, libres y mejores.*

*Que su sonrisa tan linda que siempre me acompaña perdure en la eternidad.*

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento para el Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios, porque confió en mí, porque me ofreció un apoyo incondicional y desinteresado, por brindarme su amistad, y por compartirme sus conocimientos.

Gracias a las personas que me asesoraron en la realización de este trabajo: Dra. Sonia Arriaga, nuevamente Dr. Vladimir Escobar, Dr. Francisco Cervantes y Dr. Armando Almendárez. Les agradezco el tiempo dedicado, y los consejos brindados.

A la Maestra Dulce Partida, por ofrecerme su amistad, y por el apoyo otorgado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Elisabeth Huber Sannwald, por su amistad, y por los consejos que me ha dado.

Gracias a quienes me apoyaron en momentos difíciles: José, Reyes, Alma, Bere, Nancy, y Rebeca.

Agradezco a las personas que contribuyeron en mi formación académica durante mi estancia en el IPICYT: Dr Vladimir Escobar, Dr. Elías Razo, Dr. René Rangel, Dr. Francisco Cervantes, Dr. José Luis Morán, Dra. Catalina Alfaro, Dra Elisabeth Huber, Dra Sonia Arriaga, Dra. Berenice Celis, Dr. Felipe Alatraste, Dr. Ricardo Femat, Sidney Jimenez.

Agradezco sinceramente al personal que labora en el IPICYT, por el apoyo y las facilidades otorgadas: Angélica Acosta, Ivonne Cuevas, Edith Rodríguez, Ofelia Rico, Laura Sánchez, Daniel Ramírez, Víctor Mata, Guillermo Vidriales, Gerson Vázquez, y Elizabeth Ramírez.

A mis compañeros del Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa: Miguel Salas, Edith Uresti, Mayté Cervantes, Claudia Peresson, Javier Montalvo, Paco, Liz, y Sra. Mari, por hacer agradable mi estancia con ellos. En especial, agradezco a Miguel Silva, por su asistencia técnica, y el tiempo que dedicó a mi trabajo.

## Contenido

Constancia de aprobación de la Tesis	I
Créditos Institucionales	II
Acta de examen	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Lista de Tablas	X
Lista de Figuras	XI
<b>Resumen.</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>3</b>
<b>2. Estado del Arte.</b>	<b>7</b>
2.1 Contaminación del aire. <b>7</b>	
2.2 Análisis de la contaminación del aire en México. <b>8</b>	
2.2.1 Calidad del aire en la ciudad de León Guanajuato. <b>9</b>	
2.3 Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs). <b>10</b>	
2.4 Técnicas para el tratamiento de efluentes gaseosos. <b>12</b>	
2.4.1 Métodos biológicos. <b>14</b>	
2.4.1.1 Biofiltración. <b>14</b>	
2.4.1.1.1 Materiales de empaque. <b>18</b>	
2.4.1.1.2 Especies y poblaciones microbianas en sistemas de biofiltración. <b>23</b>	
<b>3. Justificación.</b>	<b>25</b>
<b>4. Objetivos e Hipótesis.</b>	<b>27</b>

4.1 Objetivo general.	27	
4.1.1 Objetivos específicos.	27	
4.2 Hipótesis.	27	
<b>5. Materiales y Métodos.</b>		<b>28</b>
5.1 Síntesis del poliuretano modificado con almidón.	28	
5.2 Experimentos de biodegradación en lote.	29	
5.2.1 Reactivos.	29	
5.2.2 Inóculo y Medio Mineral.	29	
5.2.3 Biodegradación de hexano, tolueno y MEC en lote.	29	
5.3 Biodegradación de Hexano, Tolueno y MEC en un biofiltro empacado con Perlita.	30	
5.4 Biodegradación de Hexano, Tolueno y MEC en un biofiltro empacado con poliuretano y polipropileno modificados.	30	
5.5 Métodos analíticos.	31	
5.5.1 Espectrometría de absorción en el infrarrojo.	31	
5.5.2 Análisis termogravimétrico.	32	
5.5.3 Análisis de fisorción con nitrógeno.	32	
5.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).	32	
5.5.5 Cromatografía de gases.	33	
5.5.6 Determinación de proteína.	33	
5.5.7 pH.	33	
5.6 Aislamiento e identificación de cepas fúngicas degradadoras de tolueno, hexano y MEC.	34	
5.6.1 Aislamiento de las cepas fúngicas.	34	
5.6.2 Extracción de ADN.	34	

- 5.6.3 Amplificación de ADN. 34
- 5.6.4 Ligación con el vector pGEM-T. 35
- 5.6.5 Transformación de células de *Escherichia coli*. 35
- 5.6.6 Identificación de las cepas fúngicas. 35

## **6. Resultados y discusión. 36**

- 6.1 Experimentos en lote con el PU modificado. 36
  - 6.1.1 Biodegradación de hexano, tolueno y MEC en lote. 36
  - 6.1.2 Microscopía electrónica de barrido de los compositos. 45
  - 6.1.3 Caracterización de los compositos. 48
- 6.2 Biofiltración en el reactor empacado con Perlita (BP). 51
  - 6.2.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BP. 51
  - 6.2.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BP. 53
  - 6.2.3 Capacidad de eliminación en cada sección del reactor BP. 54
  - 6.2.4 Efecto de la carga sobre la CE en el reactor BP. 56
  - 6.2.5 Microscopía electrónica de barrido en BP. 58
- 6.3 Biofiltración en el reactor empacado con Poliuretano modificado con almidón (BPU). 59
  - 6.3.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BPU. 59
  - 6.3.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BPU. 61
    - 6.3.3 Efecto de la carga sobre la CE en el reactor BPU. 62
      - 6.3.3.1 CE de hexano en función de la carga. 62
      - 6.3.3.2 CE de tolueno en función de la carga. 63

6.3.3.3 CE de MEC en función de la carga.	65
6.3.3.4 CE total de hexano, tolueno y MEC en función de la carga.	66
6.3.4 Microscopía electrónica de barrido en BPU.	67
6.4 Biofiltración en el reactor empacado con Polipropileno reforzado con fibra de agave (BPP).	69
6.4.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BPP.	69
6.4.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BPP.	70
6.4.3 Microscopía electrónica de barrido en BPP.	72
6.5 Comparación del material de empaque en el desempeño del biofiltro.	74
6.6 Aislamiento e Identificación de especies degradadoras de hexano, tolueno y MEC.	84
<b>7. Conclusiones.</b>	<b>89</b>
<b>8. Perspectivas.</b>	<b>91</b>
<b>Referencias</b>	<b>92</b>
<b>Anexos</b>	<b>98</b>
Anexo I Mapa del vector de clonación pGEM-T.	98
Anexo II Termogramas de los compositos M1, M2, M3 y M4.	99
Anexo III Termogramas de la Perlita y del polipropileno reforzado.	101
Anexo IV Secuencias de ADN de <i>Fusarium solani</i> y <i>Nectria haematococca</i> .	102

## Lista de Tablas

Tabla 2.1. Efectos a la salud humana de algunos compuestos orgánicos volátiles.	11
Tabla 2.2 Propiedades químicas de algunos COVs.	12
Tabla 2.3 Clasificación de los reactores biológicos en el tratamiento de aire.	14
Tabla 2.4 Biodegradabilidad de algunos compuestos.	18
Tabla 2.5 Capacidades de eliminación (CE) obtenidas con los materiales diferentes.	21
Tabla 5.1 Mezclas de reacción para la síntesis de material con base en PU.	28
Tabla 6.1 Velocidad de producción de CO <sub>2</sub> medida en el día 15	42
Tabla 6.2 Velocidades de reducción de la concentración en fase gas con PU modificado y concentración de biomasa final.	43
Tabla 6.3 Capacidad de retención de agua de cada material estudiado.	50
Tabla 6.4 Cantidad de biomasa final en la Perlita en la sección 1 (S1) y en la sección 2 (S2) del biofiltro BP.	55
Tabla 6.5 Concentración de biomasa en el composito M4, en el día 70 de la operación del reactor BPU, a diferentes alturas.	68
Tabla 6.6 Concentración de biomasa final en el composito PP-Fibra en el día 70 de operación del reactor BPP a diferentes alturas.	73
Tabla 6.7 Características del material de empaque de los biofiltros.	74
Tabla 6.8 Comparación de la CE máxima y CE crítica de la mezcla de contaminantes, y contenido de biomasa final.	76
Tabla 6.9 Porosidad y compactación final obtenida con los tres diferentes materiales, y su relación con el diámetro de partícula.	77
Tabla 6.10 Identificación de las secuencias genómicas.	87

## Lista de Figuras

Figura 2.4.1. Aplicabilidad de las tecnologías para el tratamiento de aire.	13
Figura 2.4.2. Mecanismo de biofiltración	16
Figura 6.1.1 Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el material M1.	36
Figura 6.1.2 Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el composito M2.	38
Figura 6.1.3 Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el composito M3.	40
Figura 6.1.4 Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el composito M4 (40 % almidón)	41
Figura 6.1.5 Micrografías del material M1	45
Figura 6.1.6 Micrografías del material M2	46
Figura 6.1.7 Micrografías del material M3.	46
Figura 6.1.8 Micrografías del material M4.	47
Figura 6.1.9 Espectros de absorción en el infrarrojo con Transformada de Fourier sobre el material con base en PU.	49
Figura 6.2.1 Capacidad de eliminación para hexano, tolueno y MEC obtenidas en el reactor BP.	51
Figura 6.2.2 Capacidad de eliminación total en el reactor BP	53
Figura 6.2.3 Remoción en las secciones S1 y S2 del reactor BP,	54
Figura 6.2.4 Efecto de la carga de contaminantes sobre la capacidad de eliminación en el reactor BP.	57
Figura 6.2.5 Micrografías de la Perlita.	58
Figura 6.3.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno, y MEC obtenidas en el reactor BPU.	59

Figura 6.3.2 Capacidad de eliminación total en el reactor BPU.	<b>61</b>
Figura 6.3.3 Efecto de la carga de hexano en la capacidad de eliminación en el reactor BPU.	<b>62</b>
Figura 6.3.4 Efecto de la carga de tolueno en la capacidad de eliminación en el reactor BPU.	<b>64</b>
Figura 6.3.5 Efecto de la carga de MEC en la capacidad de eliminación en el reactor BPU.	<b>65</b>
Figura 6.3.6 Efecto de la carga total de contaminantes en la capacidad de eliminación en el reactor BP.	<b>66</b>
Figura 6.3.7 Micrografías del PU.	<b>67</b>
Figura 6.4.1 Capacidad de eliminación para hexano, tolueno y MEC en el reactor BPP.	<b>69</b>
Figura 6.4.2 Capacidad de eliminación total en el reactor BPP	<b>70</b>
Figura 6.4.3 Micrografías del compuesto PP-Fibra.	<b>72</b>
Figura 6.5.1 Micrografías de los compositos a diferentes alturas del reactor.	<b>79</b>
Figura 6.5.2 Termograma del material PU-almidón al final de la operación del reactor a diferentes alturas de la columna.	<b>81</b>
Figura 6.5.3 Termograma del material PP-Fibra al final de la operación del reactor a diferentes alturas de la columna.	<b>82</b>
Figura 6.6.1 Morfología de los hongos vista en el microscopio electrónico.	<b>85</b>
Figura 6.6.2 ADN Plasmídico de las clonas aisladas.	<b>86</b>

## Resumen

El material de empaque en sistemas de biofiltración actualmente es de gran interés de estudio debido al efecto que tiene en el desempeño del biofiltro. En este trabajo se estudió la biodegradación de una mezcla de hidrocarburos compuesta por hexano, tolueno y MEC en un biofiltro utilizando diferentes materiales de empaque: Perlita, Poliuretano modificado con almidón y un soporte de polipropileno reforzado con fibras de agave. A partir de una carga constante de contaminantes de  $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , se obtuvo en el día 24 una Capacidad de Eliminación (CE) de  $95 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  cuando se utilizó Perlita, mientras que con Poliuretano modificado se obtuvo una CE de  $104 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  en el día 1. A diferencia de éstos materiales, con el Polipropileno reforzado solamente se logró una CE máxima de  $66 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  en el día 41, y que posteriormente fue disminuyendo con el tiempo sin lograr recuperarse. Las variaciones de carga en el estado estable arrojaron datos de CE críticas de 200 y  $300 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ; y CE máximas de 220 y  $435 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para la Perlita y el Poliuretano modificado, respectivamente. El biofiltro empacado con polipropileno modificado no permitió hacer variaciones de carga debido a que no se logró estabilizar. La velocidad específica de biodegradación de la mezcla de hidrocarburos, en el biofiltro, fue de  $520 \text{ mg}_{\text{hidrocarburos}} \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}}\text{h}^{-1}$  con el Poliuretano modificado; y de  $80 \text{ mg}_{\text{hidrocarburos}} \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}}\text{h}^{-1}$  con la Perlita.

## Abstract

The packing material in biofiltration systems is of great research interest due to its effect on the biofilter performance. In this work it was studied the biodegradation of a mixture of hydrocarbons composed by hexane, toluene and MEK, in a biofilter using different packing materials: Perlite, Polyurethane modified with starch and Polypropylene reinforced with agave fibers. From a constant inlet load of  $180 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  it was obtained an EC of  $95 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  on day 24 with Perlite as packing material, and with modified polyurethane it was obtained an Elimination Capacity (EC) of  $104 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  on day 1. Meanwhile, with the reinforced polypropylene a maximum EC of  $66 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  was reached on day 41 and was and then it diminished along the time. The inlet load variations in the steady state showed values of critical ECs of 200 and  $300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ; and maximum ECs of 220 and  $435 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  for Perlite and the modified polyurethane, respectively. The biofilter packed with the modified polypropylene did not reach the steady state, and it was not possible to carry out the study of inlet load variations. Specific biodegradation rates of the hydrocarbon mixture, in the biofilter, were  $520 \text{ mg}_{\text{hydrocarbons}} \text{g}_{\text{protein}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for the modified polyurethane; and  $80 \text{ mg}_{\text{hydrocarbons}} \text{g}_{\text{protein}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for the Perlite.

## 1. Introducción

El estado del medio ambiente está relacionado con el crecimiento poblacional, debido a eso, la concentración de la población en áreas urbanas con frecuencia se asocia a la presencia de una gran actividad industrial, incremento del parque vehicular y, por tanto, elevado consumo de combustibles, que contribuyen en gran parte al problema de la contaminación atmosférica. Las emisiones de contaminantes a la atmósfera ocasionan serios problemas a nivel local en la salud de la población, y a los monumentos arquitectónicos. Por otro lado, y a nivel regional, afecta los bosques y ecosistemas acuáticos debido a la lluvia ácida. Además, repercute a nivel mundial afectando el cambio climático y la reducción de la capa de ozono.

En México, la calidad del aire es una constante preocupación, pues se ha observado una disminución de ésta, la cual se refleja en una menor visibilidad e incremento de molestias y enfermedades asociadas a la contaminación. La exposición humana a los contaminantes atmosféricos conlleva graves afecciones de la salud, como ataques de asma, bronquitis, enfermedades cardíacas, etc. Se ha encontrado que la inhalación de los contaminantes, aun en cantidades relativamente bajas, puede causar daños irreversibles a la salud. Debido a esto, la gestión de la calidad del aire en México se ha establecido como una prioridad para las autoridades ambientales. Los inventarios de emisiones han arrojado que los principales contaminantes que alteran la calidad del aire son: monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), compuestos clorofluorocarbonados (CFC), , ozono (O<sub>3</sub>) e hidrocarburos totales (HC) que generalmente son compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Instituto de Ecología, 2004).

Los COVs son motivo de preocupación tanto por su papel precursor de ozono, como por la alta toxicidad de algunos de ellos. Debido a su variedad no se conocen completamente sus efectos. Sin embargo, para algunos de ellos, como el

benceno, se ha reconocido su papel cancerígeno. Se ha observado que cuando las personas se exponen a algunos compuestos orgánicos volátiles, de manera inmediata experimentan síntomas como irritación de ojos y del tracto respiratorio, dolor de cabeza, desórdenes visuales y mareos. Por lo tanto, debido al impacto en la salud y medio ambiente de la exposición y emisión a COVs a nivel mundial, es necesario implementar técnicas de tratamiento *in situ* de estos contaminantes. Lo anterior permitiría reducir las emisiones de COVs a la atmosfera y con esto los efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud.

Las técnicas de tratamiento de este tipo de contaminantes más comúnmente utilizadas son los métodos fisicoquímicos y los métodos biológicos. Los métodos fisicoquímicos son aplicados principalmente cuando se tienen grandes flujos y concentraciones altas de contaminante. Con estos métodos puede lograrse la destrucción completa del contaminante, como el caso de la incineración. El tratamiento de COVs a través de métodos fisicoquímicos, en general, implica costos energéticos muy altos y en algunos casos se produce contaminación secundaria (NOx). Además, este tipo de tecnologías para el control de COVs son a menudo muy costosas, especialmente en aquellos casos donde la concentración del contaminante es baja y el flujo es alto.

Los métodos biológicos son utilizados para tratar corrientes de contaminantes con flujos altos y concentraciones bajas de contaminante. Estos métodos se basan en la capacidad de los microorganismos para transformar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos. El tratamiento biológico de COVs, parece ser una alternativa prometedora por su bajo costo y bajo impacto ambiental, ya que el proceso biológico puede llevarse a cabo a temperaturas cercanas a la ambiente, y a presión atmosférica. Dentro de este tipo de tratamiento se encuentra la técnica de biofiltración, la cual se basa en la capacidad de algunos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) para degradar una variedad de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos, haciendo uso de reactores biológicos mejor conocidos como biofiltros. Éstos consisten principalmente de una columna de lecho empacado sobre el cual los organismos

degradadores están naturalmente inmovilizados. Los microorganismos crecen sobre la superficie del soporte formando una biopelícula, en donde se lleva a cabo la eliminación del contaminante gaseoso. Los productos finales son principalmente CO<sub>2</sub>, agua y biomasa. El papel principal del material de empaque es soportar la biopelícula, pero también puede servir como un reservorio de nutrientes y agua.

Los materiales de empaque utilizados juegan un papel muy importante en todo tipo de reactores. En este sentido, este trabajo está enfocado en el efecto del material de empaque en los sistemas de biofiltración de emisiones gaseosas. La naturaleza y características del material tienen una gran influencia sobre la eficiencia de eliminación de los biofiltros. La función principal del empaque es propiciar el contacto entre los contaminantes en la fase gas y la biopelícula inmovilizada en la superficie del material. Las características principales que deben considerarse al momento de seleccionar un material de empaque son: pH, capacidad de retención de agua, área superficial, densidad, porosidad, resistencia mecánica y capacidad amortiguadora. Los materiales de empaque pueden ser materiales naturales orgánicos, naturales inorgánicos y sintéticos. En los estudios científicos de biofiltración, materiales de diferente naturaleza han sido utilizados, tal es el caso de carbón activado, turba, vermiculita, suelo, composta, perlita (aluminosilicatos), y los materiales sintéticos entre los que se encuentran los polímeros. Por esta misma vía se está investigando la modificación de algunos de estos materiales para propiciar diferentes factores que ayuden a la formación y fijación de la biopelícula, todo con el mismo fin de incrementar la biodegradación de COVs.

Debido a que el material de empaque juega un papel importante en los sistemas de biofiltración, el objetivo de este trabajo es evaluar el desempeño de tres reactores empacados con diferentes materiales de empaque como son Perlita, polipropileno reforzado con fibras de agave, y poliuretano modificado con almidón, durante el tratamiento de una mezcla definida de COVs que consiste en hexano, tolueno y metil etil cetona. Además, se tiene como objetivo realizar la

síntesis del poliuretano, el cual será modificado para promover el crecimiento de biomasa y aumentar la tasa de degradación de los COVs.

## **2. Estado del arte**

### **2.1 Contaminación del aire**

La contaminación ambiental se define como la presencia en el aire de sustancias y formas de energía en concentraciones que alteran la calidad del mismo, de modo que implique riesgos, daños o molestias graves para la salud de personas, medio ambiente en general, incluyendo animales, plantas, microorganismos, edificios y otros materiales hechos por el hombre. La concentración de la población en áreas urbanas con frecuencia se asocia a la presencia de una gran actividad industrial, incremento del parque vehicular y, por tanto, un elevado consumo de combustibles, que contribuyen en gran parte al problema de la contaminación atmosférica.

Las emisiones de contaminantes a la atmósfera ocasionan serios problemas a nivel local en la salud de la población, y a los monumentos arquitectónicos. Por otro lado, y a nivel regional, afecta los bosques y ecosistemas acuáticos debido a la lluvia ácida. Además, repercute a nivel mundial afectando el cambio climático y la reducción de la capa de ozono. En México, la calidad del aire es una constante preocupación, pues se ha observado una disminución de ésta, la cual se refleja en una menor visibilidad e incremento de molestias y enfermedades asociadas a la contaminación. Las emisiones gaseosas originadas de las diferentes actividades industriales son descargadas al ambiente al punto de sobrepasar la capacidad de purificación de los ecosistemas. La exposición de las personas a los contaminantes atmosféricos conlleva graves afecciones de la salud, como ataques de asma, bronquitis, enfermedades cardíacas, etcétera, y se ha encontrado que la inhalación de los contaminantes, aun en cantidades relativamente bajas, puede causar daños irreversibles a la salud. Por ejemplo, reducciones en la capacidad pulmonar de los niños. Asimismo, los resultados de algunos estudios epidemiológicos muestran que la exposición a ciertos contaminantes atmosféricos está asociada con un incremento de mortalidad por enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Debido a esto, la gestión de la calidad del aire en las ciudades mexicanas se ha establecido como una prioridad para las autoridades

ambientales. El monitoreo junto con los inventarios de emisiones son las herramientas básicas para la atención de estos problemas.

Las alteraciones en la composición del aire atmosférico son originadas por fuentes naturales y antropogénicas. Dentro de las naturales se encuentran las originadas por la vegetación: esporas de hongos y granos de polen; las originadas por erupciones volcánicas: partículas, cenizas, compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles, dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) y metano ( $\text{CH}_4$ ) (Vesilind y col.). Las emisiones biogénicas incluyen  $\text{NO}_x$ , hidrocarburos no metanogénicos, metano, monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

Las fuentes antropogénicas se dividen en dos grupos: a) Fuentes móviles originadas por el transporte en automóviles, aviones, embarcaciones, camiones, ferrocarril, etc. Las emisiones procedentes de estas fuentes, principalmente son  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{SO}_2$ , ozono ( $\text{O}_3$ ) e hidrocarburos totales (HC) y partículas de hollín. b) Las fuentes fijas son generadas por la industria de energía eléctrica y actividades industriales como: la química, maderera, textil, alimentaria, metalúrgica, curtiduría, imprentas, plantas de tratamiento de agua residual, plantas de composteo, rellenos sanitarios, etc. Los compuestos emitidos por las fuentes fijas son  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CH}_4$ , clorofluorocarbonados (CFC), partículas de hollín, y los HC que generalmente son compuestos orgánicos volátiles, de los cuales se hablará más adelante (SEMARNAT, 2002).

## **2.2 Análisis de la contaminación del aire en México**

Si bien las autoridades de salud tienen la responsabilidad de establecer los límites de las normas de los contaminantes atmosféricos, son las autoridades ambientales las que cuentan con la atribución de medir y evaluar los niveles de tales contaminantes en la atmósfera. Estas mediciones se llevan a cabo en las redes de monitoreo de la calidad del aire, siendo responsabilidad de los gobiernos locales, con apoyo técnico de la SEMARNAT, el operar y administrar dichas redes

(DOF, 2006). La información generada por las redes de monitoreo proporciona, junto con los inventarios de emisiones, la base para la toma de decisiones y el desarrollo de estrategias para abatir la contaminación, por lo que la medición y cuantificación de los contaminantes atmosféricos es clave en la gestión de la calidad del aire. En general, las estaciones de monitoreo deben estar ubicadas estratégicamente para cuantificar los niveles de contaminación en sitios representativos con el fin de caracterizar adecuadamente la contaminación en una región específica.

Según el inventario de emisiones más reciente de la ZMVM (INE-SEMARNAT 2007), las fuentes móviles emiten el 56, 82 y 35% de  $PM_{2.5}$  (partículas menores a 2.5 micras),  $NO_x$  y COVs, respectivamente. Siendo los últimos dos contaminantes precursores de  $O_3$ . En este mismo documento se reporta que el uso de disolventes fue el responsable del 41% de las emisiones de COVs.

### **2.2.1 Calidad del aire en la ciudad de León Guanajuato**

En el inventario de emisiones del año 2004, el Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEG, 2004), reportó que se emitieron cerca de 600 mil toneladas de contaminantes al aire, correspondiendo el 52% al sector transporte, el 27 % a comercios y servicios, 15 % le corresponden a la industria y el 6 % restante fue emitido por la vegetación y el suelo. El municipio de León contribuyó con el 30.2 % de la cantidad total de contaminantes emitidos al aire, seguido por el municipio de Salamanca con el 22.7 %. Dentro del mismo inventario, se reportó que el municipio de León contribuyó con el 37.92 % de los hidrocarburos totales. Lo anterior hace al municipio de León un lugar idóneo para establecer zonas de monitoreo de contaminantes atmosféricos, a partir de los cuales se puede proponer una solución para la transformación o eliminación de estos contaminantes.

En el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) ubicado en San Luis Potosí, se está trabajando en un proyecto de monitoreo de COVs en

ambientes de interiores de la industria del calzado, en León, Gto. Dentro del proyecto se tiene contemplado proponer un tratamiento biológico de la mezcla de contaminantes detectada en ese tipo de industrias, es aquí donde se inserta el presente trabajo.

### **2.3 Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)**

Los COVs son gases que son emitidos de ciertos sólidos o líquidos y ocasionan efectos adversos a la salud de acuerdo al tiempo de exposición (EPA, 1999). Este tipo de compuestos contienen carbono orgánico, cuyas presiones de vapor a temperatura ambiente son mayores a 0.01 psi y cuyos puntos de ebullición en condiciones atmosféricas se encuentran por debajo de los 100 ° C. Los COVs constituyen la segunda clase más extensa y diversa de emisiones atmosféricas, después de las partículas suspendidas totales (Thalasso y Pineda-Olmedo, 2002). Dichos compuestos son motivo de preocupación tanto por su papel precursor de ozono troposférico, como por su papel destructor del ozono estratosférico. Además, participan en la formación de smog fotoquímico al reaccionar con los óxidos de nitrógeno y la luz solar. En términos de sus efectos a la salud, los COVs varían desde los que son altamente tóxicos, hasta aquéllos a los cuales no se les ha conocido su efecto. La naturaleza del efecto a la salud depende de muchos factores incluyendo el nivel y tiempo de exposición. Se ha observado que cuando las personas se exponen a algunos compuestos orgánicos, de manera inmediata experimentan síntomas como irritación de ojos y del tracto respiratorio, dolor de cabeza, desórdenes visuales y mareos. En la Tabla 2.1 se pueden observar de manera general los efectos de algunos compuestos orgánicos volátiles.

**Tabla 2.1.** Efectos a la salud humana de algunos compuestos orgánicos volátiles.

<b>Grupo de hidrocarburos</b>	<b>*Efectos en la salud</b>
Hidrocarburos aromáticos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Riesgo potencial de cáncer; problemas de hígado y de riñón; problemas del sistema circulatorio; problemas del sistema nervioso.</li> <li>2. Daños en el sistema respiratorio; irritación en ojos y piel; mutagenicidad; alergias.</li> </ol>
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dificultades reproductivas; riesgo potencial de cáncer.</li> </ol>
Compuestos clorados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Problemas de hígado; enfermedades de riñón; anemia; daños en la sangre; riesgo potencial de cáncer.</li> <li>2. Irritación en ojos; embriotoxicidad.</li> </ol>
Hidrocarburos polihalogenados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dificultades reproductivas; riesgo potencial de cáncer.</li> <li>2. Daños sobre los sistemas respiratorio y nervioso central; embriotoxicidad; daños en riñones; irritación de ojos y garganta.</li> </ol>
Hidrocarburos poliaromáticos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dificultades reproductivas; riesgo potencial de cáncer.</li> <li>2. Daños en el sistema nervioso central; problemas en el hígado, riñón y sistema respiratorio.</li> </ol>
Ésteres	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pérdida de peso; problemas de hígado, riesgo potencial de cáncer; dificultades reproductivas.</li> </ol>
Bifenilos policlorados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cambios en la piel; problemas en el sistema endócrino; inmunodeficiencias; dificultades del sistema nervioso; riesgo potencial de cáncer.</li> </ol>

\* Efectos de acuerdo a las fuentes: 1. (EPA, 2009); y 2 (Friends of the Earth, 1996).

La mezcla de COVs que se propone tratar en este trabajo se compone de hexano, tolueno y metil etil cetona. Estos compuestos fueron seleccionados de acuerdo al

resultado de un monitoreo en ambiente de interiores de la industria del calzado en León, Gto (Arriaga y col. 2009). De acuerdo a ese proyecto, estos contaminantes son los que se emiten diariamente en concentraciones que pueden resultar muy tóxicas para la salud de la población expuesta. Las características químicas de estos compuestos se muestran en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Propiedades químicas de algunos COVs.

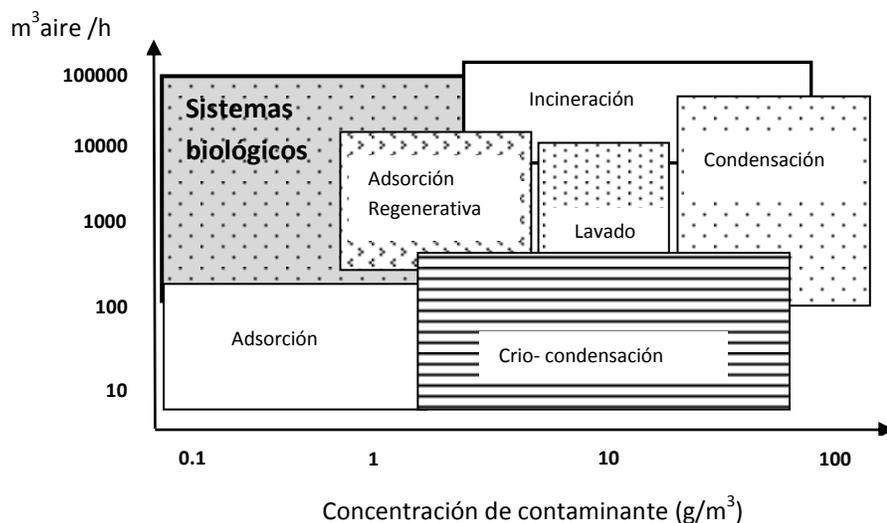
	<b>Hexano</b>	<b>Metil Etil Cetona</b>	<b>Tolueno</b>
Fórmula química	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>
Peso molecular	86.18	72.11	92.14
Solubilidad en agua (mg/L), (a 25 °C)	9.5	2.23*10 <sup>5</sup>	526
Presión de vapor (mm Hg), (a 25°C)	151	79.5	28.4
Punto de ebullición (°C)	68.7	80	110.6
Constante de Henry (atm-m <sup>3</sup> /mol)	1.8	5.69*10 <sup>-5</sup>	0.00664

\*\* Fuente: <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>

#### **2.4 Técnicas para el tratamiento de efluentes gaseosos**

De manera general se puede mencionar que existen 2 tipos de técnicas para el tratamiento de vapores o gases contaminantes, los cuáles son los métodos fisicoquímicos y los métodos biológicos (Devinny J., 1994). La elección de alguno de estos métodos toma en cuenta la naturaleza, el flujo y el modo de emisión del efluente gaseoso. Los métodos fisicoquímicos son aplicados principalmente cuando se tienen grandes flujos y altas concentraciones de contaminante. Con estos métodos puede lograrse la destrucción completa del contaminante, como el caso de la incineración, donde el gas contaminado puede tratarse térmicamente, catalíticamente o eléctricamente. También pueden ser de recuperación, como la

adsorción, absorción, condensación, tecnología de plasma y separación por membranas. La adsorción por ejemplo, es una técnica que permite altas eficiencias de remoción, particularmente cuando las concentraciones en la fase gas son bajas. Los procesos de adsorción usualmente requieren altos costos de inversión debido al material adsorbente requerido para el tratamiento. En general el tratamiento de COVs a través de métodos fisicoquímicos implica costos energéticos muy altos y en algunos casos se produce contaminación secundaria (NOx) (Kennes y Veiga, 2001). Por otro lado, el tratamiento biológico para este tipo de compuestos, parece ser una alternativa prometedora por su bajo costo y bajo impacto ambiental. Estos métodos se basan en la capacidad de los microorganismos para transformar algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos (Revah y Morgan-Sagastume, 2005). En la Figura 2.4.1 se pueden observar los límites de aplicabilidad de cada uno de los métodos.



**Fig. 2.4.1.** Aplicabilidad de las tecnologías para el tratamiento de aire en base a flujo de aire y concentración de contaminante (S. Revah y Morgan- Sagastume, 2005).

### 2.4.1 Métodos biológicos

Los métodos biológicos utilizan la capacidad de consorcios microbianos o cultivos aislados para degradar los compuestos químicos. Durante este tratamiento los contaminantes son sorbidos en una fase acuosa previo a la biodegradación. Los productos finales son principalmente CO<sub>2</sub>, agua y biomasa. La ventaja más importante de los métodos biológicos sobre los fisicoquímicos es que el proceso biológico puede llevarse a cabo a temperaturas cercanas a la ambiente, y a presión atmosférica. Los reactores más utilizados en el tratamiento biológico son: biofiltros, biolavadores, biofiltros de lecho escurrido, biorreactores de membrana y biorreactores con células suspendidas (ver Tabla 2.3). Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, el presente trabajo se enfoca a los biofiltros.

**Tabla 2.3** Clasificación de los reactores biológicos en el tratamiento de aire\*

Biomasa	Fase líquida	Reactor
Fija sobre un soporte	Estacionaria	Biofiltro
Fija sobre un soporte	Fluyendo	Biofiltro de lecho escurrido Contactores biológicos rotatorios
Suspendida	Fluyendo	Biolavador
Suspendida o fija	Estacionaria	Crecimiento suspendido
Fija sobre una membrana	Fluyendo	Membrana

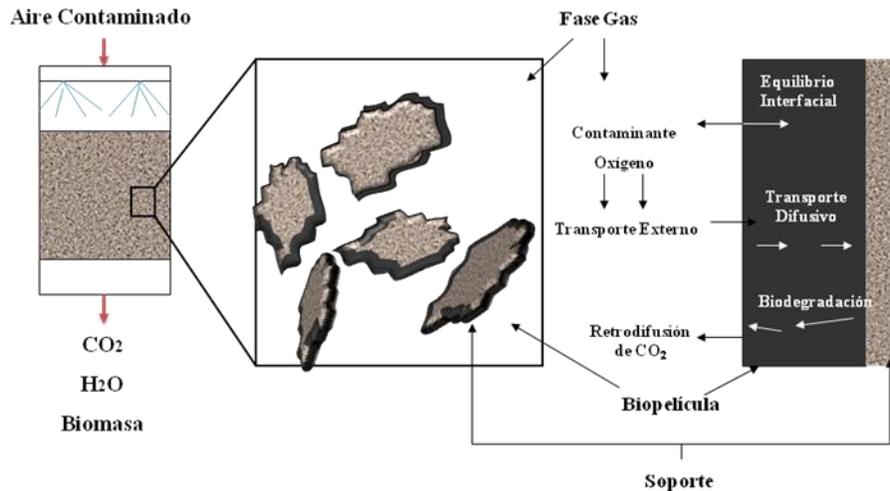
\*Revah y Morgan- Sagastume, 2005

#### 2.4.1.1 Biofiltración.

Es la tecnología de tratamiento de efluentes gaseosos más utilizada debido a sus bajos costos de operación. Se basa en la capacidad de algunos microorganismos

(bacterias, hongos, levaduras) para degradar una variedad de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos.

El origen de la biofiltración data de 1923, cuando en Alemania se tuvo la necesidad de tratar los olores provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, fue hasta 1953, cuando en Estados Unidos y Alemania surgieron las primeras aplicaciones y patentes sobre los biofiltros. Durante la década de los 80's, la aplicación de la biofiltración se expandió al tratamiento de compuestos orgánicos volátiles y contaminantes peligrosos en el aire. El principio de la biofiltración se basaba en el uso de composta como el medio filtrante, poco a poco el material que componía el lecho filtrante fue cambiando al uso de suelo, turba, corteza de árboles, etc. Esta técnica resultó ser muy efectiva para tratar COVs, tales como benceno, tolueno y xileno, etanol y vapores de gasolina, en bajas concentraciones (Ergas y Cárdenas-González, 2004). En la actualidad se ha incrementado el interés sobre la tecnología de biofiltración, esto incluye nuevos diseños de biofiltros pero todos basados en el mismo principio. Los biofiltros son reactores en los cuales el aire contaminado húmedo pasa a través de un lecho empacado sobre el cual los microorganismos degradadores se encuentran inmovilizados. Los microorganismos crecen sobre la superficie del soporte formando una biopelícula, como se puede apreciar en la Figura 2.4.2.



**Fig. 2.4.2.** Mecanismo de biofiltración

Debido a que el contaminante es más fácilmente degradable en la fase acuosa, éste tiene que ser transportado hacia la fase líquida donde los microorganismos se encuentran fijos y llevan a cabo la biodegradación. El mecanismo de transferencia es dependiente de los gradientes de concentración, del área de transferencia y del coeficiente de transferencia de masa. Puesto que el contaminante entra en contacto con la biopelícula, es necesario conocer su partición entre la fase gas y la fase acuosa. Dicha relación o equilibrio interfacial es descrito por la Ley de Henry donde, la concentración del contaminante en la fase acuosa es inversamente proporcional a la constante de Henry, y directamente proporcional a la presión parcial del contaminante en la fase gas. Una vez que los contaminantes son solubilizados en la fase líquida/biopelícula, se llevan a cabo interacciones de éstos con el agua, microorganismos, nutrientes y productos de desecho resultantes de la biodegradación.

La eliminación del contaminante gaseoso en el biofiltro es el resultado de una combinación compleja de diferentes fenómenos fisicoquímicos y biológicos. La biopelícula forma parte de los elementos clave en el proceso de biofiltración, ya que es ahí donde se lleva a cabo la degradación de los contaminantes. La población microbiana crecerá con la energía en forma de ATP (adenosín-tri-

fosfato) derivada de la biotransformación del contaminante a compuestos menos tóxicos como lo son el dióxido de carbono y el agua. En el caso de los COVs, los organismos heterotróficos toman la energía de la oxidación de las moléculas orgánicas, y parte del carbono es incorporado en la biomasa.

La actividad de la biopelícula es determinada por su densidad microbiana y las condiciones ambientales que en ella predominen como: el contenido de agua, temperatura, disponibilidad de nutrientes y pH. El contenido de agua en la biopelícula es uno de los pasos críticos que hay que mantener en la operación correcta del biofiltro, ya que la actividad biológica es altamente dependiente de la actividad de agua. El calor generado por las reacciones biológicas y la humedad con la que entra el aire, determina la tasa de pérdida de agua y los requerimientos para su recuperación (Morales y col. 2003). Para mantener un contenido de agua adecuado, y por lo tanto un buen funcionamiento del biofiltro, el aire generalmente es pre-humidificado y debe esparcirse agua en el biofiltro de manera intermitente.

La selección de la población microbiana se basa en las características del contaminante a tratar (Devinny y col., 1999; Deshusses y Johnson, 2000). Además, el periodo de arranque en un biofiltro es función de la actividad y la concentración de biomasa microbiana, por lo que se recomienda inocular con poblaciones adaptadas al consumo de contaminantes a degradar. Existen casos en los que el contaminante es difícil de degradar por medio de un consorcio microbiano, por lo que se requieren cepas especializadas para inocular el biofiltro (Van Groenestijn y Hesselink 1993; Devinny y col., 1999). El nivel de biodegradabilidad de los compuestos químicos depende del tipo de microorganismos, o especies microbianas en contacto con dichos compuestos, además de la estructura química de éstos. De manera general, si la especie química tiene en su estructura grupos funcionales que puedan establecer interacciones con los microorganismos y/o moléculas de agua, será más fácil su degradación. Por otro lado, si el compuesto es muy soluble y muy tóxico puede ocurrir inhibición de la actividad metabólica de los microorganismos. En la Tabla 2.4 se presenta el nivel de biodegradabilidad para algunos grupos de COVs.

**Tabla 2.4** Biodegradabilidad de algunos compuestos\*

<b>Compuestos Volátiles</b>	<b>Biodegradabilidad</b>
Alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, tioles, ácidos orgánicos, terpenos, aminas, sulfuros, amonio.	Rápida
Hidrocarburos, fenoles	Baja
Hidrocarburos halogenados, hidrocarburos policíclicos aromáticos	Muy baja

\*Revah y Morgan- Sagastume, 2005.

#### **2.4.1.1.1 Materiales de empaque.**

El papel principal del material de empaque es soportar la biopelícula, pero también puede servir como un reservorio de nutrientes, agua y contaminantes, debido a los mecanismos de sorción que se establecen entre la superficie del material y los contaminantes que se difunden a través de los poros. Otra de sus funciones es distribuir de manera uniforme el flujo de gas sobre la sección transversal del lecho empacado evitando la formación de canales y caídas de presión (Govind y Narayan, 2005). La naturaleza del material empacado influye sobre el crecimiento microbiano, y en la frecuencia con la que requiere reemplazarse, esto se puede ver reflejado en los costos de operación, por eso, su elección es un factor muy importante para el buen desempeño del biofiltro. Las características principales que se consideran al momento de seleccionar un material de empaque son: área superficial, capacidad de retención de agua, densidad y porosidad. La capacidad de retención de agua es un parámetro importante para la formación y supervivencia de la biopelícula. En general, es preferible tener materiales que posean una capacidad de retención de agua de 40 a 80% en peso (Devinny y col., 2008). Cuando no se tiene un buen contenido de agua en el lecho empacado, la actividad microbiana es muy pobre, el medio está expuesto a perder parte de su estructura desarrollando fracturas por las cuales el flujo de aire contaminado

puede pasar libremente, y de esta manera salir del lecho empacado sin la eliminación o remoción de contaminantes.

Las partículas que componen el lecho pueden ser materiales naturales orgánicos, naturales inorgánicos y sintéticos. Los medios naturales orgánicos consisten de materiales que pueden estar bioactivos, los cuales contienen un gran número de bacterias dispersas en su estructura, en lugar de formar una biopelícula sobre la superficie y poros (Govind y Narayan, 2005). Además, poseen cierto contenido de nutrientes que pueden ser aprovechados para el crecimiento microbiano. Dentro de este tipo de medios porosos se encuentran: suelo, composta, turba, fibra de coco, residuos agrícolas, entre otros. Una ventaja del uso de este tipo de materiales es que son baratos y fáciles de obtener, por lo que han sido ampliamente usados en sistemas de biofiltración. Sin embargo, este tipo de materiales son biodegradados con el paso del tiempo, pierden su estructura y como consecuencia se reduce su ciclo de vida, y la eficiencia de remoción de COVs en los biofiltros (Chan y Peng, 2007). Otra desventaja que presentan los materiales naturales orgánicos, debido a la pérdida de su resistencia mecánica, es la compactación del lecho que trae consigo significativas caídas de presión, acanalamiento, y en ocasiones, la formación de zonas anaerobias formadas por la gran cantidad de biomasa acumulada en el biofiltro, lo cual limita la transferencia de oxígeno a lo largo de la biopelícula (Kennes y Veiga, 2002).

Los materiales sintéticos inertes tienen la ventaja de no ser biodegradados por lo que no pierden con facilidad su estructura y resistencia mecánica, entre estos materiales se encuentran: perlita, lavaroca, vermiculita, cerámica, carbones activados, y materiales poliméricos como espuma de poliuretano, polipropileno, entre otros. La principal desventaja que presentan los materiales inertes, es que no contienen los nutrientes necesarios para sostener la actividad microbiana por lo que es necesario adicionar esos nutrientes de manera intermitente. En los últimos años, algunos estudios enfocados al material de empaque en biofiltros, proponen la modificación química de materiales poliméricos, ya sea adicionando una fuente de carbono y energía alterna a la que se obtiene durante el metabolismo

microbiano de los contaminantes, o simplemente modificando su estructura física y química para lograr que los microorganismos inoculados sobre el material se fijen a la superficie con más facilidad. Un término muy utilizado en estos sistemas de biofiltración, es la capacidad de eliminación (CE), la cual está definida como la cantidad de contaminante (en gramos) que es eliminada por cada metro cúbico de material empacado en una hora. En la Tabla 2.5 se observan algunos resultados de capacidad de eliminación (CE) obtenidos en algunos estudios sobre el efecto del material de empaque en sistemas de biofiltración. Sakuma y col. (2006), muestran un claro ejemplo de la importancia que tiene la naturaleza del material; dentro de los materiales que analizaron se encuentra un tipo de cerámica la cual fue previamente modificada con hueso de ganado para proveerle nutrientes. Con este material modificado se obtuvo una CE más alta que con los otros materiales, incluyendo la cerámica no modificada. Los autores discuten que la adición de hueso de ganado a la cerámica porosa tuvo un efecto positivo sobre la capacidad de eliminación, ya que los microorganismos se adhirieron a un material que contenía cierta cantidad de nutrientes, lo cual favoreció su metabolismo y crecimiento.

**Tabla 2.5** Capacidades de eliminación (CE) obtenidas con materiales diferentes.

Referencia	Compuesto (Tipo de inóculo)	Carga ( $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$ )	Material de empaque	CE ( $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$ )	*T (días)
Jang y col., 2004	Estireno	78	Turba	78	15
	(Cultivo de <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> )	44	Cerámica	44	15
Alvarez y col., 2008	Etil-benceno	55	Turba granular	45	20
	(Lodos activados)	135	Turba fibrosa	120	16
Sakuma y col., 2006	Tolueno  (Cultivo bacteriano)	116	Cerámica modificada <sup>+</sup>	81	50
			Poliuretano	30	50
			Cerámica porosa	67	50
			Perlita	36	50
Paca y col., 2006	Tolueno-Xileno  (Bacteriano- fúngico)	18	Polipropileno	12	60
Hernández y col., 2008	Hexano  (Cultivo de <i>Fusarium solani</i> )	190	Residuos de Pino modificado	100	7
			Perlita	100	33
Prado y col., 2005	Metanol  (Lodos activados)	150	Lavaroca	105	10
Hwang y col., 2007	p-Xileno  (Lodos activados)	19	Composta	15	25
Mathur y col., 2007	BTEX  (Cultivo bacteriano)	27	Bagazo de caña + composta + carbón activado	27	31

\* Tiempo en que se alcanzó la CE reportada.

+Cerámica adicionada con hueso de ganado.

Por otro lado, a partir de los estudios mostrados en la Tabla 2.5, se puede decir que el material sintético como la cerámica, el poliuretano y el polipropileno tienen desempeño inferior a los materiales naturales, debido a la ya mencionada falta de nutrientes dentro de sí, pero también se puede atribuir a las características de porosidad de los materiales.

Así por ejemplo, algunos materiales naturales como las fibras, presentan una estructura porosa que facilita el alojamiento de los microorganismos. Asimismo, una cerámica porosa resulta ser más eficiente que una cerámica con baja porosidad, y en el caso del poliuretano, que si bien es un material poroso, su porosidad es macroscópica lo cual reduce el área superficial disponible para el alojamiento y retención de los microorganismos, y por ello su baja eficiencia aunado al hecho de que el poliuretano es de naturaleza hidrofóbica. No obstante, la porosidad macroscópica como la del poliuretano tiene la ventaja de que difícilmente los poros son ocluidos por los micelios, y por lo tanto se reduce la caída de presión en el biofiltro (Aizpuru y col., 2000.)

Como ya se mencionó, la retención de humedad es esencial para el crecimiento microbiano, de allí que a los materiales sintéticos, especialmente los poliméricos, se les considere modificarlos con la finalidad de incrementar su capacidad de retener agua y/o sirvan como fuente de carbono y energía para los microorganismos.

Al respecto, algunos autores han realizado algunos estudios. Por ejemplo, Chan y Lu (2005) proponen la utilización de un compuesto con base en poli (alcohol vinílico) y turba, aprovechando el hecho de que el poli (alcohol vinílico) es capaz de adsorber las moléculas de agua fácilmente. Además estudiaron el efecto del tamaño de partícula de la turba, y concluyeron que hubo un efecto importante en la capacidad de retención de agua, mejorándola a medida que el tamaño de partícula era menor (2.4 mm).

Pinto y col. (2004) estudiaron diferentes espumas de poliuretano en donde la principal diferencia entre ellas era la cantidad de agua utilizada durante la síntesis

de las espumas, así como el hecho de adicionar aceite de silicón. La conclusión de los autores es que el material con mayor carácter hidrofóbico tuvo una ligera mayor sorción del contaminante (tolueno) y lo atribuyeron básicamente a un menor contenido de grupos urea en el poliuretano.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, en este trabajo se propone la síntesis de una espuma de poliuretano modificada con diferentes porcentajes de almidón, con el propósito de aumentar su capacidad de retención de agua, y que sirva a la vez como una fuente de carbono adicional para los microorganismos que sobrevivan en este soporte. El resultado se comparará con otros dos materiales como son Perlita (un material mineral), y un soporte polimérico modificado con fibras de agave.

#### **2.4.1.1.2 Especies y poblaciones microbianas en sistemas de biofiltración.**

Las especies microbianas presentes en los biofiltros, son las encargadas de llevar a cabo las transformaciones de los contaminantes a compuestos menos tóxicos. En los biofiltros pueden existir diversas especies dependiendo de las condiciones ambientales que predominen en la biopelícula, como pH, actividad de agua, temperatura, así como la concentración de oxígeno y compuestos contaminantes. El tipo de especies que logran predominar en un biofiltro depende también de las características físicas y químicas del material de empaque (Singh y Ward., 2005).

Para tratar de explicar mejor las transformaciones de los COVs en los biofiltros, se ha recurrido al análisis filogenéticos de las poblaciones microbianas haciendo uso de herramientas moleculares como, DGGEs (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante), RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), análisis de la subunidad ribosomal 16s rDNA, clonación y secuenciación de genes, entre otras. Con este tipo de estudios se han identificado diferentes especies que en su genoma poseen sitios específicos, los cuales se traducen en enzimas que son capaces de atacar y transformar diferentes moléculas de COVs. Por ejemplo, en un biofiltro empacado con turba se identificaron varias especies que fueron capaces de metabolizar una mezcla de COVs (metanol, acetona, metil

etil cetona, metil isobutil cetona, etil acetato, butil acetato, tolueno, etil benceno, xileno, diclorometano, y 1,2 dicloroetano), dentro de dichas especies se encuentran: *Corynebacterium aquaticum*, *Pseudomonas* sp., *Massilia timonae*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Frauteria aurantia*, *Rahnella* sp., *Gordona polyisoprenivorans*, y *Arthrobacter psychrolactophilus* (N. Khamamar y col., 2005). Otros estudios se han enfocado a estudiar la biodegradación de COVs utilizando consorcios microbianos que se obtuvieron a partir de especies aisladas. Choi y col., (2002), obtuvieron un consorcio bacteriano compuesto por *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomonas alcaligenes*, para llevar a cabo la biofiltración de benceno, tolueno y xileno. Estos autores obtuvieron CEs máximas de 14, 13 y 10  $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$  para benceno, tolueno y xileno, respectivamente. Por otro lado, se han utilizado especies aisladas para tratar emisiones gaseosas contaminadas con compuestos específicos: *Pseudomonas* para la degradación de estireno, con una CE de 78  $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Jang y col., 2004); *Fusarium solani* para la degradación de n-hexano, con una CE máxima de 130  $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Arriaga y Revah, 2005); *Pseudomonas* sp. KT-3 para la biodegradación de metil etil cetona, con una CE máxima de 211.4  $\text{gm}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Lee y col., 2006). Si bien, el utilizar cepas aisladas ha dado buenos resultados en el tratamiento de COVs a nivel laboratorio, la operación a escala industrial podría verse afectada por las especies que se introduzcan al biofiltro junto con la emisión gaseosa, ya que algunas especies, que pudiesen estar presentes en la corriente gaseosa, podrían establecerse muy bien en lecho empacado y afectar el predominio de la especie inoculada. Por esto, el utilizar consorcios microbianos ha dado mejores resultados durante el tratamiento de mezclas de COVs, debido a que mientras unas especies se encargan de la transformación de moléculas simples, otras pueden llevar a cabo la transformación de moléculas más complejas.

### 3. Justificación

La presencia de compuestos orgánicos volátiles en el aire es de gran preocupación debido a los efectos que estos contaminantes ocasionan en la salud de la población y sobre el medio ambiente. El estado de Guanajuato es uno de los principales sitios de interés debido a la gran cantidad de contaminantes atmosféricos que se generan por las diferentes actividades industriales. Cerca de 600 mil toneladas de contaminantes se emiten anualmente en este estado (Instituto de Ecología de Guanajuato, 2004), de las cuales el municipio de León contribuye con el 37.92 % de los hidrocarburos totales. En un estudio de monitoreo de aire en industrias del calzado se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de emisiones de COVs, en este estudio se encontró que tolueno, hexano y metil etil cetona son los disolventes más utilizados en la industria del calzado y por tanto los que se emiten en mayor cantidad (Arriaga y col., 2009). Los sistemas de biofiltración han sido ampliamente utilizados para combatir el problema de emisiones contaminantes por diferentes industrias. La biofiltración es una técnica de tratamiento biológico muy utilizada para el tratamiento de COVs. Sin duda, todos los aspectos involucrados en esta técnica son de amplio interés de estudio, como por ejemplo: los problemas relacionados con la transferencia de masa del contaminante hacia la biopelícula, el efecto del tipo de material de empaque utilizado en biofiltros, además de algunos parámetros de operación (pH, carga orgánica, tiempo de residencia, humedad, etc). Por ello, este trabajo estará enfocado al estudio del efecto del material de empaque en la biofiltración de una mezcla de COVs definida de acuerdo a un monitoreo de aire en ambientes de trabajo en industrias del calzado. El material de empaque en un biofiltro tiene un papel muy importante tanto en la etapa de arranque, como en el desempeño del biofiltro a través del tiempo, ya que su naturaleza y composición propician la fijación y crecimiento de microorganismos degradadores de contaminantes. Los materiales naturales son fáciles de obtener, sin embargo, son biodegradados al paso del tiempo, pierden su estructura y como consecuencia se reduce su ciclo de vida y la eficiencia de remoción de COVs en los biofiltros (Chan y Peng, 2007). En los últimos años, se ha propuesto la modificación de materiales poliméricos con el

fin de mejorar su estructura física y química para lograr que los microorganismos inoculados sobre el material se fijen a la superficie con más facilidad, además de propiciar condiciones que favorezcan la actividad microbiana. Debido a esto, se propone estudiar el efecto del uso de Perlita, espuma de poliuretano modificada con almidón y polipropileno modificado con fibras de agave en la biofiltración de una mezcla de hidrocarburos compuesta por tolueno, hexano y metil etil cetona.

## **4. Objetivos e Hipótesis**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del material de empaque sobre la capacidad de eliminación de una mezcla de hidrocarburos compuesta por hexano, tolueno y MEC en un biofiltro.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

- Analizar el efecto de la adición de almidón a una espuma de poliuretano, sobre las propiedades fisicoquímicas de este material, y evaluar su desempeño como material de soporte de microorganismos durante la biodegradación de hexano, tolueno y MEC en experimentos en lote.
- Llevar a cabo la biofiltración de hexano, tolueno y MEC en un biofiltro de lecho empacado utilizando Perlita como material de empaque.
- Llevar a cabo la biofiltración de hexano, tolueno y MEC en un biofiltro de lecho empacado utilizando polipropileno reforzado con fibras de agave como material de empaque.
- Llevar a cabo la biofiltración de hexano, tolueno y MEC en un biofiltro de lecho empacado utilizando poliuretano modificado con almidón como material de empaque.

### **4.2 Hipótesis**

Debido a que el material de empaque juega un papel importante en los sistemas de biofiltración, es posible mejorar las capacidades de eliminación (CE) de hexano, tolueno y MEC al utilizar Polipropileno reforzado con fibras de agave y Poliuretano modificado con almidón, como material de empaque en el reactor.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Síntesis del poliuretano modificado con almidón

Durante la síntesis del material de empaque con base en poliuretano (PU), se utilizó un pre-polímero de poliuretano al cual se le adicionó almidón como aditivo para conferirle capacidad de retención de agua, y a la vez como una fuente alterna de carbono para los microorganismos. Con el objetivo de ver qué contenido de almidón era el adecuado para empaquetar el biofiltro, se realizaron diferentes reacciones de polimerización con diferente porcentaje de almidón 0 % (M1), 20 % (M2), 30% (M3) y 40% (M4). A cada reacción se le agregó un agente espumante y agua destilada. La síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación mecánica. La secuencia de mezclado fue la siguiente: 1) mezclado de poliuretano con almidón por 20 segundos; 2) se agregó el agente espumante y se mezcló 40 segundos; 3) se agregó agua y se realizó el mezclado por 1 min. Cada material se dejó espumar en reposo a temperatura ambiente durante 4 horas, después los compositos permanecieron en agua destilada por 24 h. Finalmente todas las muestras se secaron en un horno a 50 °C durante 2 días. La mezcla de reacción para cada síntesis se presenta en la Tabla 5.1

**Tabla 5.1** Mezclas de reacción para la síntesis de material con base en PU.

Reactivo/composito	M1	M2	M3	M4
<b>Poliuretano</b> (% peso)	100	80	70	60
<b>Almidón</b> (% peso)	0	20	30	40
<b>Agua</b> (% peso relativo al poliuretano)	0.25	0.25	0.25	0.25
<b>Espumante</b> (% peso relativo al peso total)	2	2	2	2

## **5.2 Experimentos de biodegradación en lote**

### **5.2.1 Reactivos**

Los hidrocarburos (COVs) utilizados fueron Tolueno, Metil Etil Cetona (MEC) y n-Hexano (Tecsiquim, Co. México) con un grado de pureza mayor a 98.5 %.

### **5.2.2 Inóculo y Medio Mineral**

El inóculo utilizado fue un consorcio microbiano aislado de sitios contaminados con hidrocarburos, y que fue utilizado en un trabajo previo (Galindo, 2008). El medio mineral (MM) contenía ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.38;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25;  $\text{CaCl}_2$  0.055 y elementos traza ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.015;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.012;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.013;  $5\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0023;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0015;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.0015. El medio mineral fue esterilizado a  $120^\circ\text{C}$  y 0.15 MPa durante media hora. El pH inicial fue de 5.

### **5.2.3 Biodegradación de hexano, tolueno y MEC en lote**

Los experimentos se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 120 mL provistos con válvulas mininert de Teflón, se añadieron 140 mg de cada material sintetizado y 50  $\mu\text{L}$  de consorcio microbiano con medio mineral ( $63.4 \text{ mg}_{\text{proteína}}\text{L}^{-1}$ ). Posteriormente, se adicionó hexano, tolueno y MEC a una concentración de  $4 \text{ g m}^{-3}$  de cada compuesto, utilizando una jeringa de 10  $\mu\text{L}$  (Agilent Syringe, part # 5182-3496), y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 15 días. Se prepararon frascos control sin microorganismos para observar efectos de sorción sobre el material, y se incubaron en condiciones similares. La concentración de hidrocarburos fue monitoreada diariamente. La concentración de  $\text{CO}_2$  en el espacio vacío de cada frasco se midió al inicio y al final de cada cinética. La concentración de biomasa fue medida al final de los experimentos por el método de Lowry, además se realizaron observaciones de la biopelícula formada en un microscopio electrónico de barrido.

### **5.3 Biodegradación de Hexano, Tolueno y MEC en un biofiltro empacado con Perlita.**

Se utilizó un biofiltro de acero inoxidable, el cual constaba de dos módulos cilíndricos con dimensiones de 30 cm de alto por 9 cm de diámetro, se utilizó un volumen efectivo de columna empacada de 2.6 L. El material de empaque para este biofiltro fue Perlita (mineral constituido por silicatos de aluminio), y se utilizaron aquellas partículas que no lograron pasar por una malla de 3.35 mm (No.6, WSTYLER). El material fue inoculado con 200 ml del mismo consorcio de microorganismos utilizado en las cinéticas en lote (sección 5.2.2), y se introdujo en cada módulo del reactor tratando de que las partículas se acomodaran bien en la columna empacada. El biofiltro BP (Biofiltro Perlita) fue alimentado con hexano, tolueno y MEC en fase gas a concentraciones de  $1\text{ g m}^{-3}$  c/u, que corresponde a una carga total de  $180\text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ . Esta carga de COVs se alimentó a un flujo de aprox.  $2.6\text{ L min}^{-1}$  en modo descendente, y con un tiempo de residencia de lecho vacío de 1 min. Se adicionaron 100 ml de medio mineral (sección 5.2.2) cada tercer día en flujo descendente. Durante el transcurso de este estudio se monitorearon las concentraciones de COVs a la entrada y salida de cada módulo, y la producción de  $\text{CO}_2$  se midió eventualmente. El pH inicial del medio mineral fue de 7, el cual fue modificado a 5 para el día 54. El tiempo de operación de este reactor fue de 65 días.

### **5.4 Biodegradación de Hexano, Tolueno y MEC en un biofiltro empacado con poliuretano y polipropileno modificados.**

Para estos experimentos se utilizaron columnas de vidrio de 2.6 cm de diámetro y 25 cm de alto. El volumen efectivo de la columna empacada fue de 94 mL. El material de empaque utilizado para el experimento BPU (Biofiltro poliuretano) fue poliuretano con 40 % de almidón (M4), el cual fue seleccionado con base a los resultados obtenidos en los experimentos en lote. Se utilizaron partículas de PU en forma de cubo de 5 mm de cada lado, aproximadamente.

En cuanto al biofiltro BPP (Biofiltro polipropileno), éste se empacó con un material con base en polipropileno modificado con fibras de agave proporcionado por el Dr. Armando Almendárez del Instituto Tecnológico de Celaya. La composición del material fue 70 % en peso de fibra de agave y 30 % en peso de polipropileno, este material fue extruido a 160 °C. Las partículas del material tenían forma cúbica, y medían 7 mm por lado, aproximadamente. Estos materiales fueron inoculados con 40 mL del mismo consorcio utilizado para el reactor con Perlita y se empacaron en los reactores BPU y BPP. La corriente simulada de aire contaminado se alimentó con un flujo aproximado de 106 mL min<sup>-1</sup> y con un tiempo de residencia de lecho vacío de 1 min. La adición de medio mineral (pH 5) se realizó cada tercer día para el reactor BPU y BPP. Debido a que no se logró el arranque del biofiltro empacado con el material de polipropileno/agave, se requirió de una segunda inoculación de microorganismos sobre este material. Para esto, se retiró el material de la columna, se colocó en 200 ml del consorcio microbiano y se mantuvo en agitación durante 48 h a 28 °C. Después de este segundo proceso de inoculación, el material se dejó escurrir durante 1 h y se empacó de nuevo en el reactor. La adición de medio mineral a partir de ese momento se realizó diariamente. La concentración de cada contaminante y la carga total a la entrada de ambos reactores fue la misma que se fijó para el reactor con Perlita (1 g m<sup>-3</sup> y 180 g/m<sup>3</sup>-h, respectivamente). Durante el transcurso del estudio se monitorearon las concentraciones de COVs a la entrada y salida de cada reactor, y la producción de CO<sub>2</sub> se midió eventualmente cuando el reactor se encontraba en estado estable.

## **5.5 Métodos analíticos**

### **5.5.1 Espectrometría de absorción en el infrarrojo**

La presencia del almidón en el polímero se corroboró mediante Reflectancia Total Atenuada, utilizando un espectrómetro de absorción en el infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR- NICOLET modelo 6700, Thermo Scientific). El equipo constaba de una placa de selenuro de zinc en donde cada muestra fue

colocada. El análisis se realizó en el intervalo de número de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , con 30 barridos por cada muestra.

### **5.5.2 Análisis termogravimétrico**

La capacidad de retención de agua de cada material se determinó por análisis termogravimétrico (TGA). Las muestras permanecieron sumergidas en agua durante 48 horas, tiempo necesario para que se alcanzara la máxima capacidad de retención de agua. Posteriormente, las muestras se estudiaron en un analizador termogravimétrico Thermo Cahn-TGA modelo Versa-Therm H5 (Thermo MC company). Las condiciones de operación fueron: velocidad de calentamiento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para el intervalo de 30-100  $^{\circ}\text{C}$  y posteriormente permaneció isotérmicamente a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. El equipo operó con un flujo de nitrógeno de  $20 \text{ ml min}^{-1}$  y helio a  $40 \text{ ml min}^{-1}$ .

### **5.5.3 Análisis de fisisorción con nitrógeno**

El área superficial fue determinada mediante fisisorción de nitrógeno, en un Analizador de área superficial y porosidad Micromeritics modelo ASAP 2020, utilizando el modelo Brunauer-Emmet-Teller (BET).

### **5.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

La morfología de los materiales fue analizada en un microscopio electrónico de barrido (ESEM, Environmental Scanning Electronic Microscopy) ESEM-QANTA modelo 200 (FEI Company) en el Laboratorio de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) IPICYT-México. Las muestras se colocaron en pines de aluminio sin ninguna preparación previa. Para el análisis morfológico se utilizaron los detectores de electrones LFD (Large Fill Detector) y el BSED (Back Scattering Electrons Detector), y condiciones de operación de la cámara de 15 KV y 90 Pa, con atmósfera de agua, y en modo de bajo vacío.

### **5.5.5 Cromatografía de gases**

Las concentraciones de Tolueno, MEC y n-Hexano en fase gas, fueron medidas en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies GC, modelo 6890), acoplado a un detector de ionización de flama, y equipado con una columna capilar (DB 624). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 25 ml min<sup>-1</sup>. Las temperaturas del inyector, horno y detector se mantuvieron en 230, 60 y 230 °C, respectivamente.

Para medir la concentración de CO<sub>2</sub>, se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies GC, modelo 6850) con detector de conductividad térmica, y equipado con una columna capilar (HP-PLOT- Q). Se utilizó Helio como gas acarreador con flujo de 10.1 ml min<sup>-1</sup>. Las condiciones del inyector, horno y detector fueron 180, 40 y 180 ° C, respectivamente.

### **5.5.6 Determinación de proteína**

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Galindo, 2008); las muestras fueron hidrolizadas con una solución de NaOH 0,2 M y se utilizó albúmina de suero de bovino como estándar.

### **5.5.7 pH**

Para determinar el pH de los materiales, se pesaron 0.54 g de cada material de empaque, se colocaron en tubos de 50 mL, se sumergieron en 5 mL de agua destilada y se dejaron reposar 48 h. Considerando que en ese tiempo ya se había alcanzado el equilibrio, el sobrenadante se transfirió a tubos de 15 mL y se midió el pH, utilizando para ello un pH-metro.

## **5.6 Aislamiento e identificación de cepas fúngicas degradadoras de tolueno, hexano y MEC**

### **5.6.1 Aislamiento de las cepas fúngicas**

El aislamiento de las cepas se realizó a partir de los experimentos de biodegradación en lote, en los cuales se utilizó el poliuretano modificado con almidón (M4) como soporte para los microorganismos.

Primero se observó la morfología de los hongos al microscopio óptico y enseguida las cepas fueron sembradas varias veces en cajas Petri con medio PDA hasta que se consiguió el aislamiento. El medio PDA contenía (g L<sup>-1</sup>): Almidón de papa 4; Dextrosa 20; Agar 15. Este medio fue esterilizado a 120 °C y 0.15 MPa durante 15 min. El pH inicial fue de 5.

### **5.6.2 Extracción de ADN**

Los hongos filamentosos fueron cosechados y macerados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El ADN de los hongos se extrajo con la técnica propuesta por Raeder y Broda (1989), y se realizaron dos lavados con etanol al 70%.

### **5.6.3 Amplificación de ADN**

La región 18S ribosomal del extracto de ADN fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción fue la siguiente (μL): MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (1.5); Oligo 1 (0.5); Oligo 2 (0.5); Taq DNA polimerasa (500 U, 5U/ μL) (0.125); ADN (0.5); Buffer (1.25 mL 10X) (5); dNTPs (1); y H<sub>2</sub>O (15). Se utilizaron los oligos ITS1 5´GAGTCTAGATCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´ e ITS4 5´AAGCACTTCCTCCGCTTATTGATATGC 3´ los cuales presentan sitios de corte para las enzimas Xba I y EcoR I, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, mod. 2720 Thermal Cycler) usando las siguientes condiciones: 5 min de desnaturalización a 94 °C; seguido por 30 ciclos de amplificación con 0.5 min de desnaturalización a 94 °C; 0.75 min de

apareamiento a 60 °C y 1.25 min de extensión a 72 °C. Adicionando un paso extra de extensión de 8 min a 72 °C. El producto de PCR se verificó en un gel de agarosa al 1% (p/v), se dejó reposar en una solución de bromuro de etidio por 20 min y se observó bajo luz U.V.

#### **5.6.4 Ligación con el vector pGEM-T**

El producto de PCR digerido (2 µL) se ligó al vector (0.5 µL) con la enzima T4 DNA ligasa (1 µL) (Invitrogen) a 4°C. A esta reacción se le agregó un buffer de ligasa (5 µL) y agua destilada estéril (1.5 µL). El mapa del vector se presenta en el anexo 1.

#### **5.6.5 Transformación de células de *Escherichia coli*.**

El producto ligado fue introducido mediante choque térmico en *E. coli* TOP10. Se adicionaron 2 µL del producto ligado a 50 µL de células de *E. coli* y se incubaron en hielo durante 10 min. Después se colocaron durante 1 min en una parrilla de calentamiento a 42 °C, e inmediatamente se dejaron reposar en hielo durante 10 min. Las células se pusieron en 450 µL de medio LB y se llevaron a recuperación a 37 °C durante 1 h. Las transformantes fueron crecidas en placas de LB (Luria Bertani) suplementado con carbonicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>), XGal (64 µg/mL) e IPTG (0.2 mM), se llevaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias fueron seleccionadas y se pusieron a crecer en LB líquido con antibiótico a 200 rpm y 37 °C. El ADN plasmídico fue obtenido mediante minipreparaciones por lisis alcalina. Los plásmidos fueron digeridos a 37 °C con la enzima Eco RI y purificados por el método de QIAquick Purification (QIAGEN).

#### **5.6.6 Identificación de las cepas fúngicas**

Las muestras de las clonas purificadas se mandaron a secuenciar al CINVESTAV en Irapuato, Gto. Las secuencias resultantes fueron analizadas realizando un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el banco de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information).

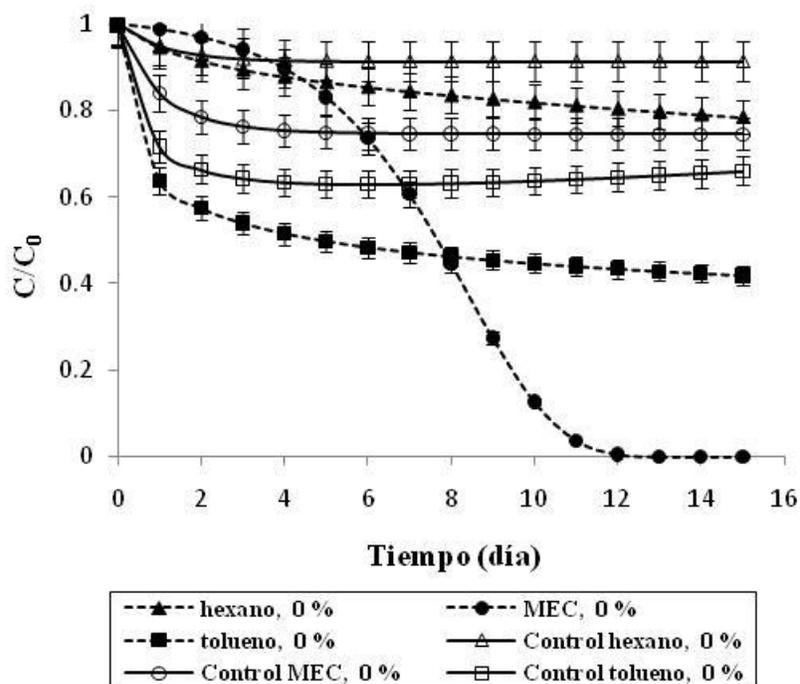
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Experimentos en lote con el PU modificado

#### 6.1.1 Biodegradación de hexano, tolueno y MEC en lote

Para el caso de la biodegradación de hexano, tolueno y MEC en lote, los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 6.1.1, 6.1.2, 6.1.3 y 6.1.4, las cuales corresponden a contenidos de almidón de 0, 20, 30 y 40 % en peso, respectivamente. En general, el orden de biodegradación de los compuestos que se observó fue el siguiente: MEC > tolueno > hexano, independientemente del contenido de almidón presente en el compuesto.

En la Figura 6.1.1 se presenta la velocidad de biodegradación de los hidrocarburos con el poliuretano sin modificar, durante los 15 días que duró el experimento.



**Figura 6.1.1** Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el material M1 (PU sin modificar).

Para el caso del poliuretano sin modificar, en la Figura 6.1.1 se puede observar que en el día 15 de operación se alcanzó el 59 % de biodegradación de tolueno y el 22 % de hexano, mientras que la biodegradación para MEC fue completa desde el día 12. Se puede apreciar, además, una reducción en la concentración de hidrocarburos en los experimentos control, lo que indica que inicialmente existió un mecanismo de sorción de los tres compuestos. Sin embargo, se observa que el material se satura de contaminantes, en menos de 24 horas, por lo que a partir de ese tiempo, predomina la biodegradación. En cuanto al CO<sub>2</sub>, se obtuvo una velocidad específica de producción de 4.97 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> hidrocarburos consumidos h<sup>-1</sup>, con un porcentaje de mineralización de la mezcla de hidrocarburos de 64 % (Estos datos se calcularon suponiendo que el almidón fue consumido completamente).

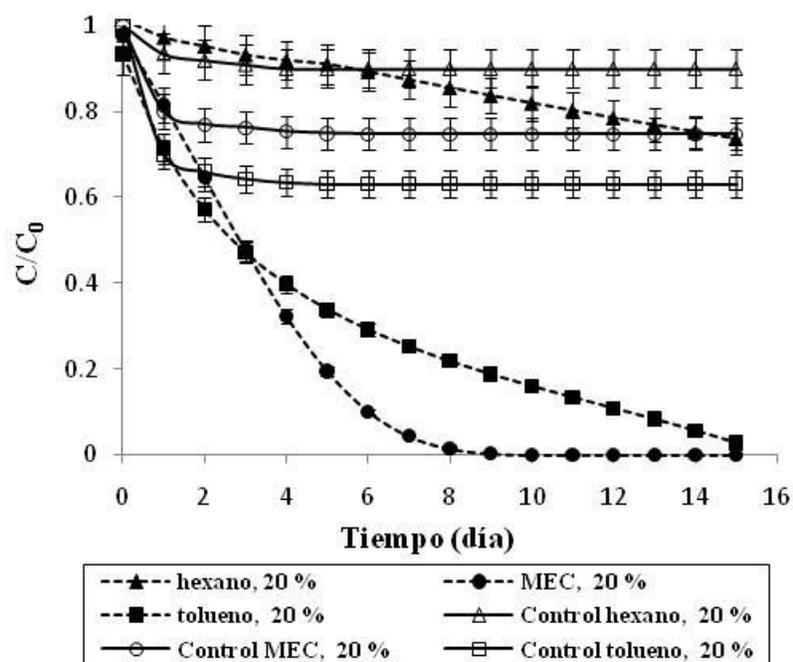
En términos de biodegradación, ésta fue diferente para cada uno de los contaminantes, tanto en la efectividad como en la velocidad con que se llevó a cabo dicho proceso. Así, en el caso del hexano la degradación obtenida al final del experimento sólo alcanzó el 22% de la cantidad inicialmente inyectada; en tanto que para el caso del tolueno se logró biodegradar el 58 % de la concentración inicial, aunque de una manera notoriamente más rápida; ya que la pendiente, es decir, la variación de las concentraciones con el tiempo son mucho mayores para este caso que para el hexano e incluso mayores que para el MEC. No obstante, a diferencia de los demás hidrocarburos, el MEC fue el que pudo ser biodegradado en su totalidad.

Si se aprecia el comportamiento de los tres contaminantes, en términos de su variación de concentración con el tiempo, se puede ver que el hexano y el tolueno mostraron un decaimiento rápido en su concentración desde el día 1 del experimento, a diferencia del MEC, el cual fue hasta después del día 3 que tuvo una biodegradación perceptible, aunque dicha biodegradación fue total como ya se comentó.

Tomando en consideración tanto la solubilidad en agua de los diferentes contaminantes así como la adsorción de éstos en el material, el comportamiento

reci3n descrito parecer3a l3gico, dado que el tolueno es el contaminante que mayor sorci3n tuvo y por lo tanto la r3pida ca3da en la concentraci3n de 3ste podr3a atribuirse a dicho proceso; sin embargo, una vez que el material se satur3, la ca3da de concentraci3n continu3, pero con una tasa mucho menor. Un comportamiento similar mostr3 el hexano, el cual adem3s tiene la menor solubilidad en agua y por lo tanto su biodegradaci3n fue la menor. En tanto que en el caso del MEC, si bien se sorbe en el material, no lo es tanto como en el caso del tolueno, y por ello le tom3 m3s tiempo su biodegradaci3n, pero una vez que el material se satur3 de los contaminantes, este proceso de biodegradaci3n continu3 y fue completamente eficiente para el caso del MEC, cuya solubilidad en agua es la mayor, facilit3ndose as3 el transporte de 3ste hacia la biopel3cula, y por lo tanto, estando m3s accesible para los microorganismos.

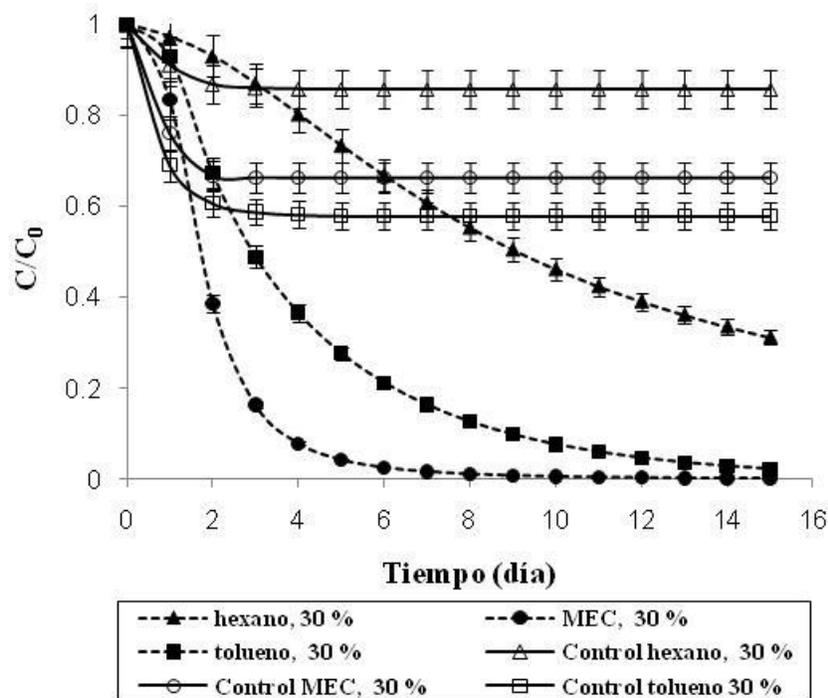
En cuanto al composito con 20 % de almid3n (M2), en la Figura 6.1.2 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 6.1.2** Velocidad de biodegradaci3n de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el composito M2 (20 % almid3n).

Con el composito M2 se obtuvieron mayores velocidades de biodegradación que con el PU sin modificar, sin embargo, sólo se obtuvo el 27 % de degradación de hexano. El tolueno fue degradado completamente en el día 15, mientras que MEC fue biodegradado completamente a partir del día 7. Este aumento en las velocidades de degradación se puede atribuir a la adición de 20 % de almidón al PU. Lo anterior se debe a que el almidón sirvió como fuente de carbono y energía para los microorganismos inoculados en el PU, y por tanto, se promovió el rápido crecimiento de éstos, dando lugar a una más rápida reducción de la concentración de los contaminantes en la fase gas. En este caso, cabe recalcar nuevamente la importancia de la solubilidad en agua de los contaminantes, pues el tolueno ahora sí pudo ser biodegradado por completo, a diferencia del hexano que si bien la biodegradación alcanzada fue mayor y más rápida, en comparación con la obtenida con el composito sin almidón, ésta fue incompleta. Cabe señalar que tanto la solubilidad como la cantidad de biomasa presente en el sistema son fundamentales para la biodegradación, así como el mecanismo de sorción que se presenta en el material contribuyendo a la biodisponibilidad del contaminante. En este caso, la producción de CO<sub>2</sub> fue de 1.75 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> hidrocarburos consumidos h<sup>-1</sup>, con un porcentaje de mineralización de 60 % (Tabla 6.1).

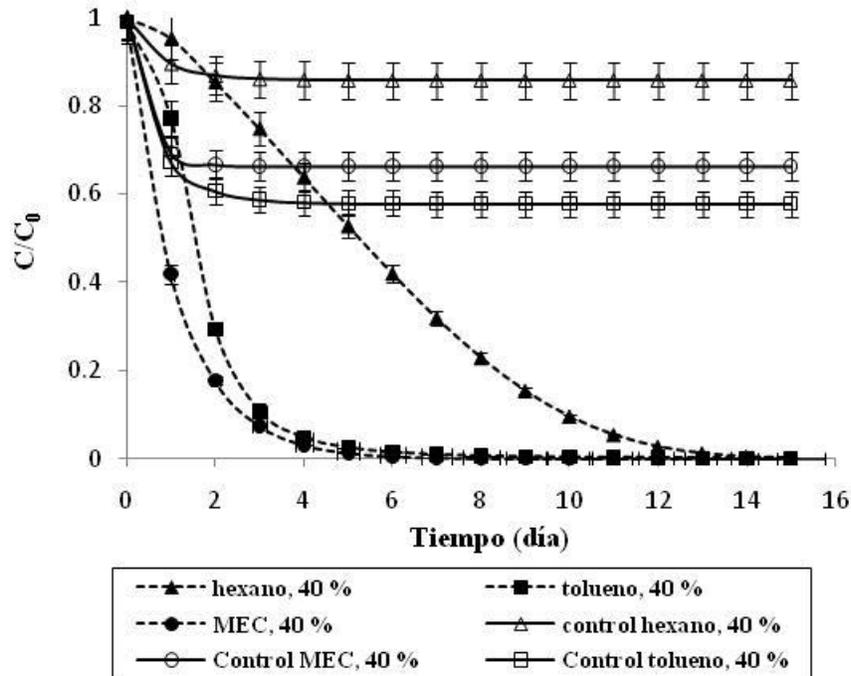
En la Figura 6.1.3 se muestra la caída de concentración de los compuestos con el material M3 (modificado con 30 % de almidón).



**Figura 6.1.3** Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el compuesto M3 (30 % almidón).

En este caso, la biodegradación de hexano se favoreció notoriamente, ya que se obtuvo en 15 días el 69 % de biodegradación. En cuanto a tolueno, éste fue degradado de manera completa también en el día 15, pero, en un lapso de 9 días se alcanzó el 90 % de biodegradación, lo cual fue más rápido que con el compuesto 2 (día 11). En tanto que el MEC fue completamente degradado en 7 días, también más rápido que con el compuesto M2. Además, es importante señalar que para este compuesto, la velocidad de biodegradación del MEC se modificó drásticamente respecto al compuesto anterior (M2) siendo mucho mayor, incluso mayor que la biodegradación del tolueno. Esto pudo deberse a que, al incrementar el contenido de almidón, se incrementa la cantidad de grupos hidroxilos, los cuales interactúan con las moléculas del agua, trayendo como consecuencia que el producto con mayor solubilidad en agua, es decir, el MEC, esté más accesible para los microorganismos. Con este compuesto, de manera específica, se produjeron  $1.52 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ hidrocarburos consumidos h}^{-1}$ , (mineralización de 53 %).

Para el caso del compuesto con un contenido de 40% en peso de almidón (M4), los resultados de biodegradación se muestran en la Figura 6.1.4.



**Figura 6.1.4** Velocidad de biodegradación de hexano, tolueno y MEC en fase gas con el compuesto M4 (40 % almidón).

Como se puede apreciar de la Figura anterior, el MEC se degradó en su totalidad en tan solo 6 días. Mientras que el tolueno se degradó por completo en 7 días. Es importante señalar que solamente con este compuesto se alcanzó la biodegradación completa de hexano en el día 14. La biodegradación total de los hidrocarburos, produjo  $1.37 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ hidrocarburos consumidos h}^{-1}$ , el porcentaje de mineralización fue de 48 %. Estos resultados corroboran que la biodegradación puede ser completa si se tiene la cantidad suficiente de biomasa. Así mismo, se puede decir que la adición de almidón favorece el crecimiento de biomasa, lo cual se ve reflejado en una mayor tasa de biodegradación, es decir, se pueden asociar estos parámetros con la cantidad de almidón presente en el compuesto.

Como se observó en las gráficas anteriores, se presentó un marcado efecto de la adición del almidón en el poliuretano, la biodegradación de los hidrocarburos aumentó con la adición de almidón al PU. Otro efecto importante fue, la disminución de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> a medida que aumentó el contenido de almidón (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1** Velocidad de producción de CO<sub>2</sub> medida en el día 15.

Material	CO <sub>2</sub> producido (g /m <sup>3</sup> )	*Mineralización (%)	Velocidad específica de producción. ▼mgCO <sub>2</sub> /g hidrocarburo consumido-h △(mgCO <sub>2</sub> /g hidrocarburo consumido-h)
M1	13	64	4.97 (4.97)
M2	245	60	1.75 (75)
M3	318	53	1.52 (82)
M4	384	48	1.37 (89)

▼La velocidad fue calculada suponiendo consumo completo de almidón.

△La velocidad fue calculada sin tomar en cuenta el consumo de almidón.

\*Mineralización suponiendo el consumo total del almidón.

La disminución en la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> se debe básicamente, al aumento en el consumo de los hidrocarburos. Suponiendo que el almidón es consumido completamente, con el material M4, se obtuvo la menor tasa de producción de CO<sub>2</sub>, con la mayor tasa de biodegradación, lo que indicaría, que gran parte del carbono consumido por los microorganismos fue incorporado a biomasa celular. Esto no quiere decir que, la producción de CO<sub>2</sub> disminuyó con el contenido de almidón, pues en la misma Tabla, se observa que, la producción volumétrica de CO<sub>2</sub> debida al consumo de contaminantes y almidón, fue más alta con el contenido de almidón mayor (384 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>). Así mismo, la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> que solamente toma en cuenta el consumo de los contaminantes, fue mayor con el composito M4. Hay que considerar que, el

almidón es una molécula muy simple, que probablemente se agotó en un tiempo corto, y que el CO<sub>2</sub> producido debido a esto, se fue acumulando en el sistema.

En la Tabla 6.2 se muestran los valores promedio de las tasas de biodegradación de la concentración en la fase gas, que se obtuvieron con cada material, así como la biomasa total que se generó en 15 días.

**Tabla 6.2** Velocidad de biodegradación de la concentración en fase gas con PU modificado, y concentración de biomasa final.

Composito	*Velocidad específica de biodegradación de los contaminantes (mg <sub>hidrocarburo</sub> /g <sub>proteína inicial</sub> -h)			▼Biomasa final (mg <sub>proteína</sub> /g <sub>material seco</sub> )	◇R
	hexano	tolueno	MEC		
M1	27.03	105.99	74.20	0.43 ± 0.0	1
M2	18.55	132.49	148.39	1.87 ± 0.05	4.34
M3	43.46	137.79	206.69	2.11 ± 0.11	4.90
M4	79.50	206.69	211.99	2.76 ± 0.46	6.42

\* Valores promedio de los duplicados tomando los primeros 4 días como referencia. La reducción de la concentración del contaminante debida a sorción, está incluida en el valor presentado.

▼ Valores promedio de los duplicados; concentración de biomasa total en 15 días.

◇ R, relación de la concentración de biomasa final respecto a M1.

Se puede decir que a pesar de que con M2 se obtuvo al final un pequeño incremento en el porcentaje de biodegradación de hexano, la velocidad con que se degradó no fue mayor que con el PU sin modificar, ya que ésta fue menor; aunque, con M3 se obtuvo mejor resultado y en el caso de M4, hubo un aumento importante en la velocidad de biodegradación. En cuanto a tolueno, la velocidad de biodegradación obtenida con M4 fue casi el doble que con M1, en este caso M2 y M3 no presentaron mucha diferencia en velocidad de biodegradación, aunque la tendencia es creciente.

Para el caso del MEC, el incremento de la velocidad de biodegradación tuvo una tendencia creciente entre los diferentes compositos, la cual fue especialmente

notoria entre M1 y M2, aunque después se redujo el incremento a 39% al pasar de M2 a M3 y posteriormente el incremento fue mínimo (2.5%) entre M3 y M4. Este comportamiento podría explicarse de la siguiente forma: en principio se observó que a mayor contenido de almidón fue mayor la disponibilidad del contaminante para los microorganismos; en este caso se incrementó tanto la presencia de MEC como de tolueno y hexano, por lo que, de acuerdo a la Tabla 6.2. es posible que los microorganismos hayan utilizado por igual al MEC como al tolueno y finalmente al hexano, para el caso del composito M4. Además, si se observan las velocidades de degradación de los tres compuestos para M3 y M4, claramente se ve que para hexano y tolueno sí existe un incremento en las velocidades respecto de M3, mientras que para MEC no existe gran diferencia.

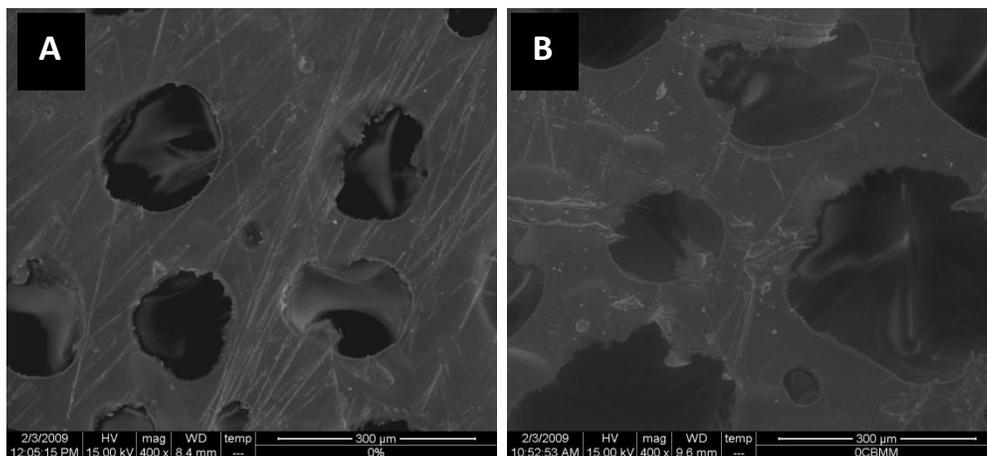
Aunque en algunos casos el incremento en la velocidad no fue tan marcado, la concentración relativa de biomasa determinada como proteína en cada material sí se incrementó (columna 5 de la Tabla 6.2). La medición de la concentración de proteína en los compositos es una medida indirecta de la concentración de biomasa en el soporte. En general, se puede mencionar que a medida que se incrementó el contenido de almidón se incrementó la concentración de biomasa en los compositos, siendo hasta 6 veces mayor en el composito M4 que en el M1 (composito sin modificar).

Las velocidades de degradación obtenidas en los experimentos en lote, así como los tiempos en los que se obtuvo la biodegradación, son mejores que los reportados por Alba y col. (2003), quienes obtuvieron 40 % de biodegradación de tolueno, 80 % de biodegradación de acetona, 80 % de biodegradación de isopropanol y 55 % de biodegradación de una mezcla de xilenos, en 4 días. En ese mismo tiempo en este estudio se obtuvo biodegradación completa de tolueno y MEC. Prenafeta y col. (2002) obtuvieron valores de biodegradación de 100 % en 25 días. A pesar de que estos autores sí obtuvieron biodegradación completa, el tiempo de operación es muy largo, y por otro lado es importante aclarar que ellos utilizaron sistemas de tanque agitado con 25 ml de medio mineral pH 7. Además, en el sistema que utilizaron estos autores, la biomasa se encontraba

completamente suspendida, lo cual facilitó la transferencia de los contaminantes hacia los microorganismos, aunado a que se crearon condiciones adecuadas para la supervivencia y crecimiento de éstos.

### 6.1.2 Microscopía electrónica de barrido de los compositos

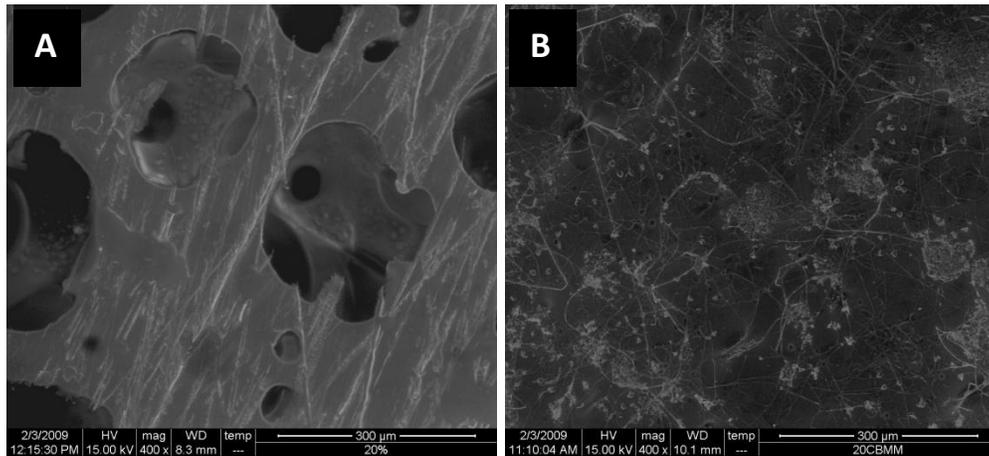
En la Figura 6.1.5 se presentan las micrografías del PU sin modificar tomada al final del experimento de biodegradación en lote (15 días). Como se puede observar, aparentemente no hubo crecimiento de biomasa en la muestra analizada; sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, sí ocurrió la biodegradación de los hidrocarburos a las tasas mostradas en la Tabla 6.2. Debido a que el barrido que se hace en cada muestra no es homogéneo en todo el material, es decir, se realiza sólo en algunas zonas, es probable que los microorganismos responsables de la degradación de hidrocarburos en este material se hayan alojado en otra zona distinta a la visualizada por SEM.



**Figura 6.1.5** Micrografías del material M1; sin inocular, a 300 µm (A); y al final de la cinética de biodegradación, a 300 µm (B).

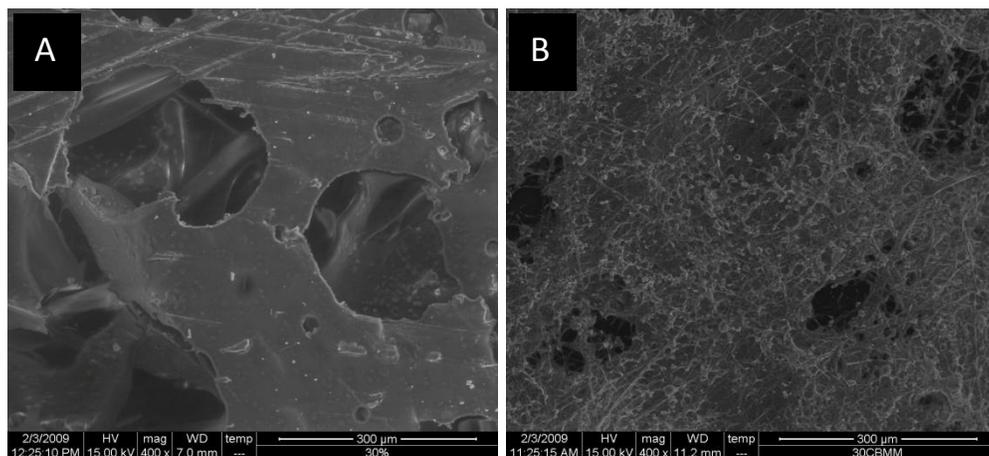
La Figura 6.1.6 corresponde a la micrografía tomada de una muestra del composito M2 (20 % en peso de almidón). Se puede ver crecimiento de biomasa, básicamente hongos debido al tamaño y tipo de crecimiento típico de los hongos, el cual se aprecia a través de la formación de micelio formado por el

entrecruzamiento de las hifas. Como se puede observar, éstas llegaron a cubrir parcialmente la superficie del material; además, no fue posible observar poros en esta micrografía posiblemente debido a que éstos fueron cubiertos por el tipo de crecimiento característico de los hongos.



**Figura 6.1.6** Micrografías del material M2; sin inocular, a 300 µm (A); y al final de la cinética de biodegradación, a 300 µm (B).

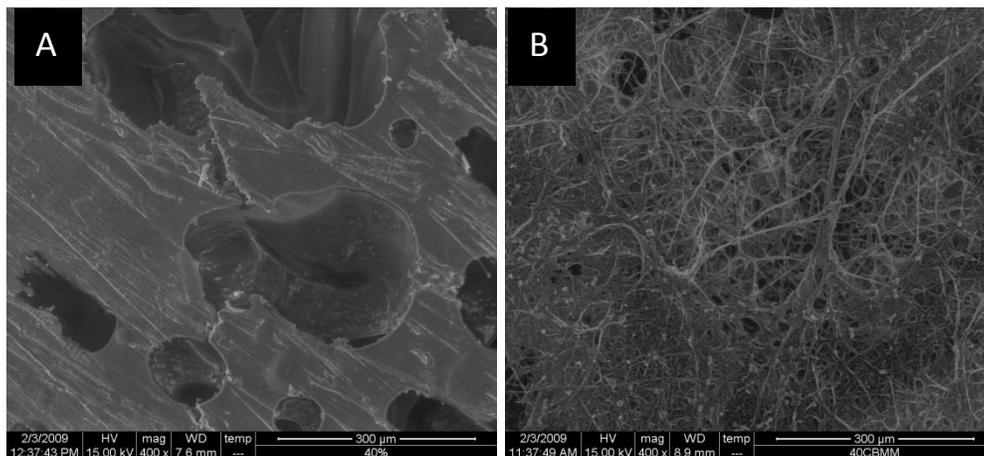
En el caso del compuesto M3 (30 % en peso de almidón), la micrografía en la Figura 6.1.7 presentada a continuación, se aprecia mayor crecimiento micelial que con M2.



**Figura 6.1.7** Micrografías del material M3; sin inocular, a 300 µm (A); y al final de la cinética de biodegradación, a 300 µm (B).

Incluso en dicha Figura es posible observar mayor crecimiento de los microorganismos, además de que el micelio formado es bastante denso; aunque se pueden ver lo que pudieran ser poros propios del material; o bien, podría tratarse de cavidades formadas por la forma de crecimiento del micelio.

Para el compuesto M4 (40% en peso de almidón) la se observa que el crecimiento de microorganismos sobre el material fue mayor que con los otros materiales, dicho crecimiento, mayormente fúngico creció a tal punto que cubrió por completo la superficie del soporte polimérico, como se puede apreciar en la micrografía 6.1.8.



**Figura 6.1.8** Micrografías del material M4; sin inocular (A); y al final de la cinética de biodegradación (B).

El contraste del compuesto M4 respecto a los compuestos M1 y M2 es muy marcado, ya que se ve que la biopelícula formada es bastante densa y profunda. Este comportamiento ayuda a sustentar los valores de velocidades de degradación de hidrocarburos encontradas en cada material ya que la velocidad de degradación de un contaminante es directamente proporcional a la concentración de biomasa en el sistema (lote o continuo). Esta proporcionalidad se da siempre y cuando la biomasa esté completamente activa y no haya limitaciones de transporte de masa e inhibición por altas concentraciones de

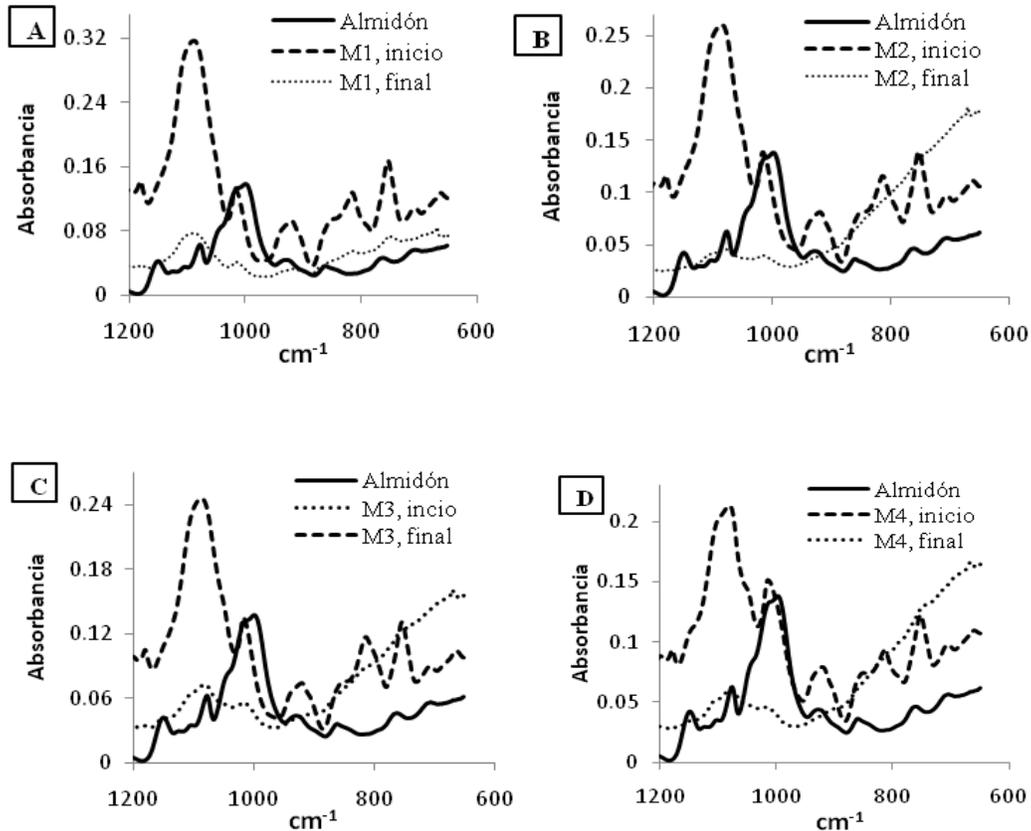
hidrocarburos, que en principio es lo que se supone que se tiene en este sistema de estudio.

En este experimento de biodegradación, la biomasa observada fue consistente con la concentración de proteína determinada, y también con las velocidades de biodegradación obtenidas para los hidrocarburos. Además, a pesar de haber una mayor densidad de biomasa, la forma de crecimiento de ésta es tal que permite el paso hacia el interior del composito, en donde muy probablemente haya más biomasa, considerando que la biopelícula empieza a formarse en la superficie pero es capaz de crecer hacia el interior de los poros del composito para consumir los hidrocarburos sorbidos en los poros del material. Además, hay que recordar que las imágenes de las Figuras 6.1.5 a 6.1.8 fueron tomadas a partir de un corte transversal, lo cual hace pensar que es posible que esta forma de crecimiento de la biomasa, sea debido al tamaño de los poros presentes (400  $\mu\text{m}$ , en promedio), y también, pudo deberse a que el almidón se encontraba disperso en todo el composito y no solamente en la superficie de éste.

### **6.1.3 Caracterización de los compositos**

Se realizaron espectros de absorción en el infrarrojo (FTIR), mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR), para confirmar la presencia del almidón en los compositos, además se les determinó su capacidad de retención de agua, con el objetivo de seleccionar el mejor material para empacar un biofiltro que degradara los mismos compuestos estudiados, es decir, en un proceso en continuo en una columna empacada.

La Figura 6.1.9 muestra los espectros de absorción de cada composito al inicio y al final del experimento de biodegradación.



**Figura 6.1.9** Espectros de absorción en el infrarrojo con Transformada de Fourier sobre el material con base en PU; M1, M2, M3 y M4 (A, B, C y D, respectivamente).

Como se puede apreciar de la Figura anterior, el espectro del almidón muestra su señal principal en  $1050\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, y que se puede asociar a la vibración de los grupos hidroxilo. Esta señal fue detectada en los compositos sintetizados, pero también en el material al que no se le adicionó almidón. Esto indica que la señal correspondiente al grupo carbonilo en tensión del PU se superpone con la señal debida a los grupos hidroxilo del almidón, la cual se fue incrementando de acuerdo al contenido de almidón en cada material. Cabe señalar que los espectros mostrados fueron normalizados para que se pudiesen comparar.

El espectro tomado al final del experimento de biodegradación indica la desaparición de las bandas de absorción correspondientes al almidón y de aquellas que corresponden al PU. Podría pensarse que el mismo material fue degradado por completo junto con el consumo del almidón por los microorganismos; sin embargo, de manera visual no se observó una reducción en el tamaño de los compositos. Una explicación puede ser que la presencia de microorganismos o la composición del medio mineral ocasionen la interferencia en la medición y no puedan detectarse bien las bandas de absorción.

La capacidad de retención de agua de los compositos se incrementó de acuerdo a la presencia del almidón como se muestra en la Tabla 6.3. Este incremento se debió a la presencia de grupos hidroxilo de cada material, los cuales forman puentes de hidrógeno con el agua. Los compositos M3 y M4 retuvieron casi el mismo porcentaje (en peso) de agua.

**Tabla 6.3** Capacidad de retención de agua de cada material estudiado.

Material	M1	M2	M3	M4
<b>*CRA (%)</b>	12.6	26.6	32.1	33.3

\*CRA; Capacidad de Retención de Agua. El termograma correspondiente se puede observar en el Anexo 2.

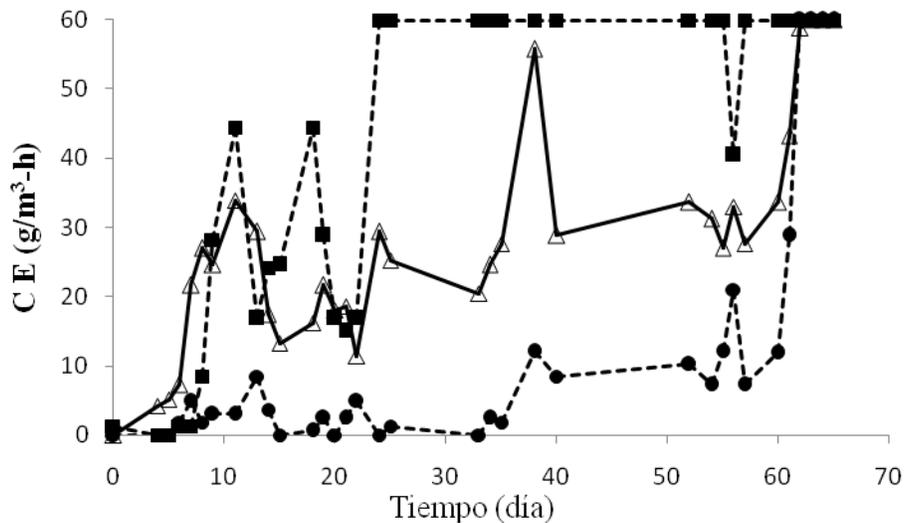
El contenido de humedad en el material es muy importante para la actividad microbiana en la biopelícula. La diferencia mínima que se presentó con este parámetro entre M3 y M4 puede ser la razón de que con MEC no se haya obtenido gran diferencia en las velocidades de biodegradación con estos compositos. Debido a que MEC es muy soluble ( $2.23 \cdot 10^5$  mg L<sup>-1</sup>; ver Tabla 2.2) puede ser que se haya solubilizado mejor en el medio mineral y de esta manera estuvo más disponible para los microorganismos.

Con el compuesto M4 se obtuvo el mejor resultado en términos de velocidad de degradación y de retención de humedad. De acuerdo a esto, se seleccionó el material M4 para empacar un biofiltro y compararse con dos materiales: uno compuesto de polipropileno modificado con fibras de agave y uno comercial conocido como perlita.

## 6.2 Biofiltración en el reactor empacado con Perlita (BP)

### 6.2.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BP

En la Figura 6.2.1 se presenta la CE obtenida para cada compuesto estudiado en el reactor BP.



**Figura 6.2.1** Capacidad de eliminación para hexano (●), tolueno (Δ) y MEC (■) obtenidas en el reactor BP.

En esta Figura se observan variaciones muy marcadas en la CE de los compuestos. Como se puede ver, en el día 24 de operación se alcanzó el 100 % de remoción de MEC con una CE de  $60 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , mientras que solamente el 49 % de tolueno ( $29.4 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  eliminados), y 0% de hexano fueron removidos.

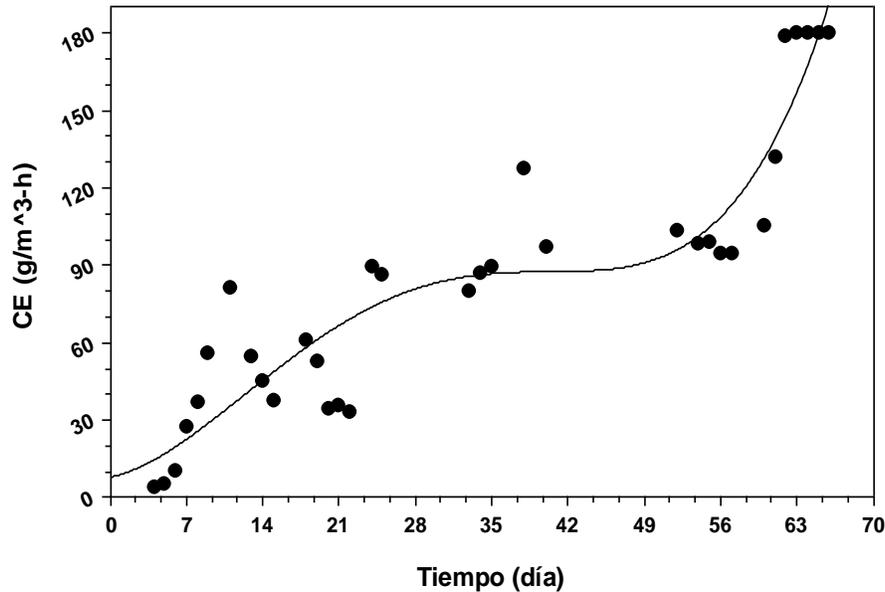
En el día 38 se incrementó la CE del hexano y tolueno, la cual fue de  $14.45 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para hexano,  $53.4 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para tolueno que corresponde al 19 y 89 % de remoción, respectivamente. A diferencia de éstos, la CE de MEC que se alcanzó en el día 24 se mantuvo constante ( $60 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ) durante el tiempo de operación, excepto en el día 56 donde se registró una CE de  $40.49 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (67.5 % remoción). Sin embargo, a partir del día 57, la remoción de este compuesto permaneció en 100 % hasta el final de la operación del reactor. La caída en la CE de MEC se presentó aunada al incremento en la CE de tolueno y hexano. Este comportamiento se observó después de alimentar el reactor BP con la solución de nutrientes a pH 5. El cambio de pH produjo una CE para hexano y tolueno de  $60 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  c/u en el día 62.

La Figura 6.2.1 también indica que MEC es el compuesto que fue degradado mayormente, seguido por tolueno y finalmente hexano, este orden de biodegradación concuerda con el orden de su solubilidad, el cual es de  $2.23 \cdot 10^5 \text{ mg L}^{-1}$  para MEC,  $526 \text{ mg L}^{-1}$  para tolueno y  $9.5 \text{ mg L}^{-1}$  para hexano (Tabla 2.2). Este resultado es congruente tomando en cuenta que entre más soluble sea el contaminante será más fácil su transferencia hacia la biopelícula, donde estará más disponible para que los microorganismos lo utilicen como fuente de carbono y energía que requieren para su crecimiento y mantenimiento celular. Lo anterior está condicionado a que la concentración de contaminante en la biopelícula no sea inhibitoria o tóxica para los microorganismos, lo cual también depende del tipo de contaminante.

En la etapa inicial del reactor BP se observan dos bajas significativas en la CE tanto de tolueno como de MEC en los días 12 y 23, esto se presenta de manera simultánea con un ligero incremento en la CE de hexano. Esto pudo deberse a una competencia entre sustratos por el sitio de unión en las enzimas que llevan a cabo la biodegradación de dichos compuestos. Sin embargo, esto se tendría que investigar con detalle a través de experimentos cinéticos de competencia entre enzimas y sustratos.

### 6.2.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BP

El comportamiento del reactor BP en términos de la mezcla de contaminantes alimentada, se presenta en la Figura 6.2.2.



**Figura 6.2.2** Capacidad de eliminación total en el reactor BP

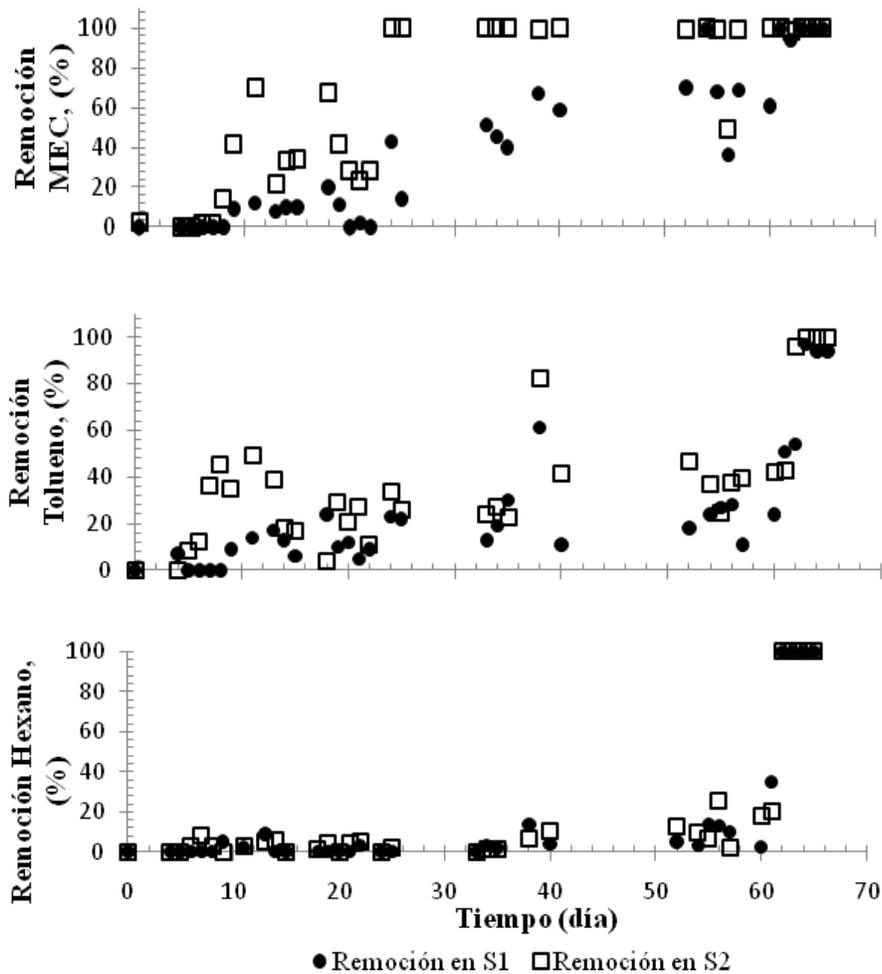
En esta Figura se observa que de manera general el inóculo requirió de un período de adaptación de 5 días aproximadamente. Este tiempo relativamente corto pudo deberse a que el inóculo utilizado estuvo alimentado previamente con hexano, tolueno y tricloroetileno, para un estudio anterior a éste. Sin embargo, con base en los resultados de CE obtenidos con cada compuesto, se puede decir que la CE de la mezcla que se observa en los primeros 35 días fue debido a la biodegradación de MEC y tolueno solamente.

En el período que corresponde del día 24 al día 56, se observa un estado casi estable con una CE total promedio de  $95 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ . En dicho periodo, se cree que los microorganismos capaces de degradar hexano ya estaban aclimatados a las condiciones ambientales del reactor, los cuales al igual que aquellos que consumieron tolueno, mejoraron su actividad metabólica cuando se presentó el

cambio de pH, ocasionando el incremento en la CE total, la cual cambió a  $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  en el día 62 manteniéndose así hasta el día 65, día en que se detuvo la operación del reactor. La producción de  $\text{CO}_2$  en este reactor, en el día 60 fue de  $259 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , con un porcentaje de mineralización de 50 %.

### 6.2.3 Capacidad de eliminación en cada sección del reactor BP

En cuanto a la CE registrada en cada sección del reactor BP, se observaron diferencias durante la operación (Figura 6.2.3).



**Figura 6.2.3** Porcentajes de remoción en ambas secciones del reactor BP, S1 y S2.

La sección 1 (S1) corresponde a la parte alta del reactor por donde el flujo de aire era alimentado de manera descendente, pasando a través de ésta hacia la sección 2 (S2) que corresponde a la parte baja del reactor.

De manera general, se presentó mayor remoción de los compuestos en S2 que en S1. Lo cual se atribuye simplemente a que la alimentación de medio mineral se realizó de manera descendente, tal operación pudo ocasionar el arrastre de biomasa de S1 hacia S2. Aunado a esto, el flujo de la corriente contaminada pudo contribuir con este efecto de lavado de biomasa ocasionando la acumulación en la parte baja del reactor.

Durante los primeros 8 días, no se registró remoción en S1. A partir del día 9 y hasta el día 25 la relación S2/S1 promedio en la remoción de contaminantes fue de 3.47. Durante el período correspondiente a los días 36-60 la remoción promedio en S2 fue sólo 1.62 veces la remoción detectada en S1. Finalmente, durante los últimos 5 días de operación la remoción en ambas secciones permaneció igual ( $S2/S1 = 1$ ) lo que podría indicar que la concentración de biomasa se fue equiparando a través del tiempo.

Para probar lo anterior se realizó la determinación de proteína en muestras de partículas de perlita que fueron tomadas al final de la operación del reactor. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4** Cantidad de biomasa final en la Perlita en la sección 1 (S1) y en la sección 2 (S2) del biofiltro BP.

<b>Muestra Perlita</b>	<b>◇Biomasa final (mg proteína/g material seco)</b>	<b>+Relación (R)</b>
*Perlita control	0.00 ± 0.00	
Perlita S1 (5 cm)	14.02 ± 2.76	1.0
Perlita S2 (40 cm)	22.55 ± 1.6	1.6

◇ Los datos corresponden al día 65 de operación.

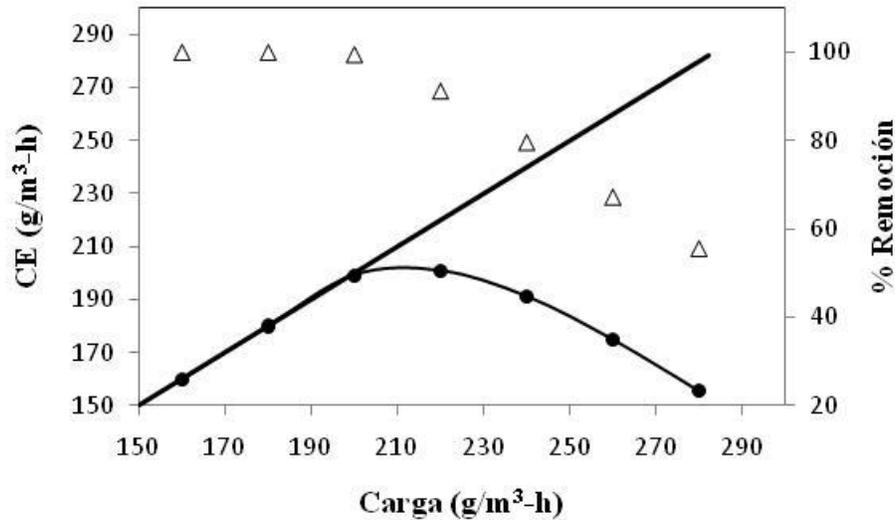
\* Material sin microorganismos.

+ Relación del valor de biomasa final respecto a S1.

Como se puede ver en la Tabla anterior, la concentración de biomasa en S2 fue de 1.6 veces la concentración de biomasa en S1. Con base en los datos de la Tabla y en los datos de remoción en ambas secciones del reactor, se puede decir que la biomasa siempre estuvo más concentrada en S2, y que el aumento en la eficiencia de remoción en ambas secciones se presentó por el incremento en la cantidad de biomasa. Como ya se mencionó anteriormente, la remoción en S2 durante mucho tiempo fue más alta que en S1, y se le atribuyó al arrastre de biomasa por parte del flujo de aire y durante la adición de agua y medio mineral. Este comportamiento es totalmente contrario a lo que fue observado en otro estudio (Sakuma, 2006), donde se determinó mayor concentración de biomasa en la sección superior de la columna empacada. Aunque es importante señalar que, a diferencia de este estudio, la alimentación de la corriente contaminada se hizo de manera ascendente, y en este sentido, ambos estudios coinciden en cuanto a que se encontró mayor cantidad de biomasa en la sección que corresponde a la salida del flujo de aire contaminado.

#### **6.2.4 Efecto de la carga sobre la CE en el reactor BP**

La capacidad de eliminación total de contaminantes en función de la carga total a la entrada del reactor BP se presenta en la Figura 6.2.4. Cuando la carga se aumentó a  $200 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  la remoción se mantuvo en 100 %. Sin embargo, un aumento adicional del 10 % en la carga causó la disminución de la remoción de contaminantes obteniendo una CE de  $220 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ; por lo tanto, ésta quedó definida como la CE máxima.



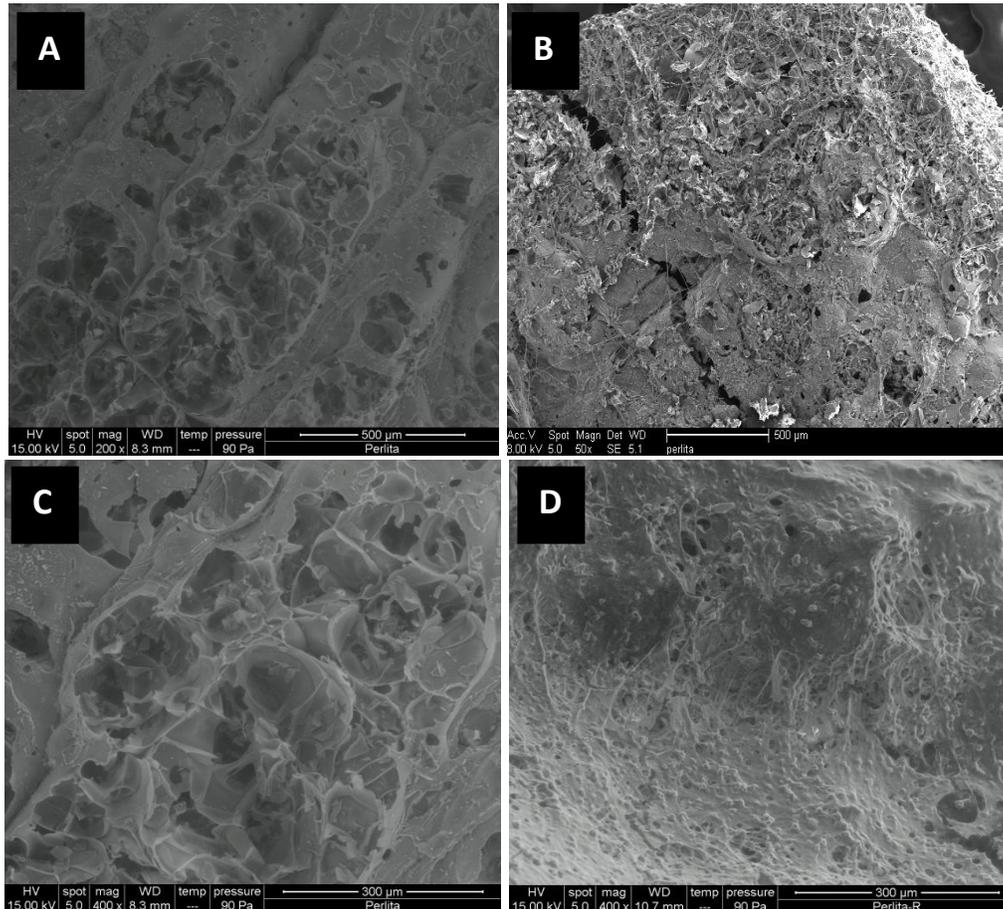
**Figura 6.2.4** Efecto de la carga de contaminantes en la capacidad de eliminación en el reactor BP. La línea sólida (-) corresponde al 100% de remoción teórica; CE en función de la carga (●); Remoción total (%) en función de la carga (Δ).

Como ya se mencionó antes, en este reactor la cantidad de biomasa que se tenía fue muy alta (Tabla 6.3) lo que indica que la biopelícula que rodeaba la mayoría de las partículas del material de soporte era bastante densa, cuando se tienen biopelículas de este tipo se limita la transferencia de masa hacia el interior de las biopelículas y de las partículas, es decir, es muy probable que los contaminantes y el oxígeno no se hayan difundido bien ocasionando que gran parte de la biomasa estuviera inactiva (zonas muertas). Por otro lado, al incrementar la carga se incrementa la concentración de contaminantes en la biopelícula donde, entonces, se presentan limitaciones por reacción, es decir, se sobrepasa la capacidad de biodegradación de los microorganismos (Choi y col., 2002).

Es muy probable que ambas limitaciones; por difusión y por reacción, se hayan presentando en este biofiltro, ya que la biomasa que se generó fue excesiva, lo que puede ser la causa de la reducción en la CE del reactor cuando se incrementó la carga.

## 6.2.5 Microscopía electrónica de barrido en BP

Las micrografías de la Perlita en el día 23 y en el día final de operación (día 65) se muestran en la Figura 6.2.5, a continuación.



**Figura 6.2.5** Micrografías de la Perlita sin microorganismos a 500 y 300  $\mu$ m (A, C; respectivamente), y con microorganismos en los días 23 y 65 de operación, a 500 y 300  $\mu$ m (B, D; respectivamente).

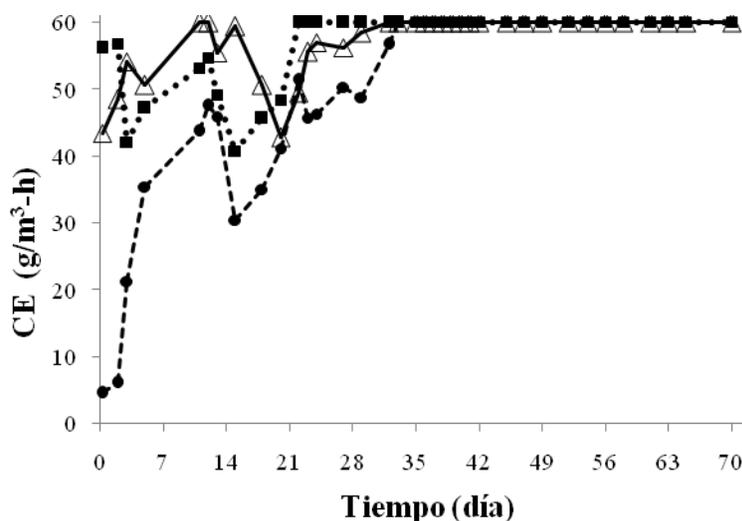
En esta Figura se puede ver en la micrografía B que el material presenta crecimiento fúngico, ya que se observa micelio cubriendo la superficie de la partícula, que inicialmente presenta cierta porosidad con crestas y valles (micrografía A) y que no son evidentes en la micrografía B correspondiente al día 23. Sin embargo, la concentración de biomasa que se observa es menor

comparada con la que se puede apreciar en la micrografía D, la cual corresponde al final de la operación del reactor. En esta micrografía se observa la biopelícula bastante densa rodeando la partícula de Perlita (véase la micrografía C). Esto es consistente con la capacidad de eliminación que se alcanzó para esos días, siendo una CE de  $33 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  en el día 23, y una CE mayor ( $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ) en el día 65.

### 6.3 Biofiltración en el reactor empacado con Poliuretano modificado con almidón (BPU)

#### 6.3.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BPU

En la Figura 6.6 se presenta la CE de cada compuesto en función del tiempo. Se puede decir que en el reactor BPU no se presencié una fase de adaptación, ya que a las 6 horas de haberse inoculado se alcanzó una CE considerablemente alta.



**Figura 6.3.1** Capacidad de eliminación para hexano (●), tolueno (Δ) y MEC (■) obtenidas en el reactor BPU.

La CE de MEC en el día uno fue de  $56 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , que corresponde al 94 % de remoción, mientras que para el tolueno se logró una CE de  $43 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (72 % remoción), y para el caso del hexano solamente se removió el 8 % de éste,

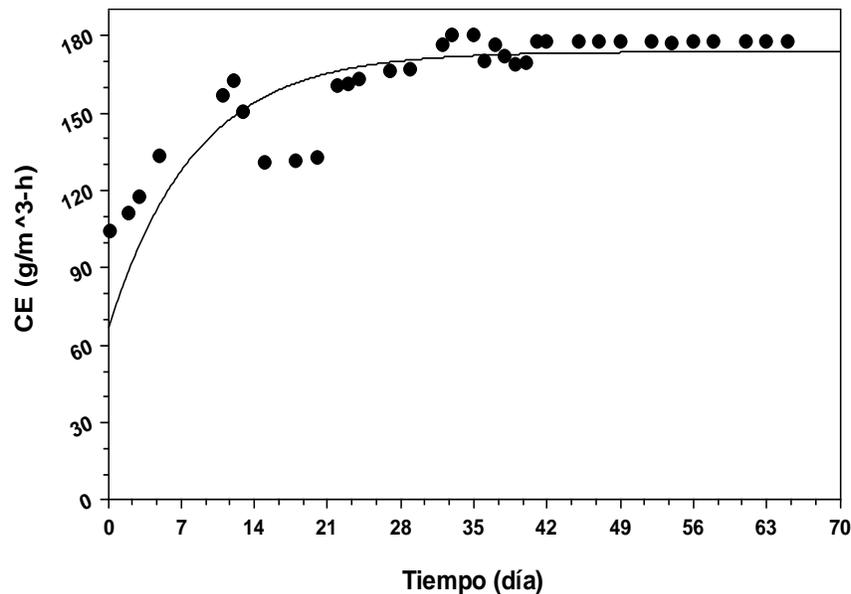
correspondiente a una CE de  $5 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ . Además, en la Figura anterior, la remoción de hexano fue muy baja, de hecho, fue el único compuesto con el que se presentó una fase de adaptación, aunque ésta fue muy corta (2 días aproximadamente) comparada con los resultados obtenidos con el biofiltro de Perlita, e incluso con lo reportado Hernández y col., 2008, quienes utilizaron compositos de polietileno-carbonato como material de empaque, para la eliminación de hexano, estos autores obtienen un tiempo de arranque corto de 12 días; sin embargo, el tiempo de arranque del biofiltro BPU (este trabajo) fue menor. Nótese como en el día 11 ya se había alcanzado el 100 % de remoción de MEC, 89 % de tolueno y 73 % de hexano, con CEs de 60, 53 y  $44 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Este resultado es realmente sobresaliente y alentador pues abre la posibilidad de tener operaciones de biofiltros con altas capacidades y eficiencias de eliminación en tiempos muy cortos.

Conforme transcurrió el tiempo de operación del reactor, en el día 23 la remoción de MEC se mantuvo en 100 %, y ya se había logrado remover el 93 % del tolueno y el 76 % del hexano. La CE de  $60 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  de tolueno se alcanzó en el día 11, la cual bajó en el día 18; sin embargo, se recuperó en el día 32 y se mantuvo hasta el final de la operación. En cuanto a hexano, se logró el 100% de remoción en el día 42, y se mantuvo hasta el día 70 (día en que se paró la operación del reactor).

Durante la operación de este reactor también se presentaron variaciones en la CE de todos los compuestos, como ya se describió. Sin embargo, es de llamar la atención que durante los días 3-18 la CE de tolueno permaneció más alta que la CE de MEC y de hexano, lo cual podría deberse a que el material de empaque todavía no estaba lo suficientemente húmedo para permitir la fácil transferencia del MEC hacia la biopelícula, como ya se ha comentado. Al final, todos los compuestos fueron eliminados de una manera más eficiente que con el reactor BP, ya que existe una buena diferencia en los tiempos en los que se alcanzó el 100 % de remoción de los contaminantes, siendo primero en el reactor BPU que en el BP.

### 6.3.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BPU

El desempeño del reactor BPU fue mucho mejor que el BP en la eliminación de los contaminantes y con un comportamiento sustancialmente diferente al obtenido con el BP; por ejemplo, en el día 1 se tuvo una CE total de  $104 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (57 %) de una carga total de  $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , como se puede apreciar de la Figura 6.3.2.



**Figura 6.3.2** Capacidad de eliminación total en el reactor BPU.

En la Figura se observa que no se presentó una fase de adaptación de los microorganismos a las condiciones del biofiltro, como ocurrió con el biofiltro BP. En este caso, la biodegradación inicial fue muy alta y se atribuye a la biodegradación de los tres compuestos y no solamente a uno como fue el caso de MEC en el reactor BP.

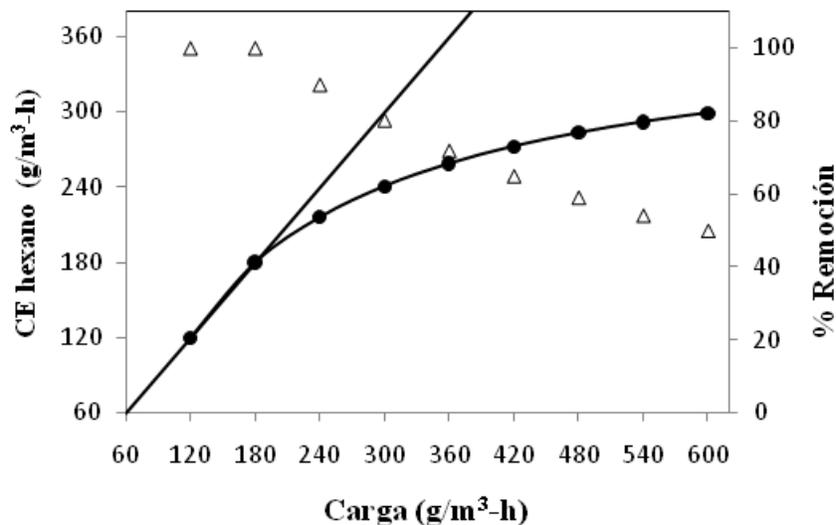
De manera general, la CE fue aumentando y se obtuvo el máximo ( $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ) a partir del día 32, la mitad del tiempo que se requirió en BP para lograrlo. Puesto que en este caso no hubo un cambio de pH en la alimentación del medio mineral, se puede decir que los microorganismos pudieron mantener su actividad

metabólica bajo esta condición, con una capacidad de eliminación (CE) bastante alta desde el inicio de la operación del biofiltro, y además, manteniendo dicha capacidad a lo largo del tiempo, una vez que logró la máxima remoción posible, lo cual se traduce en un biofiltro con una operación bastante estable. El porcentaje de mineralización medido en el día 64 fue de 82 % ( $434 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ), lo que quiere decir que la mayor parte del carbono que se introdujo al sistema fue transformado por los microorganismos a  $\text{CO}_2$  y el resto lo incorporaron a sus células, o se quedó en otros metabolitos producidos.

### 6.3.3 Efecto de la carga sobre la CE en el reactor BPU

#### 6.3.3.1 CE de hexano en función de la carga

El efecto de la carga sobre la CE de hexano se presenta en la Figura 6.3.3.



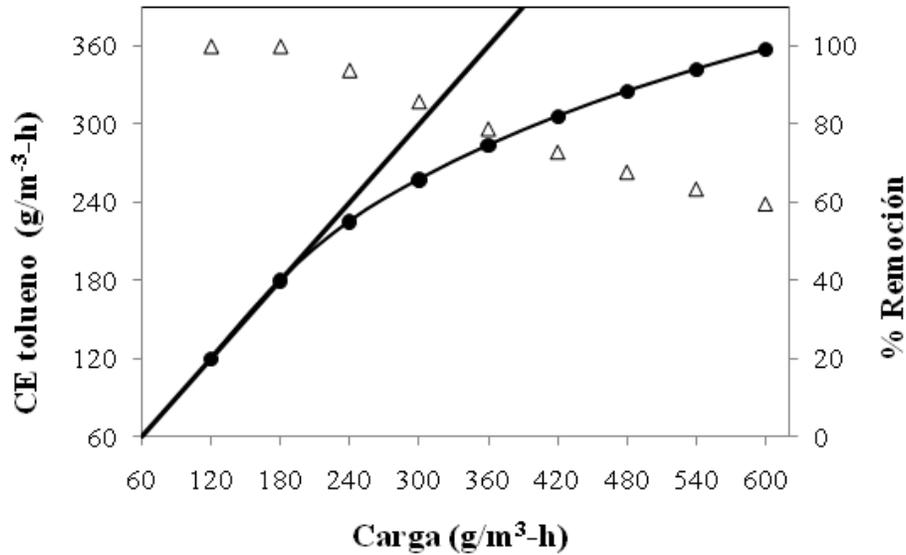
**Figura 6.3.3** Efecto de la carga de hexano en la capacidad de eliminación en el reactor BPU. La línea sólida (-) corresponde al 100% de remoción teórica; CE en función de la carga (●); Remoción (%) en función de la carga (Δ).

La carga crítica, que es la carga donde se obtiene el 95 % de remoción, se presentó cerca de  $180 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  y la CE máxima a una carga de  $600 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  fue de  $299 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , lo cual representa un porcentaje de remoción del 50%. Estos datos de CE crítica y máxima para hexano no habían sido alcanzados ni con el uso de sistemas de dos fases (Hernández y col. 2008; Arriaga y col. 2005; Davison y Daugulis 2003). Dichos sistemas, representan una alternativa de tratamiento de COVs hidrofóbicos en los que la segunda fase se utiliza para lograr que los compuestos poco solubles en agua estén disponibles para los microorganismos. Es por esto que este sistema de biofiltración que utiliza poliuretano modificado, representa una alternativa de tratamiento novedoso y atractivo, con la ventaja de ser un sistema simple, práctico, y asegurar además un buen desempeño y estabilidad en el biofiltro.

Es importante recalcar la alta capacidad de eliminación de este biofiltro, en comparación con la lograda con el BP, la cual disminuyó drásticamente después de  $220 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , en tanto que para el BPU se tuvo una tendencia exponencial con un buen porcentaje de remoción aun a cargas tan altas como  $600 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ .

#### **6.3.3.2 CE de tolueno en función de la carga**

Para el caso del tolueno, en la Figura 6.3.4 se presentan los resultados de capacidad de eliminación en función de la carga.



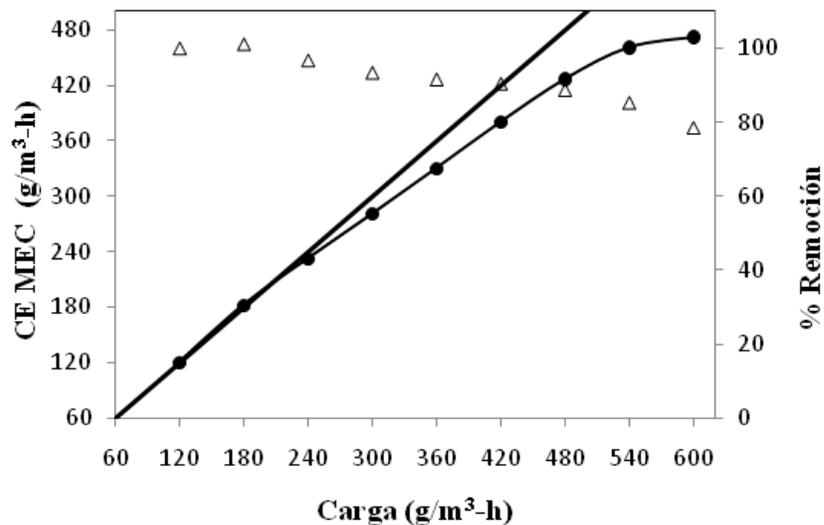
**Figura 6.3.4** Efecto de la carga de tolueno en la capacidad de eliminación en el reactor BPU. La línea sólida (-) corresponde al 100% de remoción teórica; CE en función de la carga (●); Remoción (%) en función de la carga (Δ).

En este caso, la CE crítica fue de  $225 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  y la CE máxima a una carga de  $600 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  fue de  $358 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , lo cual representa una remoción de casi el 60 %. Los valores de CE crítica y máxima de tolueno encontrados en este trabajo son más altos que los reportados por Lim (2005), quien utilizó un biofiltro para la degradación de una mezcla de un compuesto hidrofílico (etanol) y uno hidrofóbico (tolueno). Este autor, obtuvo una CE crítica de  $90 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  y una CE máxima de  $160 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  de tolueno. Los datos de CE obtenidos en este trabajo, son también mayores los reportados por Maestre y col. 2007, quienes utilizaron diferentes materiales empacados (fibra de coco, composta de lodos activados, turba, y hojas de pino). Ellos obtuvieron una CE de tolueno máxima de  $95 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ . En otro estudio de biofiltración de tolueno, se obtuvo una CE máxima de  $120 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , utilizando un lecho empacado con un material a base de residuos agroforestales (Krishnakumar y col. 2007).

El porcentaje de remoción obtenido con tolueno es mejor que el obtenido para el hexano, como consecuencia de la mayor solubilidad del tolueno, y por tanto su mayor disponibilidad para los microorganismos en la biopelícula.

### 6.3.3.3 CE de MEC en función de la carga

En el caso de MEC en la Figura 6.3.5 se presentan los resultados obtenidos de la capacidad de eliminación en función de la carga.

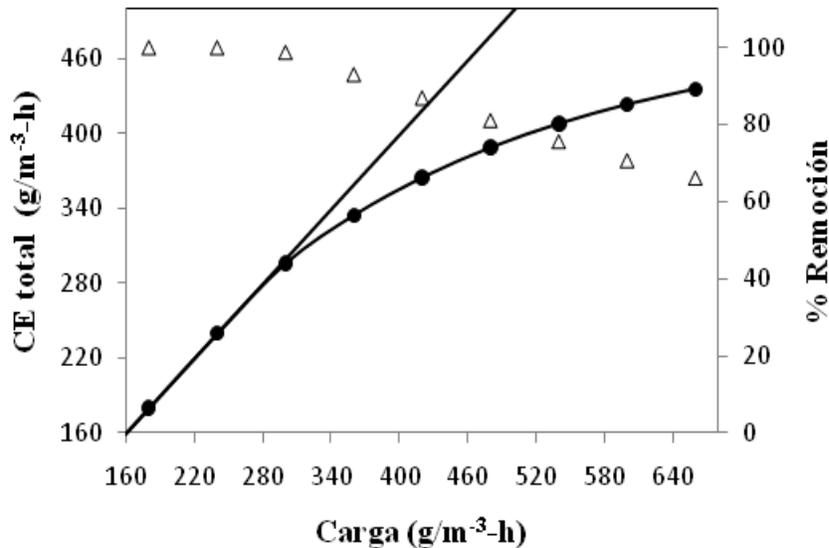


**Figura 6.3.5** Efecto de la carga de MEC en la capacidad de eliminación en el reactor BPU. La línea sólida (-) corresponde al 100% de remoción teórica; CE en función de la carga (●); Remoción (%) en función de la carga (Δ).

Para este caso, la carga crítica se presentó en 280 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>, y la CE máxima fue de 471 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> a una carga de 600 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> y con un 79 % de remoción. Nuevamente, se notó la influencia de la solubilidad en agua del componente a biodegradar, y por ello la curva de CE se acerca más a la curva teórica, lo cual implica una mayor eficiencia de los microorganismos en la biopelícula para degradar MEC. Nuevamente, los valores de CE máxima mencionados para MEC fueron más altos que los que reportaron Chan y col. (2008) que se encuentran en valores de 0.127 gC kg<sup>-1</sup>-h<sup>-1</sup>.

#### 6.3.3.4 CE total de la mezcla de hexano, tolueno y MEC en función de la carga

En cuanto a la mezcla total de los hidrocarburos evaluados, la Figura 6.3.6, muestra los resultados obtenidos.



**Figura 6.3.6** Efecto de la carga total de contaminantes en la capacidad de eliminación en el reactor BP. La línea sólida (-) corresponde al 100% de remoción teórica; CE en función de la carga (●); Remoción total (%) en función de la carga (Δ).

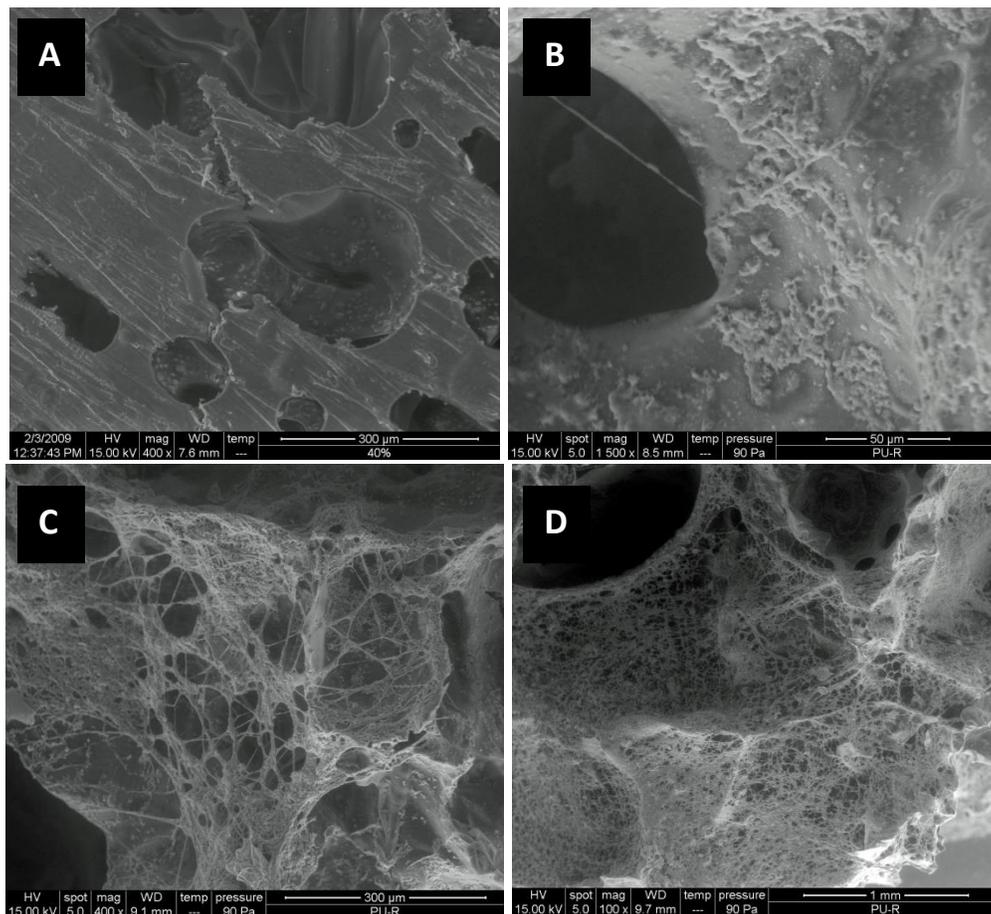
En este caso la carga crítica fue de  $300 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , y se obtuvo una CE máxima de  $435 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  a  $600 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , que representa una remoción del 73 %, lo cual es aun un alto porcentaje con esa carga tan alta.

Los resultados anteriores son la muestra de que el biofiltro empacado con poliuretano modificado tiene un excelente desempeño en términos de eficiencia de biodegradación. En términos de la mezcla de compuestos alimentada, se obtuvieron valores de CE máxima y crítica mayores a los reportados por Mathur y col. (2007), y mayores también, a los obtenidos por Paca y col. (2006) que van de 5 a  $20 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  aproximadamente, para una mezcla de compuestos aromáticos y una mezcla de compuestos hidrofílicos, respectivamente. Ortiz y col. (2003)

estudiaron diferentes materiales de empaque para biofiltrar una mezcla de COVs; y reportaron una CE máxima de  $260 \text{ gC m}^{-3}\text{h}^{-1}$  al utilizar un lecho empacado con carbón activado y vermiculita. Shim y col. (2006) obtuvieron un valor de CE máxima de  $340 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  durante el tratamiento de una mezcla de benceno, tolueno y xileno. Estos valores de CE son menores a los que se obtuvieron en este trabajo.

#### 6.3.4 Microscopía electrónica de barrido en BPU

En la Figura 6.3.7 se muestran las micrografías de muestras del material con base en poliuretano (M4) tomadas del reactor BPU, en el día 70.



**Figura 6.3.7** Micrografías del PU; sin microorganismos a  $300 \mu\text{m}$  (A); y con microorganismos en el día 60, a  $50 \mu\text{m}$ ,  $300 \mu\text{m}$  y  $1 \text{ mm}$  (B, C, D, respectivamente).

En este caso la biomasa que se observa no se encuentra en exceso como lo fue en el caso del BP. Además, se puede apreciar en la Figura que los microorganismos son básicamente hongos cubriendo la partícula del material polimérico. Nótese nuevamente la formación de hifas que se entrecruzan y cubren el empaque polimérico, como ocurrió durante el experimento en lote. Una ventaja que presenta este material es que el crecimiento de biomasa durante la operación en continuo (11 mg proteína/g material seco), no fue excesivo como el generado con la Perlita (22 mg proteína/g material seco), por lo que no existió un impedimento del flujo de la corriente contaminada, es decir, no se presentó el taponamiento de la columna, y se detectó mayor eficiencia en la biodegradación.

El contenido de proteína final fue cuantificado por el método de Lowry, igual que con los materiales anteriores, los resultados se muestran en la Tabla 6.5

**Tabla 6.5** Concentración de biomasa en el composito M4, en el día 70 de la operación del reactor BPU, a diferentes alturas.

<b>Muestra composito M4</b>	<b>Biomasa final (mg proteína/g material seco)</b>	<b>+Relación</b>
*M4 control	1.47 ± 0.014	
M4 ( 3 cm)	4.46 ± 0.63	1.00
M4 (12 cm)	4.71 ± 0.41	1.05
M4 (22 cm)	11.31 ± 1.12	2.53

\*composito sin microorganismos, cuyo dato de proteína ya fue restado a los demás datos que se presentan en la Tabla.

+Relación del valor de biomasa final respecto a M4.

El contenido de proteína en el reactor BPU fue mayor en la sección baja del reactor, que corresponde a la salida de la corriente contaminada. En cuanto a la sección de entrada del flujo, el contenido de proteína fue casi igual al contenido determinado en la mitad de la columna. Este resultado concuerda con lo encontrado en el reactor BP, pues en ambos casos se encontró mayor contenido

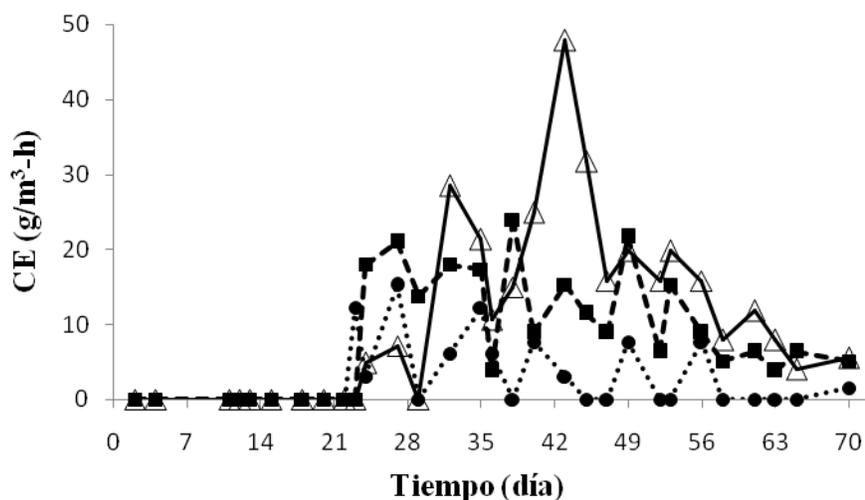
de proteína en la parte baja del reactor, lo que indica mayor concentración de biomasa en esa sección de la columna. La explicación es la misma que en el caso anterior, el agua adicionada en flujo descendente tiende a escurrir acumulándose en la parte baja de la columna, esto aunado a la biomasa que se arrastra con dicho flujo y con el de la corriente contaminada hacen que al final se obtenga mayor contenido de proteína en esa sección de la columna empacada.

La velocidad específica de biodegradación de hidrocarburos en el biofiltro BPU fue de  $520 \text{ mg}_{\text{hidrocarburos}} \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ h}^{-1}$ . Este valor es más alto que el que se obtuvo para el reactor BP que fue de  $80 \text{ mg}_{\text{hidrocarburos}} \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ h}^{-1}$ . A pesar de que con BP se obtuvo mayor concentración de biomasa, la CE máxima que se obtuvo con BPU fue mayor, es por eso que de manera específica este reactor fue más eficiente.

#### 6.4 Biofiltración en el reactor empacado con Polipropileno reforzado con fibra de agave (BPP)

##### 6.4.1 Capacidad de eliminación de hexano, tolueno y MEC en BPP

La CE de los compuestos estudiados en este caso fue muy variable y se presentan en la Figura 6.4.1.

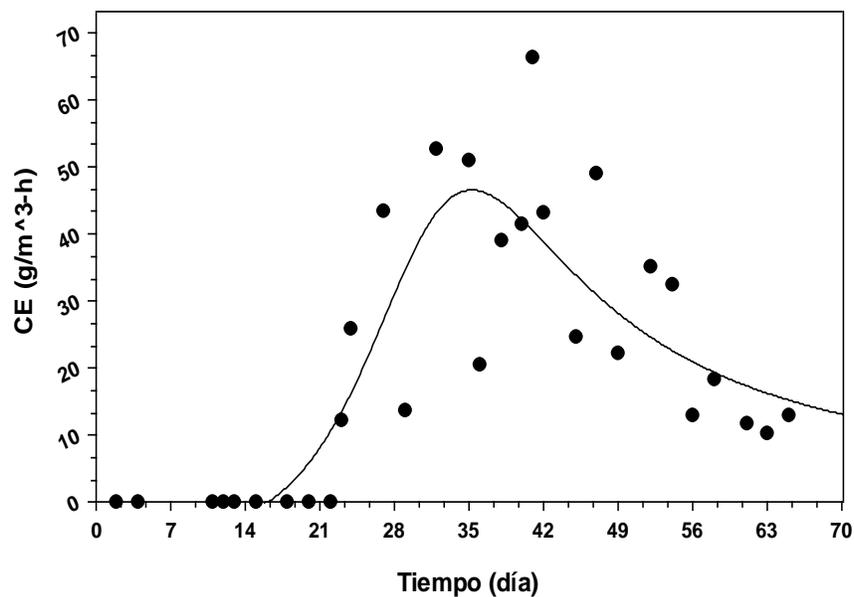


**Figura 6.4.1** Capacidad de eliminación para hexano (●), tolueno (△) y MEC (■) obtenidas en el reactor BPP.

En el día 23 se presentó una CE de hexano de  $12 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , la cual aumentó a  $15 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  ( $25 \%$  remoción) en el día 27, y fue el valor máximo que se obtuvo para este compuesto. Mientras que en el día 24 comenzó la CE de tolueno y MEC con  $5$  y  $18 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  respectivamente. Estos resultados fueron aumentando y disminuyendo durante el tiempo de operación. La CE máxima que se logró para el tolueno fue de  $48 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  ( $42 \%$  remoción) en el día 41. En el caso de MEC se presentó un valor máximo de CE de  $24 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  ( $40 \%$  remoción) en el día 38. Estos valores disminuyeron hasta quedar en  $5.5 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para tolueno,  $5.1 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para MEC y  $1.5 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  para hexano en el día 70. Lo anterior es un indicio de la inestabilidad del proceso ocasionada por este material, para este tipo de biofiltro en un régimen de operación en continuo.

#### 6.4.2 Capacidad de eliminación total de la mezcla de contaminantes en BPP

En la Figura 6.4.2 se presenta la capacidad de eliminación obtenida con este tipo de material.

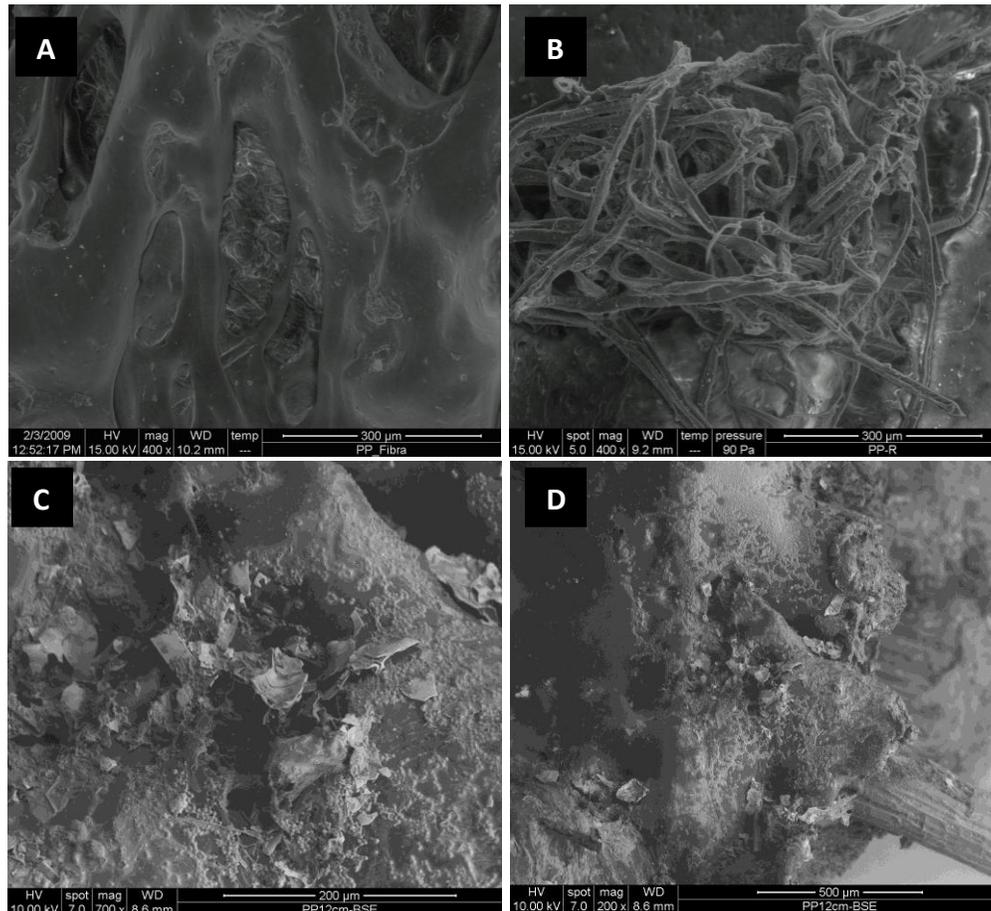


**Figura 6.4.2** Capacidad de eliminación total en el reactor BPP.

Como se puede apreciar de la Figura anterior, con este material el tiempo que tardó el biofiltro en arrancar fue muy largo. Se observó que la eliminación de COVs comenzó hasta el día 23 con un valor de  $12 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (6.79 % remoción), y se observó además, un valor máximo de  $66 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  en el día 41, este valor significa el 36.6 % de remoción total. El comportamiento observado en esta Figura es un incremento inicial en la CE a partir del día 23, el cual comenzó a decaer en el día 42. Dicho incremento pudo deberse a que el material de empaque (PP-Fibra) fue inoculado por segunda vez en el día 21, con lo que se pudieron haber fijado mayor cantidad de microorganismos en este material. Esta concentración de biomasa en el soporte ayudó a la eliminación de contaminantes que se presentó a partir del día 23. A pesar de eso, la actividad de los microorganismos fue decayendo con el tiempo, y ello pudo deberse a la poca retención de agua por parte del material siendo poco propicio para el crecimiento microbiano, o bien a que probablemente en el material existió algún compuesto que resultó tóxico para los microorganismos, aunque esto último está por comprobarse, ya que sabemos que las fibras de agave extruidas con el polipropileno presentan un alto contenido de lignina las cuales probablemente hayan inhibido el consumo de hidrocarburos, o bien, que los microorganismos hayan preferido el uso de este material como fuente de carbono, pues poseen en sus capacidades metabólicas enzimas extracelulares que atacan de manera fuerte los residuos lignino-celulósicos. Existen diversos estudios que corroboran la presencia de estas enzimas en los hongos, y que son capaces de degradar lignina (Steffen y col. 2007; Kennes y Veiga 2004). Además, el inóculo utilizado incluye especies como *Fusarium solani*, y *Nectria haematococca* (Sección 6.6). Estas especies, poseen la capacidad de degradar compuestos recalcitrantes como la lignina, y ligninocelulosa (compuestos que se encuentran en la fibra de agave), por lo que es probable que hayan preferido desdoblar esta moléculas complejas, y eventualmente consumir los hidrocarburos.

### 6.4.3 Microscopía electrónica de barrido en BPP

Las micrografías del compuesto con base en polipropileno y fibras de agave tomadas en el día 70 de operación del biofiltro se muestran en la Figura 6.4.3.



**Figura 6.4.3** Micrografías del compuesto PP-Fibra; sin microorganismos a 300 μm (A); y con microorganismos, a 50 μm, 200 μm y 500 μm (B, C, D, respectivamente).

En las micrografías mostradas se observa que no hay microorganismos en el material control, al inicio de la operación (micrografía A), y además se observa que la fibra del soporte, aparentemente, se comenzó a desintegrar (micrografía B). Esta imagen corresponde a la parte de la entrada de la emisión gaseosa, donde no se observó el crecimiento de microorganismos. Esto pudo deberse a la poca

capacidad de retención de agua por parte del material, la cual es fundamental para el desarrollo microbiano. En las micrográficas C y D, las cuales fueron tomadas con el detector de electrones retrodispersivos, se observa el crecimiento de una biopelícula en donde, debido al tipo de detector utilizado, no se puede distinguir si éste corresponde a crecimiento bacteriano o fúngico. En este caso pudo ocurrir que, como resultado de la desintegración de la fibra, se hayan liberado algunas partículas sólidas, las cuales fueron arrastradas por las corrientes de aire y durante la adición del medio mineral hacia la parte baja de la columna empacada, ayudando en la retención de agua.

Por otro lado, el contenido de proteína en el reactor BPP también fue determinado en las mismas secciones para poder hacer una comparación. El resultado se muestra en la Tabla 6.6.

**Tabla 6.6** Concentración de biomasa final en el composito PP-Fibra en el día 70 de operación del reactor BPP a diferentes alturas.

<b>Material de empaque</b>	<b><sup>φ</sup>Biomasa final (mg proteína/g material seco)</b>
*PP-Fibra control	10.36 ± 0.25
PP-Fibra (3 cm)	3.16 ± 0.97
PP-Fibra (12 cm)	4.86 ± 1.77
PP-Fibra (22 cm)	1.97 ± 1.27

\*composito sin microorganismos.

<sup>φ</sup> Promedio de los duplicados.

En este caso el contenido de proteína de la muestra control dio muy alto, ya que durante la determinación de proteína se produjo una coloración muy intensa debido a algún compuesto presente en la fibra del composito control. Por esta razón, es imposible determinar mediante esta técnica la cantidad de proteína que está asociada con la concentración de biomasa para dicho composito. Por otro lado, la cantidad de proteína resultó mayor en el composito control que en las muestras que fueron tomadas del reactor. Es posible que el compuesto

responsable de la lectura de proteína en el compuesto, se haya ido reduciendo por la actividad de los microorganismos, o por algún compuesto del medio mineral que se estaba alimentando al reactor diariamente. Lo anterior es muy probable puesto que los lixiviados de esta columna presentaron una fuerte coloración café que se pudo haber producido por ciertos compuestos propios de la fibra, estos mismos compuestos pudieron haber reaccionado durante la determinación analítica de proteína con tartrato de cobre formando un complejo, que posteriormente reduce al reactivo de Folin produciendo la coloración azul (Galindo, 2008).

### 6.5 Comparación del material de empaque en el desempeño del biofiltro.

Las características del material de empaque son muy importantes para la fijación de microorganismos y lograr un buen desempeño del biofiltro (Gaudin y col., 2008; Govind y col., 2005; Oh y Choi, 2000; Sakuma y col., 2006). En la Tabla 6.7 se muestran las características relevantes de los tres tipos de materiales utilizados.

**Tabla 6.7** Características del material de empaque de los biofiltros.

Material/parámetro	Perlita	PU-almidón (M4)	PP-Fibra
*Capacidad de retención de agua (% peso)	42.8	33.3	21.7
pH	7.5±0.08	6.7±0.10	4.1±0.20
Tamaño de partícula promedio (mm)	4±0.16	5±0.15	7±0.17
Porosidad del lecho empacado (ε) (%)	56	68	62
Densidad del lecho empacado (g/ml)	0.115	0.073	0.262
Forma de la partícula	Redonda	Cúbica	Cúbica

\*El termograma correspondiente a la pérdida en peso de los materiales se pueden ver en el anexo 3.

La densidad del lecho fue menor con el soporte PU-almidón seguido de la Perlita y el soporte PP-Fibra. Estos valores en densidad fueron apropiados para todos los materiales estudiados, ya que densidades muy bajas aseguran mejores propiedades hidrodinámicas y se previene la compactación de lecho (Gaudin y col., 2008). Dichas densidades son comparables con las de algunos materiales utilizados en otros sistemas de biofiltración como turba (0.21 g/ml), vermiculita (0.15 g/ml), Hydroball (0.27 g/ml) (Haeran Co., Korea) (Young-Sook y col., 2000).

La capacidad de retención de agua de cada material se reporta también en la Tabla anterior. Se observa que la Perlita fue el soporte que mayor agua pudo retener (42.8 %) después de 48 horas que se mantuvo sumergida en agua, y es comparable con la obtenida para algunos soportes utilizados por Gaudin y col. (2008). El composito PU-almidón solamente retuvo el 33.3 %, casi lo mismo obtenido por Hirai y col. (2001). El material que tuvo la menor capacidad de retención de agua fue el PP-Fibra (21.7 %), a pesar de no entrar en el intervalo sugerido, fue mayor al obtenido para algunos compositos sintetizados por Park y col., (2007).

La capacidad de retención de agua del material PP-Fibra fue la menor, aunada a tener un pH más ácido que los otros dos materiales, estos dos parámetros son cruciales para el desempeño del biofiltro (Elías y col., 2002). Es muy probable que estas dos características del material hayan sido la causa de que el desempeño del biofiltro BPP (con polipropileno modificado) no haya sido bueno, pues comenzó con un tiempo de arranque muy largo de 23 días. Después de la segunda inoculación se favoreció la CE en este biofiltro; sin embargo, la eficiencia decayó en el tiempo. Puede ser que el bajo pH (4.08) del composito PP-Fibra haya tenido un efecto importante sobre el desempeño de este biofiltro, similar a lo observado por Prado y col. (2004). El pH de PU-almidón y Perlita fueron los más cercanos a la neutralidad, pero, la solución de nutrientes alimentada a sus respectivos biofiltros fue de 5 y 7. Esto indica que la combinación de pH entre el composito y el

medio mineral en el reactor BPU fue la mejor para el arranque y desempeño del reactor, las cuales fueron 6.79 para el compuesto y 5 para el medio mineral.

En cuanto al tiempo de arranque de los otros biofiltros, el BPU arrancó de inmediato con una CE de  $104 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  y con el BP en el día 7 ya se tenía una CE de  $30 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ . Este resultado en cuanto a los tiempos de arranque obtenidos con Perlita y PU-almidón son comparables a los obtenidos en otros trabajos (Chwun y col., 2003). Un ejemplo, es un estudio donde se llevó a cabo la biodegradación de tolueno utilizando espuma de poliuretano como soporte, se obtuvo una CE en el día 1 de  $76 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  que decayó en el tiempo (a diferencia del presente trabajo, en donde no se tuvo decaimiento en la CE con el poliuretano modificado sintetizado), además, estos autores obtuvieron mejores resultados con un material poroso (porcelita) modificado con una fuente de nutrientes (hueso de ganado) donde el reactor arrancó de inmediato y se alcanzó una CE crítica de  $66 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Sakuma y col., 2006).

En la Tabla 6.8 se presentan los resultados de CE máxima y CE crítica obtenidas con la mezcla de contaminantes estudiada, y el contenido de proteína determinado en cada material.

**Tabla 6.8** Comparación de la CE máxima y CE crítica de la mezcla de contaminantes, y contenido de biomasa final.

Material	CE crítica ( $\text{g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ )	CE máxima ( $\text{g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ )	*Biomasa final ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{material seco}}$ )
Perlita	200	220	$22.5 \pm 1.62$
PU-almidón (M4)	300	435	$11.3 \pm 1.12$
PP- Fibra	NA	NA	-NA

\*Corresponde al valor más alto a lo largo de la columna (promedio de los duplicados).

NA; no aplica debido a que con ese compuesto nunca se alcanzó un estado estable que permitiera hacer variaciones de carga.

-NA; no aplica debido a que no se pudo determinar la concentración de proteína correspondiente a la cantidad de biomasa en el material.

La CE crítica obtenida con el material PU-almidón fue 1.5 veces más alta que la obtenida con el material Perlita, pero en cuanto a CE máxima, ésta fue casi el doble con el soporte PU-almidón que con Perlita. Esto quiere decir que la biomasa que se encontraba en el reactor BP no estaba totalmente activa, ya que pudieron existir limitaciones por difusión hacia el interior de la biopelícula, o puede ser, que se desarrollaron otro tipo de microorganismos que no fueron capaces de soportar cargas de contaminantes tan altas.

En otras palabras, específicamente el reactor BPU fue el más eficiente porque la cantidad de biomasa generada en el soporte PU-almidón fue la mitad de la que se generó con el soporte Perlita, y a pesar de ser una concentración de biomasa menor fue capaz de eliminar más eficientemente cargas de contaminantes más altas. Las CE máximas y críticas obtenidas en este trabajo fueron más altas que las reportadas en otros estudios (Álvarez-Hornos y col., 2008; Lim 2005; Shim y col., 2006).

El tamaño de la partícula del material de empaque, así como la forma, también son parámetros importantes, cuya influencia no se refleja mucho en la etapa de arranque del biofiltro, sino que tiene un efecto significativo sobre la porosidad ( $\epsilon$ ) y compactación del lecho durante la operación, y de esta manera sobre la transferencia de masa en el biofiltro. Estos parámetros fueron medidos al final de la operación en las tres columnas empacadas y se presentan en la Tabla 6.9.

**Tabla 6.9** Porosidad y compactación final obtenida con los tres diferentes materiales, y su relación con el diámetro de partícula.

Material		$\epsilon$ final (%)	Compactación del lecho (cm)	*D partícula / D columna
Perlita	Sección 1	36	2	0.4 ± 0.016 / 9
	Sección 2	26	3	
PU-almidón (M4)		60	NA	0.5 ± 0.015 / 2.6
PP- Fibra		59	NA	0.7 ± 0.017 / 2.6

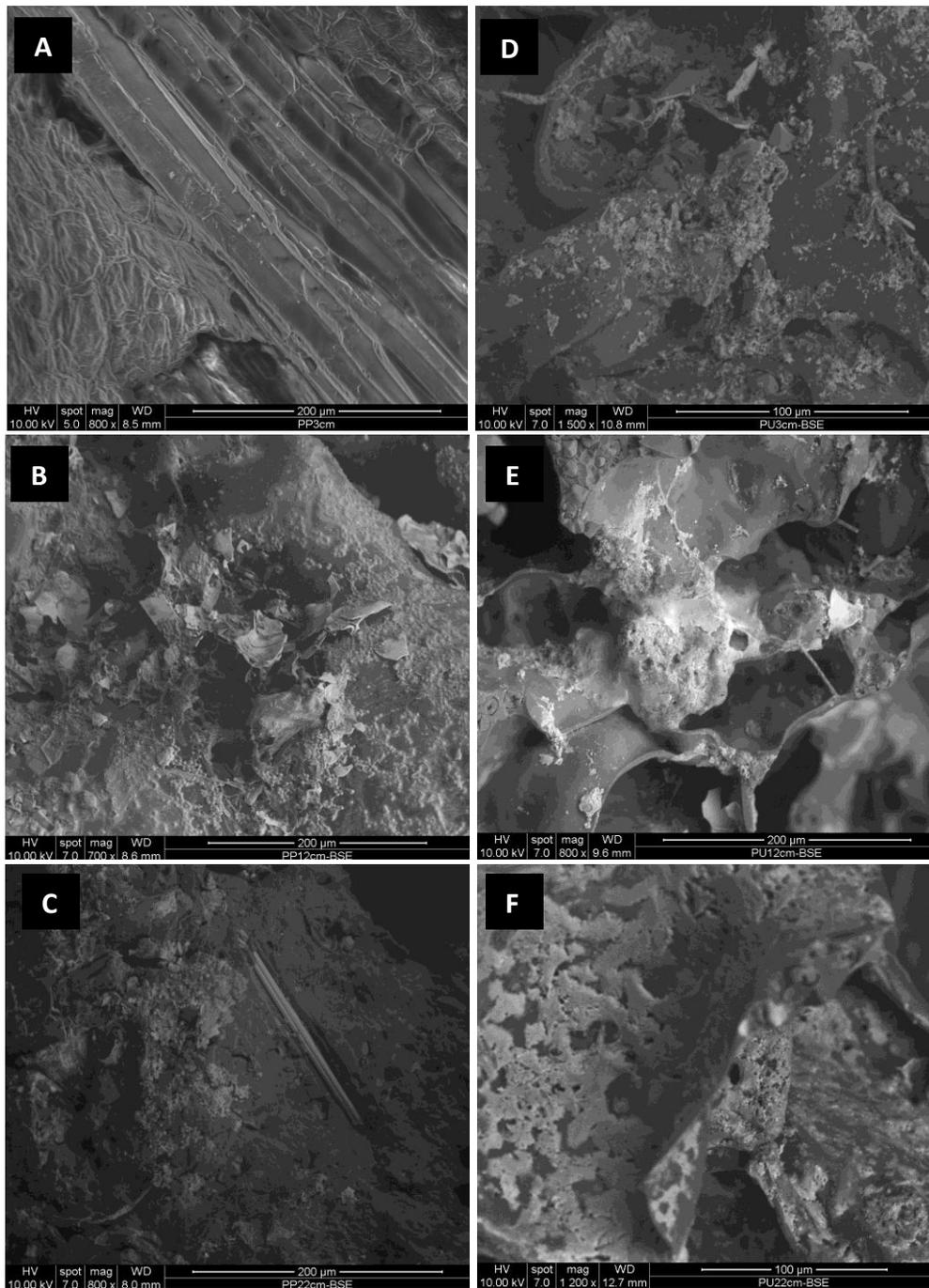
\*D; diámetro (promedio de los duplicados).

NA; no aplica, debido a que no se presentó compactación del lecho.

Como se aprecia en la Tabla anterior, la porosidad  $\epsilon$  del lecho al final del experimento fue menor con Perlita, y fue diferente en ambas secciones. Considerando la  $\epsilon$  inicial, se puede decir que en promedio ésta se redujo un 45 % aproximadamente con este material. En cuanto al compuesto PU-almidón, se detectó una reducción de 11.7 % de la fracción vacía o porosidad ( $\epsilon$ ) del lecho, y una pérdida de 4.8 % con el compuesto PP-Fibra. Estos datos concuerdan con la concentración de biomasa determinada en las muestras que fueron tomadas de las columnas (Tabla 6.9) cuyo resultado indicó mayor concentración con la Perlita, seguido del PU-almidón y finalmente PP-Fibra. Lo anterior, sugiere que al aumentar el contenido de biomasa se reduce la fracción vacía o porosidad del lecho. Además, se observó que cuando el tamaño de la partícula fue mucho menor que el diámetro de la columna, la compactación del lecho fue mayor, es decir, la Perlita fue el único soporte con el que se observó este fenómeno. Es importante remarcar que la longitud perdida por compactación no es muy grande considerando la altura efectiva del lecho en cada sección (24 cm), por lo que sólo se perdió el 8.3 % en la sección 1, y el 12.5 % en la sección 2, en 65 días de operación. También, es importante recordar que el reactor BP sufrió taponamiento de la columna debido a la gran cantidad de biomasa generada, por lo que se puede decir que al tener una porosidad de 26 % en un biofiltro, como la que se obtuvo con Perlita puede provocar severos problemas hidrodinámicos impidiendo el flujo de la corriente contaminada, y por lo tanto mayor inversión económica al tratar de recuperar la eficiencia del biofiltro. En estos términos, el reactor BPU fue mucho más eficiente, ya que el contenido de biomasa determinado como proteína fue la mitad de la que se obtuvo con el biofiltro BP, terminando con una porosidad final de 60 % y sin sufrir compactación del lecho. La porosidad final del biofiltro BPP también fue muy buena (59 %); sin embargo, el desempeño en este reactor no fue así.

El contenido de proteína en las diferentes alturas de la columna (3, 12 y 22 cm de profundidad) fue contrastado con las imágenes tomadas por microscopía

electrónica a esas mismas profundidades, las cuales se pueden observar en la Figura 6.5.1

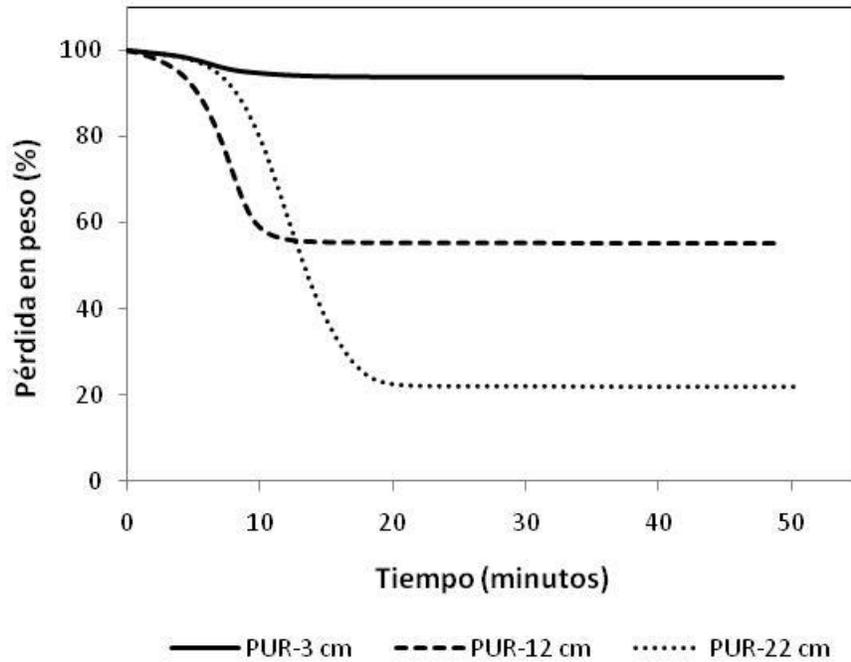


**Figura 6.5.1** Micrografías de los composites a diferentes alturas del reactor. Composite PP-Fibra, observado a 200 μm, a 3 cm (A), 12 cm (B), y 22 cm (C); Composite PU-almidón, observado a 3 cm (D, a 100 μm), 12 cm (E, 200 μm), y 22 cm (F, a 100 μm).

En la Figura anterior se observa que a los 3 cm de la columna empacada (sección entrada) no hubo presencia de microorganismos en el composito PP-Fibra (micrografía A) como ya se mencionó antes. Sin embargo, a los 12 cm de profundidad (micrografía B) se observa la biopelícula cubriendo gran parte de la superficie del material. Cabe mencionar que fue en esta parte del reactor donde se obtuvo mayor concentración de proteína, que si bien corresponde en gran parte a la fibra de agave del material, con esta imagen se corrobora que también corresponde a la cantidad de biomasa que se encontraba fija sobre el composito. Además, a los 22 cm disminuyó tanto la cantidad de proteína como la biomasa observada por microscopía electrónica (micrografía C). A diferencia del biofiltro BPP, el material de empaque en el reactor BPU fue cubierto por microorganismos en todas las secciones del reactor (micrografías D, E y F). El comportamiento en esta columna fue diferente, pues se observó una biopelícula más densa a los 22 cm, esto también es consistente con los valores de proteína reportados en la Tabla 6.5.

En cuanto al contenido de agua final en el lecho empacado, se ha observado que éste se relaciona con el contenido de biomasa en el biofiltro (Álvarez-Hornos y col., 2008). En este estudio sólo se determinó el contenido de agua mediante análisis termogravimétrico, en tres diferentes secciones del biofiltro BPU y el BPP. El resultado del análisis se presenta en las Figuras 6.5.2 y 6.5.3 para las secciones de la parte alta, media y baja de la columna empacada, cuyas alturas son 3, 12 y 22 cm, respectivamente.

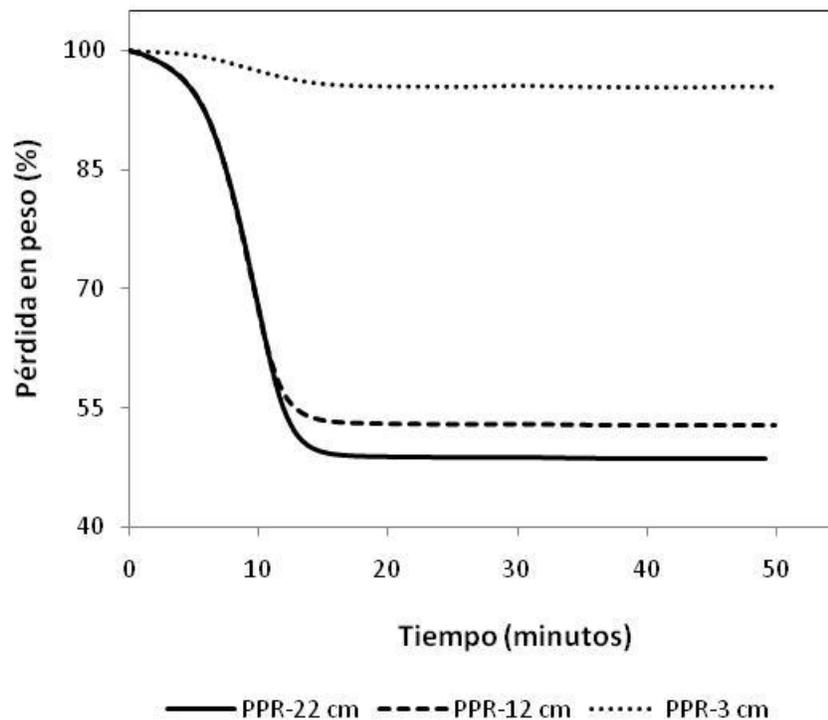
Es importante hacer notar que este contenido de agua corresponde al agua retenida por la partícula del material de empaque más el contenido de agua en la biopelícula que se encuentra rodeando cada partícula.



**Figura 6.5.2** Termograma del material PU-almidón al final de la operación del reactor a diferentes alturas de la columna.

En la Figura 6.5.2 se observa que el contenido de agua final en el lecho empacado se fue incrementando con la profundidad del lecho, en el biofiltro BPU. A los 3 cm de la columna, sección de entrada del flujo de aire contaminado, el contenido de agua fue de 6.4 %. En la mitad de la columna, el contenido de agua en el material fue de 45 %, este valor es más alto que la capacidad de retención de agua inicial determinada para el compuesto PU-almidón que fue de 33.3 %. En la parte baja del reactor, el contenido de agua fue de 78 %. El contenido de agua en las diferentes secciones fue consistente con el contenido de proteína cuantificado en las mismas secciones de acuerdo a la Tabla 6.5. Este mismo comportamiento fue observado por Lim (2005), quienes obtuvieron mayor concentración de biomasa en la sección baja del reactor.

El contenido de agua para el reactor BPP se presenta en la Figura 6.5.3. El análisis se realizó en las mismas secciones de la columna.



**Figura 6.5.3** Termograma del material PP-Fibra al final de la operación del reactor a diferentes alturas de la columna.

Con el compuesto PP-fibra el contenido de agua a los 3 cm de la columna, sección de entrada del flujo de aire (parte alta del reactor), fue de 4.63 %. En la parte media del reactor fue de 47.3 % y en la parte baja de la columna se obtuvo un contenido de agua de 51 %. En este caso la humedad registrada en la parte media y en la parte baja no cambió mucho. Por otro lado, el contenido de proteína en las tres secciones no fue consistente con el porcentaje de humedad final obtenido, aunque hay que recordar que tal determinación de proteína en este compuesto no corresponde solamente al contenido de biomasa, de acuerdo a la Tabla 6.6. Otro dato importante, es que con este material, se detectó de manera visual que prácticamente la mitad de la columna estaba seca. En otras palabras, se perdieron 10 cm en la altura de la columna debido a la poca retención de agua por parte del material. Además, se observó que cuando se adicionaba el medio

mineral se notaba cierta humectación en el material de empaque, la cual se perdía al poco tiempo (1h aproximadamente). Lo anterior, indica que el material es capaz de humectarse de manera inmediata, pero no es capaz de retener el agua con la que establece cierta interacción. Esto pudo ser la causa de las variaciones tan altas que se presentaron en la capacidad de eliminación obtenida con este composito. Por otro lado, la composición de este composito no fue homogénea, es decir, se observaron ciertas zonas en el material correspondientes a polipropileno que no estaba cubierto con fibra de agave. Esto también contribuye a la inestabilidad del biofiltro, debido a las diferencias de sorción de una zona con otra.

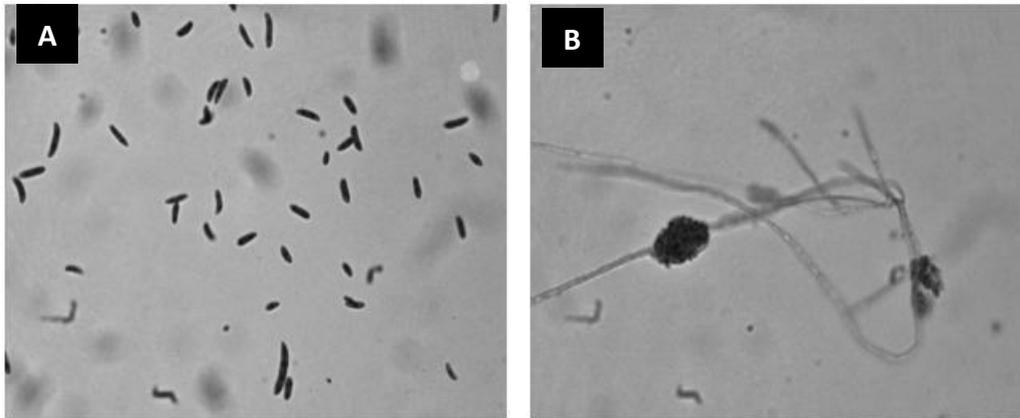
Este comportamiento corrobora que las características del material con que se empaca un biofiltro son muy importantes para lograr que los microorganismos se puedan establecer sobre la superficie del material. Además, hay que tomar en cuenta que durante la fijación de microorganismos sobre un material intervienen interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces covalentes y enlaces covalentes parciales entre los microorganismos y los grupos hidroxilo de las superficies (Malhautier y col. 2005). En el caso del material PU-almidón se tenía al almidón como fuente de carbono y energía para los microorganismos, pero además sirvió para establecer enlaces con los microorganismos durante la fijación sobre la superficie del material, y también para establecer interacciones con el agua. De este modo, se favoreció el crecimiento microbiano de una forma inmediata haciendo posible el rápido arranque del biofiltro BPU. Además, se observó que este composito contribuyó en gran parte a la disponibilidad de los contaminantes para los microorganismos, ya que de acuerdo a los experimentos en lote, el material posee gran capacidad de sorción, lo que no sucede con la Perlita, pues se ha observado que su capacidad de sorción de hidrocarburos es nula (Arriaga y Revah, 2005). Con base en lo anterior, el sistema de biofiltración compuesto por el composito PU-almidón sirvió como un sistema de dos fases donde ocurrió la sorción de los contaminantes sobre el material, incluso del compuesto hidrofóbico (hexano), y la subsecuente biodegradación por parte de los microorganismos, que ayudó en gran medida al arranque y estabilidad del biofiltro.

En cuanto al BPP, no fue posible el arranque inmediato y se presentaron fuertes variaciones que no permitieron un estado estable en este reactor. Este fue el resultado de las características del composito PP-Fibra. La fibra vegetal de la que se compone este composito posee una estructura cristalina, es decir, presenta un arreglo que dificulta el acceso hacia ellas; además, posee también lignina que también es un polímero natural cuya estructura la hace muy difícil de degradar debido a que sus enlaces necesitan de una alta energía para poder romperse. Debido al arreglo de estas estructuras cristalinas, es difícil que las moléculas de agua puedan penetrar dichas fibras (Bovey y Wilson, 1979; <http://es.wikipedia.org/wiki/Lignina>).

En cuanto a la Perlita, ésta posee en su estructura principalmente óxidos de aluminio y de silicio que pueden interactuar con los microorganismos y con las moléculas de agua, además de aquellos enlaces que se establecen entre el material exopolimérico secretado por los microorganismos, los cuales en gran medida ayudaron a la fijación y formación de la biopelícula sobre el material.

## **6.6 Aislamiento e Identificación de especies degradadoras de hexano, tolueno y MEC**

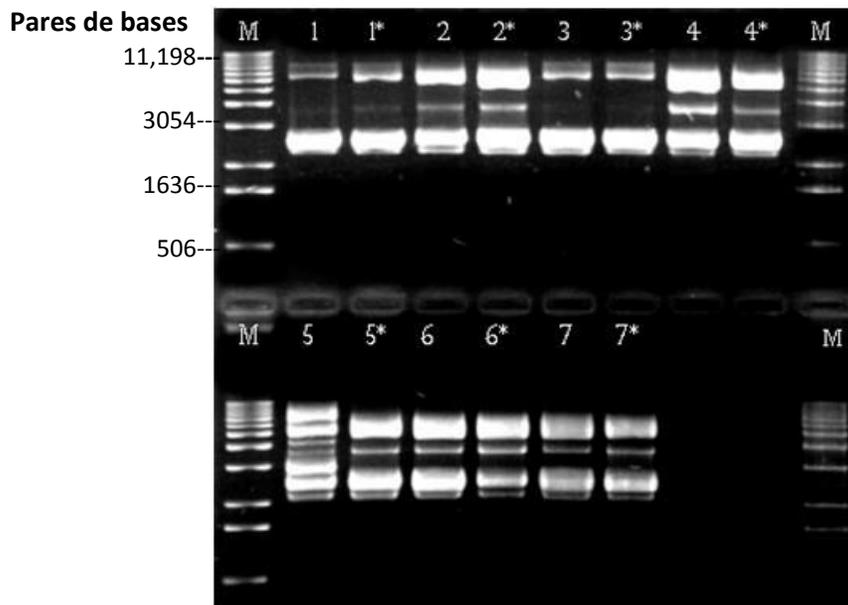
De los experimentos de degradación en lote se aislaron diferentes cepas fúngicas que fueron inicialmente vistas en un microscopio electrónico. En la Figura 6.6.1 se presentan las imágenes más comunes que fueron observadas en todas las muestras.



**Figura 6.6.1** Morfología de los hongos vista en el microscopio electrónico. **A)** Macro y micro conidios de las especies fúngicas; **B)** conidióforos de los hongos.

En la Figura anterior se pueden ver los macro y micro conidios del aislado inicial. A partir de las imágenes que se observaron en el microscopio, se podía decir que las especies fúngicas pertenecían al género *Fusarium*, ya que la forma de bastones que presentan los conidios es típica de esas especies (Figura 6.6.1, A). Para asegurar esto se tuvo que realizar todo el proceso de secuenciación-identificación. Este proceso se realizó a 7 muestras de hongos que presentaron crecimiento diferente en las cajas Petri, dicho crecimiento difería en color, velocidad de propagación y forma de los anillos, es por eso que se creía que se trataban de especies diferentes.

Las clonas purificadas obtenidas al final de todo el proceso de clonación se muestran en la Figura 6.6.2, la cual corresponde al gel de agarosa al 1 % en donde los plásmidos se separaron mediante electroforesis a 90 Kv.



**Figura 6.6.2** ADN Plasmídico de las clonas aisladas. M, marcador de peso molecular; carriles 1 -7, clonas diferentes que se mandaron secuenciar por duplicado (\*).

El resultado de la secuenciación indicó que los 7 hongos correspondían a una sola especie llamada *Fusarium solani* y a su teleomorfo *Nectria haematococca*, las cuales difieren porque la primera se encuentra en su fase asexual y la segunda en su fase sexual.

En la Tabla 6.9 se presentan las clonas con el resultado del análisis de Blast. Las secuencias completas se pueden ver en el anexo 4.

**Tabla 6.10** Identificación de las secuencias genómicas.

<b>Nombre de la clona (Número de carril en el gel)</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>
OB1-1 (1)	<i>Nectria haematococca</i> mpVI cepa HKU-543, gen 18 S ribosomal ARN	52 %	99 %
OB2-2 (2*)	<i>Nectria haematococca</i> mpVI cepa HKU-543, gen 18S ribosomal ARN	52 %	99 %
OB3-1 (3)	<i>Nectria haematococca</i> mpVI cepa HKU-543, gen 18S ribosomal ARN	55 %	99 %
OB4-2 (4*)	<i>Nectria haematococca</i> mpVI cepa HKU-543, gen 18S ribosomal ARN	54 %	99 %
BK1-1 (5)	<i>Fusarium solani</i> aislado S-0900, gen 18S ribosomal ARN	55 %	97 %
BK2-1 (6)	<i>Fusarium solani</i> aislado S-0900, gen 18S ribosomal ARN	51 %	97 %
BK3-2 (7*)	<i>Fusarium solani</i> aislado S-0900, gen 18S ribosomal ARN	54 %	97 %

*Fusarium solani* y su teleomorfo *Nectria haematococca* son especies que poseen la capacidad de resistir condiciones como resistencia a antibióticos, estrés hídrico, toxicidad química, fuentes recalcitrantes de carbono, y condiciones anaerobias. Tomando lo anterior en consideración, es probable que la concentración de nutrientes y agua en el sistema en lote no haya sido lo suficiente para mantener la actividad de los microorganismos, propiciando entonces el crecimiento de especies que son capaces de resistir estas condiciones adversas. Además el agotamiento de oxígeno pudo contribuir a la formación de estas especies como lo son las que se presentan en la Tabla anterior.

*Fusarium solani* y su teleomorfo *Nectria haematococca* son especies que poseen resistencia a antibióticos y capacidad de resistir condiciones como: estrés hídrico, toxicidad química, fuentes recalcitrantes de carbono, y condiciones anaerobias. Tomando lo anterior en consideración, es probable que la concentración de nutrientes y agua en el sistema en lote no haya sido lo suficiente para mantener la actividad de los microorganismos, propiciando entonces el crecimiento de especies que son capaces de resistir estas condiciones adversas. Además, el agotamiento de oxígeno pudo contribuir a la formación de estas especies como lo son las que se presentan en la Tabla anterior. En este sentido no se han encontrado estudios que reporten la capacidad de *Nectria haematococca* para degradar hidrocarburos, lo que resulta muy interesante pues abre la posibilidad de nuevos experimentos con estas especies, los cuales serían muy novedosos.

## 7. Conclusiones

La eficiencia de remoción y la capacidad de eliminación de un biofiltro son función, entre otros factores, de la disponibilidad de los contaminantes en la biopelícula, la cual depende a su vez de la solubilidad en agua de dichos contaminantes; aunado al tipo de material de empaque y sus características fisicoquímicas.

En el presente estudio se observó que las propiedades fisicoquímicas de los materiales de empaque (porosidad, pH, capacidad de retención de agua, densidad, contenido de nutrientes y fuentes de carbono) de los biofiltros operados influyeron en el desempeño de éstos.

En la primera parte de este trabajo se observó que la tasa de biodegradación de los hidrocarburos estudiados fue función del contenido de almidón en el material de poliuretano. El material con 40% de almidón fue el más adecuado para llevar a cabo la degradación de la mezcla de hidrocarburos. Lo anterior, básicamente porque la cantidad de almidón presente en el empaque con base en poliuretano afecta la cantidad de biomasa generada y por tanto la velocidad de biodegradación de los contaminantes. Entre mayor sea el contenido de almidón, mayor es la concentración de biomasa y mayor es la velocidad de biodegradación.

En los experimentos operados con alimentación continua, el almidón presente en el poliuretano modificado actuó como una fuente de carbono fácilmente asimilable para los microorganismos inoculados en dicho material, ayudando a la generación de biomasa y, consecuentemente, en la disminución del tiempo de arranque del biofiltro, obteniéndose tiempos de arranque de 6 horas. Además, sirvió como un depósito de los hidrocarburos haciéndolos así más biodisponibles para el ataque microbiano ya que estos fueron sorbidos en este material favorablemente. Esta sorción ayudó a su vez, a amortiguar las variaciones de carga que se presentaron durante toda la operación del reactor.

Para las pruebas en biofiltros, el material de empaque con mejor desempeño fue el de poliuretano modificado, seguido de la perlita, y finalmente el de polipropileno con fibra de agave.

La biodegradación de los compuestos, tanto en el proceso en lote como en continuo e independientemente del tipo de empaque, mostró el siguiente orden de biodegradación de MEC, seguido por tolueno y finalmente hexano.

En el caso del material con poliuretano modificado con almidón se favoreció el crecimiento de especies fúngicas durante los experimentos en lote, siendo estas identificadas como *Fusarium solani* y *Nectria haematococca*, las cuales raramente coexisten a la vez. En todos los experimentos en continuo se evidenció la presencia de especies fúngicas principalmente.

## 8. Perspectivas

Estudiar la biodegradación de tolueno, hexano y MEC, en experimentos en lote, en medio líquido, utilizando *Fusarium solani* y *Nectria haematococca*, en cultivo mixto y como una sola especie. Lo anterior, con el fin de determinar si existe un mecanismo de competencia, o por el contrario, una asociación entre estas dos especies, para que ocurra la degradación de estos COVs.

Llevar a cabo la biofiltración de hexano, tolueno y MEC, en un biofiltro empacado con el composito PU-almidón, bajo las mismas condiciones de operación, pero, con un tiempo de operación más largo (p. ej. 1 año), para observar las condiciones del material en el lecho empacado, en ese tiempo. Así mismo, realizar mediciones de la producción de CO<sub>2</sub> diariamente, especialmente de la etapa inicial, para tratar de determinar el tiempo en que el almidón es consumido por completo.

Utilizar el mismo sistema del biofiltro BPU (empacado con PU-almidón) para la degradación de un compuesto más hidrofóbico que el hexano, con el fin de corroborar la eficacia del sistema, cuando es aplicado para la biodegradación de otros compuestos.

## Referencias

Aizpuru A, Dunat B, Christen P, Auria R, García Peña , Revah S, “Fungal Biofiltration of toluene on Ceramic Rings”, *J. Environ. Eng. ASCE*, **131**: 396-402 (2005).

Alba J, Conde E, Pérez-Guevara F, “Degradation of the main components by the mould *Scopularis brevicaulis* cultured on rice hulls”, *Lett. in Appl. Microbiol.* **37**: 7-11, (2003).

Arriaga S, Figueroa P, Colecio-Juárez, Alméndarez-Camarillo A, “Identification and Quantification of Volatile Organic Compounds (VOCs) using Tedlar Bag/Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME/GC/MS) in Workplace Air from Footwear Industry” en Air and Waste Management Association, (2009).

Arriaga S, Revah S, “Improving Hexane Removal by Enhancing Fungal Development in a Microbial Consortium Biofilter”, *Biotechnol Bioeng* **90**: 107-115 (2005).

Barona A, Amurrio A, Cano I and Arias R, “Hydrogen sulphide adsorption on a waste material used in bioreactors”, *Biochem. Eng. J.* **24**: 79-86 (2005).

Chan WC, Peng KH, “Biofiltration of ketone compounds by a composite bead biofilter”, *Bioresour Technol.* **99**: 3029-3035 (2008).

Chan W, Lu M, “A New Type Synthetic Filter Material for biofilter: Preparation and its Characteristic Analysis”, *J. Polym. Environm.* **13**: 7-17 (2005).

Choi SC, Oh YS, “Simultaneous removal of benzene, toluene and xylenes mixture by a constructed microbial consortium during biofiltration”, *Biotechnol. Lett.* **24**: 1269-1275, (2002).

Davison CT, Daugulis A.J. “The treatment of gaseous benzene by two-phase partitioning bioreactors: a high performance alternative to the use of biofilters”, *Appl Microbiol Biotechnol.* **62**:297-301 (2003).

Devinny JS, Deshusses MA, Webster TS, “Biofiltration for Air Pollution Control” Lewis Publishers (Ed), pp 1-110 (1999).

Deshusses M, Johnson C “Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment”, *Environ Sci Technol* **34**:461-467(2000).

Elias A, Barona A, Arreguy A, Rios J, Aranguiz I, Peñas J, “Evaluation of a packing material for the biodegradation of H<sub>2</sub>S and product analysis”, *Proc. Biochem.* **37**: 813-820 (2002).

Environmental Protection Agency, (2009), <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html>

Ergas JS, Cárdenas B, “Biofiltration: Past, Present and Future directions”, *Biocycle* **45**: 35-39 (2004).

Galindo GJH and Arriaga S, “Biodegradación de hidrocarburos con distintas solubilidades en sistemas bifásicos”,  
(<http://www.ipicyt.edu.mx/Divisiones/CienciasAmbientales/PosgradoAmbiental/Tesis.htm>) (2008).

Gaudin F, Andres Y, Le Cloirec P, “Packing material formulation for odorous emission biofiltration”, *Chemosphere* **70**: 958-996 (2008).

Goncalves JJ and Govind Rakesh, “Enhanced Biofiltration Using Cell Attachment Promoters”, *Environ. Sci. Technol.* **43**: 1049-1054 (2009).

Govind R, Narayan S, “Selection of bioreactor media for odor control”, in *Biotechnology for odor and Air Pollution Control*, ed by Zarook shareefdeen and Ajay Singh. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 65-100 (2005).

Hernández MO, Bárzana E, Arriaga S, Hernández LM and Revah S, Fungal Removal of Gaseous Hexane in Biofilters Packed With Poly (Ethylene Carbonate) Pine Sawdust or Peat Composites, *Biotechnol. Bioeng.* **100**: 864-871 (2008).

Hirai M, Kamamoto M, Yani M, and Shoda M, "Comparison of the Biological H<sub>2</sub>S Removal Characteristics among Four inorganic Packing materials", *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 396-402 (2001).

Hwang JW, Jang SJ, Lee EY, Choi CY, Park S, "Evaluation of composts as biofilter packing material for treatment of gaseous p-xylene", *Biochem Eng J*, **35**: 142-149 (2007).

Hwang SC, Lee CM, Lee HC, Pua HF, "Biofiltration of waste gases containing both ethyl acetate and toluene using different combinations of bacterial cultures", *J. Biotechnol.* **105**: 83-94 (2003).

Instituto de Ecología de Guanajuato, "Inventario de Emisiones 2004", (2006).

Jang JH, Hirai M, Shoda, "Styrene degradation by *Pseudomonas* sp. SR-5 in biofilters with organic and inorganic packing materials", *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 349-355 (2004).

Jeong GT, Lee GW, Cha JM, Park DH, "Comparison of packing materials in biofilter system for the biological removal of hydrogen sulfide: Polypropylene fibrils and volcanic stone", *Korean J. Chem. Eng.* **25**: 118-123 (2008).

Kennes C, Veiga M, "Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air" *J. Biotechnol.* **113**: 305-319 (2004).

Kennes C and Veiga MC, "Inert filter media for the biofiltration of waste gases-characteristics and biomass control", *Re/Views in Environ. Sci. and Bio/Technol.* **1**: 201-214 (2002).

Kennes C, Veiga M, "Bioreactors for waste treatment", Kluwer, Dordrecht, pp 17-46 (2001).

Khammar N, Malhautier L, Degrange V, Lensi R, Godon JJ, Fanlo JL, "Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters", *J Appl Microbio* **98**: 476-490 (2005).

Krishnakumar B, Hima AM, Haridas A, "Biofiltration of toluene-contaminated air using an agro by-product-based filter bed", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 215-220 (2007).

Lee TH, Kim J, Kim MJ, Ryu HW, Cho KS, "Degradation characteristics of methyl ethyl ketone by *Pseudomonas* sp. KT-3 in liquid culture and biofilter", *Chemosphere* **63**: 315-322, (2006).

Lim KH, "The treatment of Waste-air Containing Mixed Solvent using a Biofilter 2. Treatment of Waste-air Containig Ethanol and Toluene in a Biofilter", *Korean J. Chem. Eng.* **22**: 228-233 (2005).

Maestre P, Gamisans X, Gabriel D, Lafuente J, "Fungal biofilters for toluene biofiltration: Evaluation of the performance with four packing materials under different operating conditions", *Chemosphere* **67**: 684-692 (2007).

Malhautier L, Khammar N, Bayle S and Fanlo JL, "Biofiltration of volatile organic compounds", *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 16-22 (2005).

Mathur AK, Majumder CB, Chatterjee S, "Combined removal of BTEX in air stream by using mixture of sugar cane bagasse, compost and GAC as biofilter media", *J. Hazard. Mater.* **148**: 64-74 (2007).

Morales M, Hernandez S, Cornabe T, Revah S, Auria R, "Effect on drying on biofilter performance: modeling and experimental approach", *Environ Sci Technol* **37**:985-992 (2003).

Oh YS, Choi SC, "Selection of Suitable Packing Material for Biofiltration of toluene, m- and p-Xylene Vapors", *J Microbiol* **38**: 31-35 (2000).

Ortiz I, Revah S, Auria R, "Effects of Packing Material on the Biofiltration of Benzene, Toluene, and Xylene Vapours", *Environ. Technol.* **24**: 265-275 (2003).

Paca J, Klapkova E, Halecky M, Jones K and Webster TS, "Interactions of Hydrophobic and Hydrophilic Solvent Component Degradation in an Air-Phase Biotrickling Filter Reactor", *Environmental Progress* **25**: 365-372 (2006).

Park OH, Han JE, "Performance of composite ceramic and organic-clay carriers in biofilters treating hydrogen sulfide gas and toluene vapor", *Korean J. Chem. Eng.* **24**: 233-238 (2007).

Pinto L, Pires J, Carvalho A, de Carvalho M, Bordado J, "Sorption Isotherms of Organic Vapors on Polyurethane Foams", *J. Phys. Chem. B* **108**: 13813-13820 (2004).

Prado O, Veiga M, Kennes C, "Treatment of gas-phase methanol in conventional biofilters packed with lava rock" *Water Research*, **39**: 2385-2393 (2005).

Prenafeta BFX, IllaJ, van Groenestijn JW and Flotats X, "Influence of synthetic packing materials on the gas dispersion and biodegradation kinetics in fungal air biofilters", *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 319-327 (2008).

Raeder U, Broda P, "Rapid preparation of DNA from filamentous fungi", *Lett. Appl. Microbiol.* **1**: 17-56 (1989).

Revah S, Morgan-Sagastume J, "Methods of Odor and VOC Control", in *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*, ed by Zarook shareefdeen and Ajay Singh. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 16-63 (2005).

Sakuma T, Hattori T and Deshusses MA, "Comparison of Different Packing Materials for the Biofiltration of Air Toxics", *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **56**: 1567-1575 (2006).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), (<http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/calidaddelaire/Pages/InventarioNacionaldeEmisiones.aspx>), (2002).

Shim EH, Kim J, Cho KS, Ryu HW, "Biofiltration and Inhibitory Interactions of Gaseous Benzene, Toluene, Xylene, and Methyl tert-Butyl Ether", *Environ. Sci. Technol.* **40**: 3089-3094 (2006).

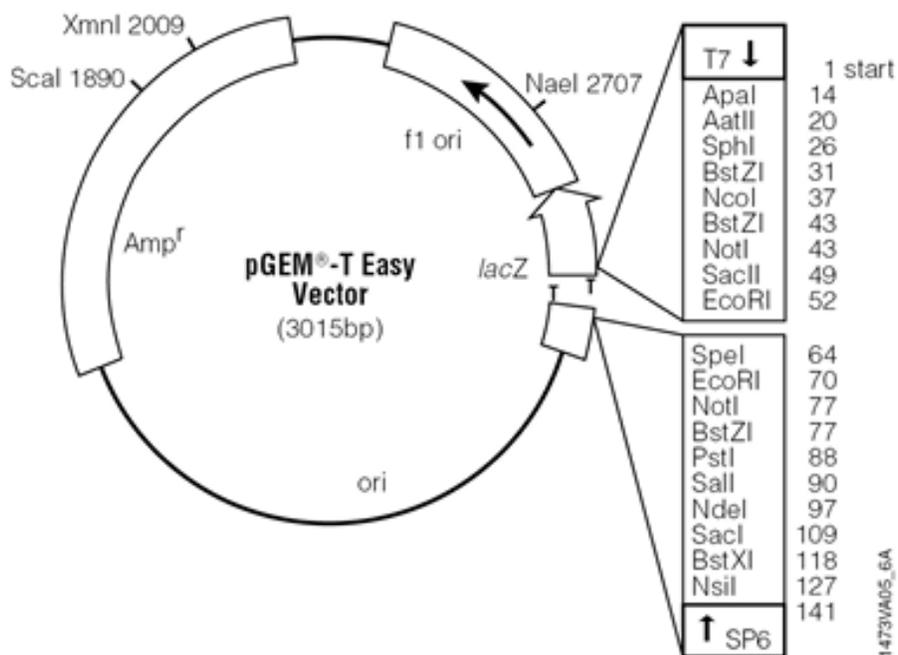
Steffen K, Schubert S, Tuomela M, Hatakka A, Hofrichter M, "Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi", *Biodegradation* **18**: 359-369 (2007).

Thalasso F, Pineda-Olmedo R: Biofiltration: "Tratamiento biológico de Aire Contaminado", *Avance y Perspectiva* **21** (2002).

Van Groenestijn J W, Hesselink P "Biotechniques for air pollution control". *Biodegradation* **4**: 283-301 (1993).

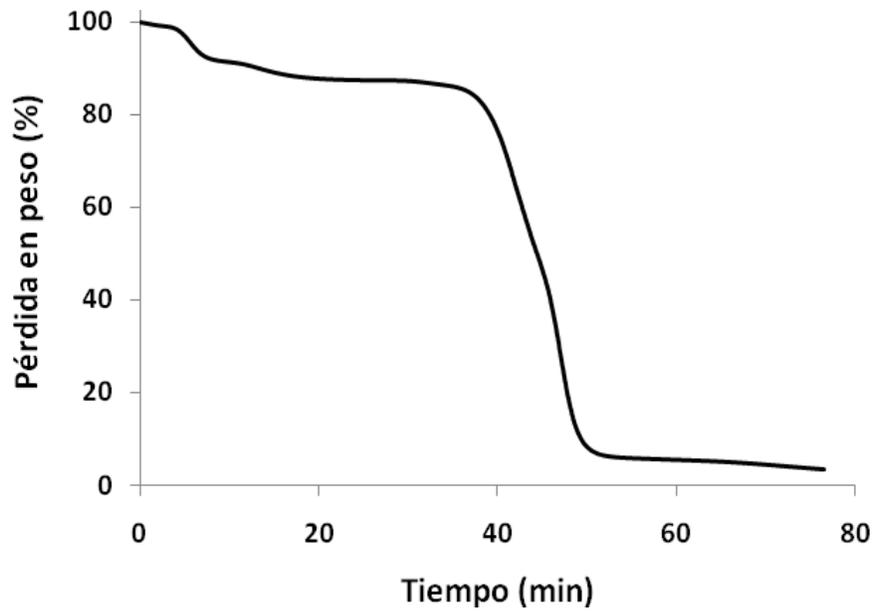
Zuk M, Tzintzun M, y Rojas L, "Tercer almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en nueve ciudades mexicanas", *Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología*, (2007).

### Anexo I. Mapa del vector de clonación pGEMT

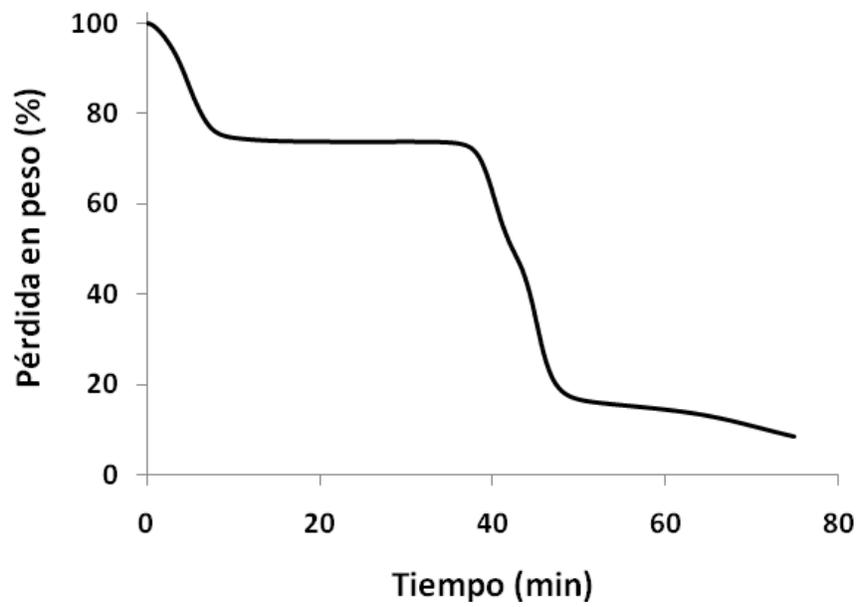


**Anexo II. Termograma de los composites M1, M2, M3 y M4.**

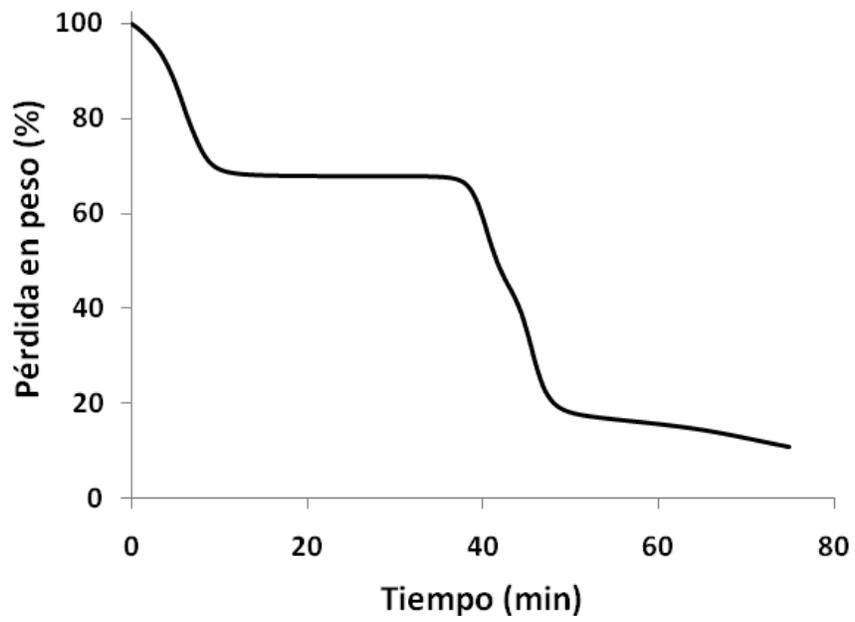
**M1**



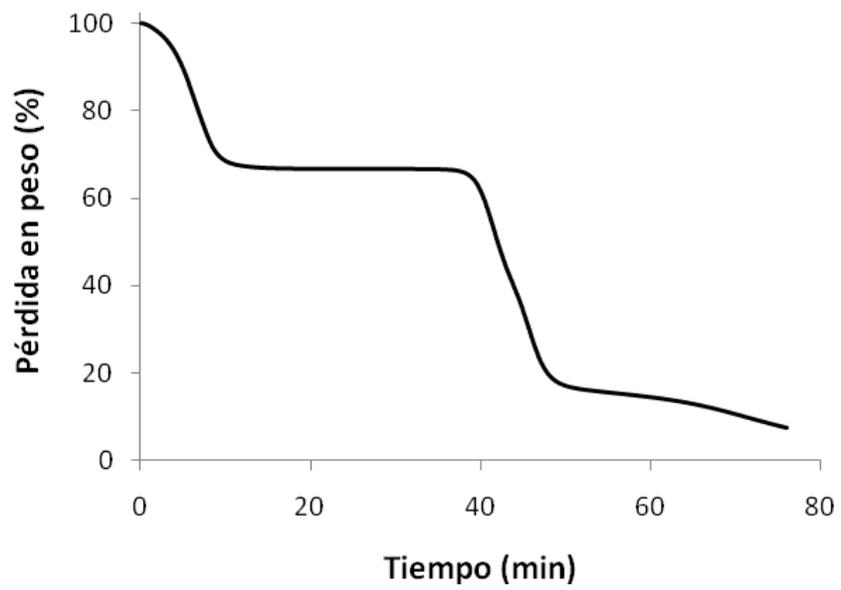
**M2**



### M3

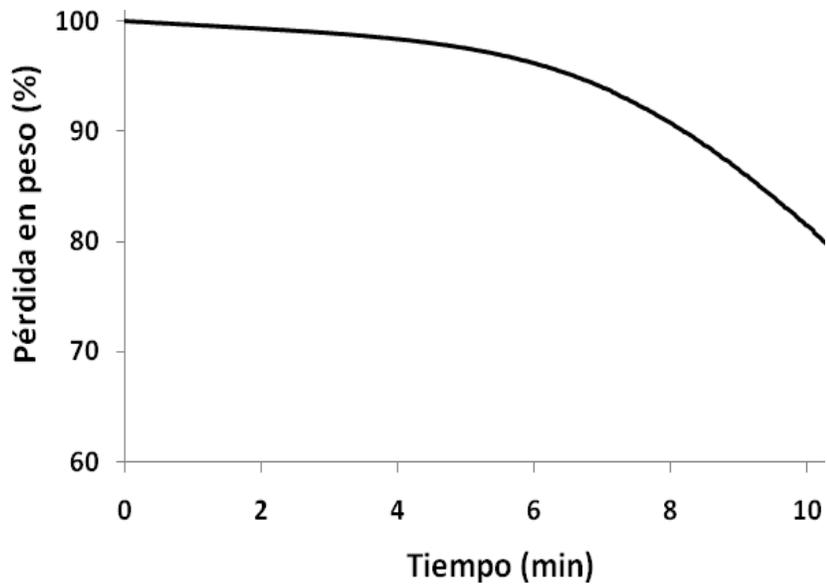


### M4

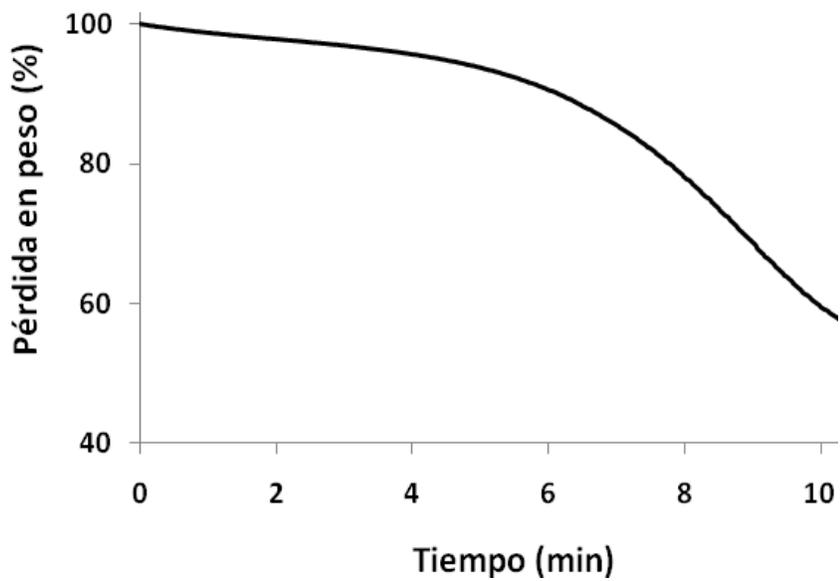


### Anexo III. Termograma de Polipropileno y Perlita.

#### Polipropileno



#### Perlita



**Anexo IV. Secuencias Genómicas de *Fusarium solani* y *Nectria haematococca*.**

**OB1-1 (*Nectria haematococca*).**

AGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT  
TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTTCGAGGTCAACATTCA  
GAAGTTGGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACG  
CAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGTGCCCGCAGGGGGC  
GCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACGGG  
CATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACTGAATTC  
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCG  
TTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTTACTCAGAAAAACATAATAGAAACAGAGTTAGG  
GGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTTTACGGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAAGCAACGTTTT  
AGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAAC  
GGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGNATTCGCGGCCCGCTGCAGGTGAC  
CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA  
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA  
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA  
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA  
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCT  
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGNGG  
GTAATNCGNTNNTCCNNGAATCNGGGGATAACGCNGNAAAGAAACATGTGG.

**OB2-2 (*Nectria haematococca*).**

GGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTT  
CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTTCGAGGTCAACATTGAG  
AAGTTGGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACGC  
AATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGTGCCCGCAGGGGGCG  
CCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGC  
ATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCT  
GCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGT  
TGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTTACTCAGAAAAACATAATAGAAACAGAGTTAGGG  
GGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTTTACGGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAAGCAACGTTTTA  
GGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAAC  
GGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTGAC  
CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA  
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA  
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC  
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA  
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGANAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTNNNTTCTCGCT  
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCNNNGGCTGCNCGNGCGGTATCAGCTNNCTCNAAGNNNGT  
AANNNGTNATCCNNGAANCNGG.

**OB3-1 (*Nectria haematococca*).**

NNNNNNNNNNNTNGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCC  
GCGGGAATTTCGATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTC  
GAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGG  
TGTTAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGT  
GCCCCGAGGGGGCGCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATG  
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGAT  
ATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAG  
CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTTACTCAGAAAAACATAATAGA  
AACAGAGTTAGGGGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTTTACGGGGCCGTCTGTTCCCGCC  
GAAGCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCG  
CTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG  
CTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAG  
TGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC  
TCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT  
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCT  
TCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGNTCGGTGCGNTCGGCNCGGCNAGCGGTATCAGC  
TCANNNNAAGNNGTAATNNNGTTNTCCNCNNAATCNNGGNTAACNNCNGGAAANAANATGT  
GNNNNAAGGCCNNNNAAGGNCNNGAANCNNTAAAANNCNNCNNNGCNNNGNNTTTNNNNN  
AGNNNCNCCCCCCCGNNGNAGNNNTNNNNAAAANTNNNNNGNNNNANNANCN

**OB4-2 (*Nectria haematococca*).**

NNNNNNNNNATNGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCG  
GGAATTTCGATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTCGAG  
GTCAACATTCAGAAGTTGGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGT  
TAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGTGCC  
CGCAGGGGGCGCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACG  
CTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATT  
CACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCC  
AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTTACTCAGAAAAACATAATAGAAAC  
AGAGTTAGGGGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTTTACGGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAA  
GCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTG  
GTTACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCGCTG  
CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT  
CACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA  
CAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA  
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC  
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCC  
GCTNCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA  
CTCAAAGNNGNANTACGGTTNTCCNCAGAATCNGGGNNACNCNGNAAANAANNNNGNNC  
AAAAAGGCN

**BK1-1 (*Fusarium solani*).**

NNNNNNNNNTCNNATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGC  
CGCGGAATTCGATTGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGG  
ATCATTACCGAGTCTAAACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGG  
AATAGACGGCCCCGTAACACGGGCCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAAT  
GTTTTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCGAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAA  
CCCTCAGGCCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCGCCCCCGTGGGCACACGCC  
GTCCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGACGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAA  
CTGGAGAGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGANNNNNCTAAAGTATTCACNNN  
NNCTNNNNNTGNCGANCNTATGGAAGANNTCCTANNGAGTCGGATGCACTCANNNGACTATGNN  
ATCATGNCANCTAAANNNTNNNCGNNNTCNTGACCGTACCTGTTNNCNGNGTGAAANTGNTA  
TACGATCCCNANNNCNCACCTACATANNGNCCGGAANGATAAAGTGTAAGCCTGNGGTGNCTN  
NNGAGNGAGCATCNCTGGTTATNGCNTTGCNTNAATGCCNNNTNCNNGNCGGGAANGTGN  
CNTGCCNACTGCANTNANGNATCNGANCATCTNNACGGNGAGAGNGNCTGCNGTATTGNGGN  
NTNNNCGCTNNTCGATCANNNNNCACTGCNCTGGNCNTNNGCTGCGGTGNGNGTNTCNGNTC  
NNTCNNGGGGTANNCGGTTNNCANNANATCNGGGGATACCCCGGAANNNCNTNTGAGCAAAGN  
CANNCAANGNNNNNNNCGTNNANNGCNCGGTNNNNNGNNNNNTTNCNTNGGNTNNNNCCNCN  
GGAANAGNGTNNNAANNNCCNNNNNNCANNNTNNNANGNGNNNNAN

**BK2-1 (*Fusarium solani*).**

NNNNNNNNNNNTAGGGCGATTGGGCCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCG  
CGGAATTCGATTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTCCG  
AGGTCAACATTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGT  
GTTAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGTG  
CCCACGGGGGGCGCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGA  
CGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATG  
ATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAG  
CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTACTCAGAAAAACATTATAGAA  
ACAGAGTTAGGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCGATTACGGGGCCGTCTATTCCCGCCGA  
AGCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTTAGACTCGGTAATGATCCCTCCGC  
TGTTTACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC  
TGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT  
GTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT  
CACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGNCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTG  
CCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTT  
CCGTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTGCGCTGNNGCANNNGGTATCAGNT  
CACTCAANGNNGGTANNNGGNTATCCNCANNATCNGGGATAANGCNGNANANNTNNNAGCA  
ANNNCCNGCANNNNCNGANCCGTAAAAGGCCNNNNNNNTGNGNTTTTNCNAAGNNCANN  
CCCCNNNNNNNANNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNGNACCNNCNGNCCNNNAAANN  
NGGGNNTCANNNNNAGANNNCNNNCNGNGCGNNNCNNNNNNNTNNNN

**BK3-2 (*Fusarium solani*).**

NNNNNNNNNCTATNGGGCGATTGGGCCCCGACGTTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCC  
GCGGGAATTCGATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCCTACCTGATTC  
GAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGG  
TGTTAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGT  
GCCCACGGGGGGCGCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATG  
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGAT  
GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGA  
GCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTACTCAGAAAAACATTATAGA  
AACAGAGTTAGGGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTGTTACGGGGCCGTCTATTCCC GCCG  
AAGCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTTTAGACTCGGTAATGATCCCTCCG  
CTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC  
CTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAG  
TGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC  
TCACAATTCACACAACATACGAGCCNGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGNCTAATGAG  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT  
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCT  
TCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTCGGCTGCGGCGANNNGTATCAGC  
TCACTCAANNNGGTAATACGGTTNTCCACNNANCNGGGNANNANGCNNNNGANATGNNNNCN  
AAAGGCCNNCAAAGGNNNGNAACCGTAAAAGGCNCNNNNNNGGCGTTTTCCNNNGGNCNNNC  
CCCCNGNN