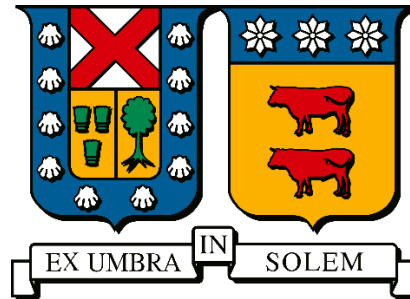


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL  
VALPARAISO-CHILE



*“Tratamiento y valorización de Tolueno desde una corriente gaseosa por Pseudomona putida”*

**Cecilia Victoria Lobos Ibacache**

Tesis para optar al grado de

**Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química**

Profesora Guía: Dra. Andrea Carvajal Guevara

Profesora Correferente: Dra. Raquel Lebrero Fernández

Profesor evaluador Externo: PHD. Ignacio Poblete

## **Agradecimientos**

En primera instancia, quisiera agradecer a la Universidad Técnica Federico Santa María y a la Universidad de Valladolid por las instalaciones y el apoyo para esta esta investigación.

También, quiero agradecer a la Dra. Andrea Carvajal y al grupo de investigación de revalorización de residuos del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental del campus San Joaquín por su apoyo durante todo el periodo de trabajo de esta investigación. Especial agradecimiento a María Victoria Riquelme por su apoyo con los equipos de análisis y a Natalia Toledo por su apoyo con el manejo de microorganismos.

Agradecimiento a la Dra. Raquel Lebrero por su apoyo durante el periodo que estuve trabajando en el Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid, España. También, agradecimiento a Rebeca Pérez por su apoyo en la realización de esta investigación. Especial agradecimiento a todo el equipo del laboratorio.

Agradecimiento al Dr. Ignacio Poblete y su equipo de investigación de la Universidad de Santiago por la contribución de conocimientos a esta investigación. También, agradecimientos al Programa de Becas de Postgrados entregada por la Universidad Técnica Federico Santa María por su apoyo financiero.

Un especial agradecimiento al Programa de Becas de Movilidad entre Instituciones asociadas a la AUIP 2022 (Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado) por darme la posibilidad de realizar parte de mi investigación en la Universidad de Valladolid.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi Familia.

## Resumen

La contaminación atmosférica es causada por la acción de materiales biológicos, partículas y diferentes sustancias químicas que alteran su composición. Por la contaminación atmosférica se han reportado efectos adversos agudos sobre la salud de las personas como la reducción de la función pulmonar y la muerte prematura. La Agencia de protección ambiental clasifica 188 compuestos químicos como contaminantes peligrosos para la atmosfera, entre ellos se encuentra el Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xileno y Estireno (BTEXS), los cuales son sustancias de origen orgánico que se caracterizan por ser volátiles a condiciones normales de presión y temperatura. Dentro de los procesos de remoción de BTEXS están los tratamientos biológicos que utilizan microorganismos para metabolizar los compuestos orgánicos. Este tratamiento puede combinar la remoción con la producción de compuestos de alto valor añadido, como lo son los polihidroxialcanoatos (PHAs), un poliéster biológico utilizado para la producción de bioplásticos que se acumula intracelularmente en forma de gránulos, y su función biológica es ser fuente de energía y carbono de reserva para los microorganismos. La valorización de estos contaminantes utilizando microorganismos ofrece ventajas sobre los otros procesos de remoción, como lo son los bajos costos operativos, menor huella de carbono y un menor requerimiento de energía, como también con una mirada a la economía circular.

El presente trabajo estudia la operación semicontinua en ciclos *Feast-Famine* de un reactor agitado de 2 L utilizando un cultivo de *Pseudomonas putida mt-2* y una alimentación continua de tolueno gaseoso, donde la carga orgánica fue de  $24 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Posteriormente, se realizaron los ciclos de operación con una duración de 5 días de la fase *Famine*, la remoción de tolueno se mantuvo sobre el 90% y la acumulación de PHAs promedio fue de 6,5%. Junto con la baja acumulación de PHAs se observa una alta concentración de TOC, lo que sugiere la presencia de un metabolito intermediario en la ruta de degradación de tolueno de una coloración amarilla en el medio.

El estudio concluye que la operación semicontinua en ciclos operativos con *Pseudomonas putida mt-2* puede ser un tratamiento de remoción para emisiones continuas de tolueno, sin embargo, se debe optimizar para la acumulación de PHAs. Por lo que para investigaciones futuras se recomienda buscar una optimización de ciclos *Feast-Famine* para la acumulación de PHAs e indagar en la producción de metabolitos intermedios para su posible valorización.

## Índice

Índice.....	5
Índice de figuras .....	7
1. Introducción.....	10
1.1. Contaminación Atmosférica: Daños a la salud e impacto ambiental .....	10
1.2. Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) .....	11
1.3. Tratamientos de remoción de COVs.....	12
1.4. Rutas metabólicas .....	14
1.5. Síntesis Polihidroxicarboxilatos (PHAs) .....	17
2. Hipótesis y Objetivos .....	20
2.1. General.....	20
2.2. Específicos .....	20
3. Materiales y métodos.....	21
3.1. Cribado de degradación .....	21
3.1.1. Medio de cultivo y operación .....	21
3.1.2. Condiciones experimentales.....	22
3.1.3. Análisis químicos.....	23
3.1.3.1. Cuantificación COVs.....	23
3.1.3.2. Caracterización de polihidroxicarboxilatos .....	23
3.2. Estudio de la duración del ciclo <i>feast-famine</i> .....	24
3.2.1. Medio de cultivo y operación .....	24
3.2.2. Crecimiento celular .....	25
3.2.3. Biorreactor set-up .....	25
3.2.4. Condiciones experimentales.....	25
3.2.5. Análisis Químicos .....	26
3.2.5.1. Cuantificación biomasa.....	26
3.2.5.2. Cuantificación COVs.....	26

3.2.5.3.	Cuantificación de Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono Inorgánico en el medio .....	26
3.2.5.4.	Cuantificación de polihidroxicarboxilatos .....	26
3.3.	Estudio de ciclos continuos de operación .....	28
3.3.1.	Medio de cultivo y operación .....	28
3.3.2.	Crecimiento celular .....	29
3.3.3.	Biorreactor set-up .....	29
3.3.4.	Condiciones experimentales .....	29
3.3.5.	Análisis Químicos .....	30
3.3.5.1.	Cuantificación biomasa .....	30
3.3.5.2.	Cuantificación COVs .....	30
3.3.5.3.	Cuantificación de Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico en el medio .....	30
3.3.5.4.	Cuantificación de Polihidroxicarboxilatos .....	30
4.	Resultados y discusión .....	31
4.1.	Cribado de degradación .....	31
4.2.	Estudio de la duración del ciclo <i>feast-famine</i> .....	35
4.2.1.	Remoción Tolueno.....	35
4.2.2.	Crecimiento biomasa .....	36
4.2.3.	Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico .....	38
4.2.4.	Acumulación PHA.....	39
4.3.	Estudio de ciclos continuos de operación .....	41
4.3.1.	Remoción Tolueno.....	41
4.3.2.	Crecimiento biomasa .....	43
4.3.3.	Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico .....	45
4.3.4.	Acumulación PHA.....	47
5.	Conclusiones y recomendaciones .....	53
6.	Referencias .....	54

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura química Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Estireno, p-Xileno, o-Xileno, m-Xileno. ....	11
Figura 2. Ruta metabólica de degradación de Tolueno a Catecol. ....	15
Figura 3. Ruta metabólica para degradación de Catecol por vía orto-segmentación (izquierda). Ruta metabólica para degradación de Catecol por vía meta-segmentación (Derecha).....	16
Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de Acetil-CoA. Se indican principales enzimas implicadas en el proceso. (modificada de (García et al., 2013)).....	18
Figura 5. Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en Pseudomonas a partir de una fuente de carbono. (modificada de (García et al., 2013)) .....	18
Figura 6. Diagrama del proceso discontinuo. ....	21
Figura 7. Esquema resumen Cribado de degradación. ....	21
Figura 8. Diagrama del proceso.....	24
Figura 9. Esquema resumen estudio de la duración del ciclo feast-famine. ....	24
Figura 10. Diagrama del proceso.....	28
Figura 11. Esquema resumen estudio de ciclos continuos de operación. ....	28
Figura 12. Resultados botellas con P. fulva. (a) Tolueno; (b) Etilbenceno; (c) Estireno; (d) Xileno; (e) Mezcla (Tolueno (e.1), Etilbenceno (e.2), Estireno (e.3)). Etapa con Nitrógeno (○). Etapa sin Nitrógeno (◇).....	32
Figura 13. Resultados botellas con P. putida mt-2. (f) Tolueno; (g) Etilbenceno; (h) Estireno; (i) Xileno; (j) Mezcla (Tolueno (j.1), Etilbenceno (j.2), Estireno (j.3)). Etapa con Nitrógeno (○). Etapa sin Nitrógeno (◇).....	33
Figura 14. Diagrama obtenido por GC-MS para P. fulva usando como fuente de carbono Tolueno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampoothiri, 2016). ....	34
Figura 15. Diagrama obtenido por GC-MS para P. putida mt-2 usando como fuente de carbono Tolueno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampoothiri, 2016). ....	34

Figura 16. Diagrama obtenido por GC-MS para <i>P. putida</i> mt-2 usando como fuente de carbono Etilbenceno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampoothiri, 2016). .....	35
Figura 17. Concentración de Tolueno a la salida del reactor ( $\square$ ) y porcentaje de remoción ( $\Delta$ ) en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine. ....	36
Figura 18. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	37
Figura 19. Concentración de Nitrógeno Total ( $\times$ ), Carbono Orgánico Total (*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine. ....	39
Figura 20. Porcentaje de acumulación de PHA ( $\bullet$ ) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (*) en el medio en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine. ....	41
Figura 21. Concentración de Tolueno a la salida del reactor ( $\square$ ) y porcentaje de remoción ( $\Delta$ ) en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	42
Figura 22. Concentración de Tolueno a la salida del reactor ( $\square$ ) y porcentaje de remoción ( $\Delta$ ) en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	43
Figura 23. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	44
Figura 24. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	45
Figura 25. Concentración de Nitrógeno Total ( $\times$ ), Carbono Orgánico Total (*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	46
Figura 26. Concentración de Nitrógeno Total ( $\times$ ), Carbono Orgánico Total (*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La	

línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	47
Figura 27. Porcentaje de acumulación de PHA (●) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (*) en el medio en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	49
Figura 28. Porcentaje de acumulación de PHA (●) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (*) en el medio en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.....	49
Figura 29. Sobrenadante del reactor del día 76 de operación.....	51
Figura 30. 2-HMS producido por <i>Pseudomonas stutzeri</i> N2. Sobrenadante obtenido después de centrifugar el medio de operación. Imagen izquierda (Bai, Nie, Diwu, & et al., 2021). Imagen derecha (Bai, Nie, Diwu, & et al., 2021).....	52

## 1. Introducción

### 1.1. Contaminación Atmosférica: Daños a la salud e impacto ambiental

La atmósfera es la capa gaseosa que rodea la tierra, la cual está compuesta principalmente por nitrógeno (78,08%), oxígeno (20,95%), argón (0,934%) y CO<sub>2</sub> (0,038%). Además de los compuestos mencionados, la atmósfera presenta trazas de otros gases a niveles inferiores del 0,002% como amoníaco, monóxido de carbono, helio, hidrógeno, metano, ozono, entre otros. Además, la atmósfera contiene entre un 1% a 3% en volumen de vapor de agua (Stanley E. Manahan, 2006).

La alteración de la composición de la atmósfera se denomina contaminación atmosférica y es causada por acción de otros compuestos, como materiales biológicos, partículas y diferentes sustancias químicas. Estos contaminantes pueden ser de origen primario - aquellos que son emitidos directamente al aire por la fuente de contaminación-, o de origen secundario - aquellos que se forman en la atmósfera por reacciones a partir de los contaminantes de origen primario-. Los contaminantes primarios incluyen el material particulado y los contaminantes gaseosos como óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), óxidos de carbono (CO<sub>x</sub>) y compuestos orgánicos volátiles (COVs). Por otro lado, los contaminantes secundarios incluyen el ozono gaseoso, el cual se genera a partir de óxidos de nitrógeno e hidrocarburos, y corresponde a uno de los principales componentes del smog fotoquímico, y aerosoles de partículas de sulfato y nitrato, que se generan a partir de óxido de azufre y de nitrógeno, respectivamente (Thurston, 2016).

Debido a la contaminación atmosférica, se han reportado efectos adversos agudos sobre la salud de las personas, incluyendo la reducción de la función pulmonar, inflamación del pulmón, problemas asmáticos, aumento en el ingreso hospitalarios por problemas respiratorios y cardíacos, como también la muerte prematura. Por otro lado, para los efectos adversos por exposición crónica se han reportado enfermedades respiratorias como bronquitis y asma, como también mortalidad prematura (Thurston, 2016).

En cuanto al impacto de la contaminación atmosférica sobre el ambiente, los mayores efectos corresponden al aumento de la acidez en la atmósfera, contribución al efecto invernadero y el smog fotoquímico, incremento de la corrosión de materiales y alteración de la capa de ozono (Stanley E. Manahan, 2006).

## 1.2. Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)

Entre los contaminantes más comunes de la atmósfera se encuentran los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), los cuales son sustancias de origen orgánico, es decir, que contienen carbono en su estructura. Se caracterizan por ser volátiles a condiciones normales de presión y temperatura. Se producen por la combustión de hidrocarburos, el procesamiento de pinturas, adhesivos, productos petrolíferos, productos farmacéuticos, refrigerantes, emisiones de fuentes móviles y solventes de limpieza (Thurston, 2016).

Gran parte de los COVs son generados por actividades antropogénicas consistentes en industrias manufactureras, industrias petroquímicas y emisiones de vehículos. Además, los COVs son foto químicamente sensibles, y cuando se exponen a óxidos de nitrógeno y a luz solar, forman ozono y otros productos. La formación de ozono a nivel del suelo y smog cancerígeno es de gran preocupación (Berenjian et al., 2012).

Muchos COVs están clasificados por la EPA (Siglas en inglés para la Agencia de Protección Ambiental) como tóxicos atmosféricos, que son aquellos que causan o pueden causar cáncer u otros efectos graves para la salud de las personas, como efectos reproductivos o defectos de nacimiento. La EPA considera 188 compuestos químicos clasificados como contaminantes peligrosos para la atmósfera, entre ellos se encuentra el grupo de COVs denominado BTEXS compuesto por Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xileno y Estireno, cuya estructura química se puede ver figura 1. Son hidrocarburos aromáticos volátiles que se encuentran comúnmente en el petróleo crudo y en los productos derivados del petróleo, siendo considerados uno de los principales contribuyentes a la contaminación ambiental (Raza et al., 2018).

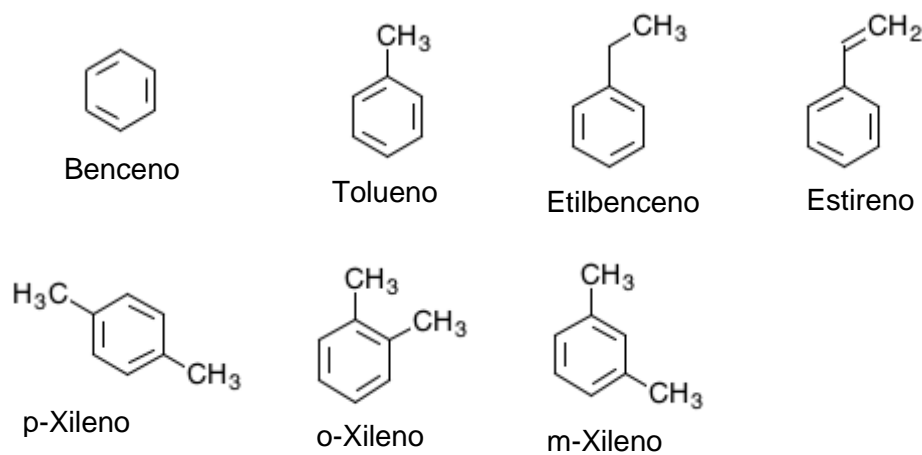


Figura 1. Estructura química Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Estireno, p-Xileno, o-Xileno, m-Xileno.

Específicamente para el Tolueno, la EPA menciona que una exposición corta a concentraciones sobre los 100 ppm puede provocar irritación de ojos y del sistema respiratorio superior, pero que con concentraciones elevadas puede haber efectos en el riñón. Por otro lado, la exposición prolongada puede provocar depresión de los niveles hormonales reproductivos, depresión de la respuesta inmunitaria y posibles cambios en la función del cerebro.

Actualmente en Chile solo existe una norma que regula los límites de exposición a Benceno, este es el Decreto 5 "*Norma primaria de calidad del aire para el compuesto orgánico volátil Benceno*" que establece un límite anual de concentración de  $3 \mu\text{g m}^{-3}$ . Se considerará sobrepasada la norma primaria de calidad de aire para benceno como concentración anual, cuando en cualquier estación monitora ocurra, que el promedio aritmético de un año calendario, fuere mayor o igual al valor de la norma que se establece. La norma indica que el Tolueno, Etilbenceno y Xileno producen consecuencias negativas en la salud a concentraciones altas, a diferencia del benceno que causa riesgo a la salud a concentraciones bajas. Es por esto, que la norma establece que el Tolueno, Etilbenceno y Xileno emitidos en la misma fuente que el Benceno, se regulan al establecer un límite de concentración de Benceno.

### 1.3. Tratamientos de remoción de COVs

Existen diversos procesos de tratamiento y remoción de los COVs tales como tratamientos fisicoquímicos de adsorción, oxidación térmica, oxidación catalítica y los tratamientos biológicos.

En el proceso de adsorción, las moléculas de COVs son removidas de la corriente gaseosa al transferirse a la superficie sólida del adsorbente. El adsorbente puede ser carbón activado el cual puede regenerarse o eliminarse después del tratamiento. La adsorción se caracteriza por permitir tratar grandes volúmenes de aire con una baja concentración de COV (Edwards & Nirmalakhandan, 1996).

El proceso de oxidación térmica consiste en una cámara con revestimiento refractario con un quemador de propano o gas natural y una chimenea. La temperatura de funcionamiento oscila entre  $760$  y  $870^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de residencia de gas máximo de 1 seg. Este tratamiento se caracteriza en estar adaptado para altas concentraciones de COV. Por otro lado, la oxidación catalítica consiste en la adición de un catalizador dentro del sistema, que modifica la energía de activación requerida para la oxidación, por lo que ésta ocurre a

temperaturas menores. Las temperaturas de operación se encuentran entre 320 y 540 °C. Los catalizadores pueden contener óxidos metálicos como óxidos de cromo y óxidos de níquel (Berenjian et al., 2012).

Los tratamientos biológicos se basan en el uso de microorganismos que utilizan los COVs como sustrato, metabolizándolos como fuentes de carbono y energía (o ambas), para su crecimiento y mantenimiento. Este tratamiento ofrece ventajas sobre los otros procesos de remoción, como bajos costos operativos, menor huella de carbono y un menor requerimiento de energía, puesto que los microorganismos pueden metabolizar los compuestos orgánicos a temperatura ambiente (Berenjian et al., 2012). Los métodos biológicos incluyen *bio-lavadores*, biofiltros, biofiltros percoladores, biorreactores de membrana y Reactores de crecimiento en suspensión.

El tratamiento por *bio-lavadores* está compuesto por dos unidades operativas: absorción y biorreactor. La absorción se lleva a cabo en una columna empacada donde ocurre la transferencia de materia del contaminante gaseoso a la fase líquida. Luego el biorreactor realiza el tratamiento de los contaminantes presentes en la fase líquida, por medio de la acción de los microorganismos suspendidos en un medio con nutrientes esenciales (Edwards & Nirmalakhandan, 1996).

Los Biofiltros consisten en reactores de lecho poroso donde los microorganismos están inmovilizados, la corriente gaseosa que contiene el contaminante pasa a través de este lecho, donde es degradado por los microorganismos (Edwards & Nirmalakhandan, 1996). Por otro lado, en los biofiltros percoladores la corriente de aire contaminado pasa a través de un lecho empacado de material inerte en el que se inmoviliza de forma natural un cultivo mixto de microorganismos (Huub HJ Cox & Marc A Deshusses, 1998). Mientras el aire contaminado es forzado a atravesar el lecho compacto, una fase acuosa se recicla sobre el lecho para proporcionar la humedad y nutrientes al cultivo inmovilizado. El lecho empacado proporciona la superficie necesaria para la fijación de la biopelícula y para el contacto gas-líquido (Huub HJ Cox & Marc A Deshusses, 1998).

Por otra parte, los biorreactores de membrana son equipos que utilizan una membrana que separa las fases líquida y gaseosa. Los nutrientes y la biomasa se encuentran en la fase líquida, mientras que los contaminantes se presurizan para inducir la difusión hacia la solución acuosa (Edwards & Nirmalakhandan, 1996).

Finalmente, se tienen los reactores de crecimiento en suspensión, el cual consiste en un reactor agitado que contiene el microorganismo en suspensión en un medio nutritivo. Al reactor se alimenta la corriente gaseosa, donde los organismos activos en suspensión degradan el contaminante de interés. Este tipo de tratamiento permite un mejor control de la biomasa y los nutrientes (Mukesh Doble & Anil Kumar, 2005).

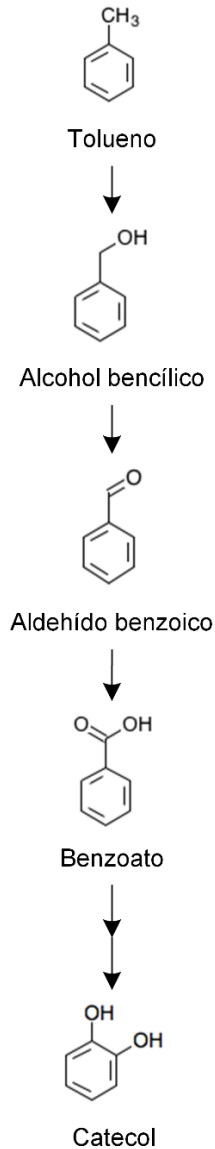
Los tratamientos biológicos antes mencionados están enfocados en la biotransformación del contaminante en dióxido de carbono y agua. Sin embargo, el método de remoción en reactores de crecimiento en suspensión se puede orientar a la obtención de productos con valor agregado (Kourmentza et al., 2017).

#### 1.4. Rutas metabólicas

Los microorganismos unicelulares y pluricelulares mediante el uso de un vasto repertorio de reacciones enzimáticas y procesos de transporte pueden procesar y convertir miles de compuestos orgánicos en biomoléculas necesarias para su existencia. Estos dirigen la distribución y el procesamiento de los metabolitos a través de extensas vías denominadas rutas metabólicas (Schilling et al., 1999).

Los microorganismos cuentan con enzimas específicas para la degradación de diferentes compuestos orgánicos, y que a través del proceso catabólico los transforman en moléculas orgánicas simples. Estas moléculas orgánicas simples pueden ser utilizadas por el propio microorganismo para posteriores procesos metabólicos o bien pueden ser liberadas al medio en el que se encuentran y ser descompuestas por otros microbios presentes (Abbasian et al., 2016).

En el caso particular de la ruta metabólica de degradación de tolueno en *Pseudomonas* (Nogales et al., 2017)(Abbasian et al., 2016), el Tolueno es convertido en Benzoato por las enzimas *Tolueno metil-monooxigenasa* (EC 1.14.15.26), *Alcohol bencílico deshidrogenasa* (EC 1.1.1.90) y *Benzaldehído deshidrogenasa* (EC 1.2.1.28). Luego, el Benzoato es convertido a Catecol por las enzimas *Benzoato 1,2-dioxigenasa* (EC 1.14.12.10) y *2-hidro-1,2-dihidroxibenzoato deshidrogenasa* (EC 1.3.1.25). Ver figura 2.



*Figura 2. Ruta metabólica de degradación de Tolueno a Catecol.*

Para continuar la ruta del tolueno, la segmentación del anillo de catecol previamente obtenido puede llevarse a cabo a través de dos vías metabólicas, la vía Orto-segmentación o la Meta-segmentación, ver figura 3. La enzima encargada de la segmentación del anillo en la vía Orto-segmentación es la *Catecol 1,2-dioxigenasa* (EC 1.13.11.1) y la encargada en la vía Meta-segmentación es la *Catecol 2,3-dioxigenasa* (EC 1.13.11.2).

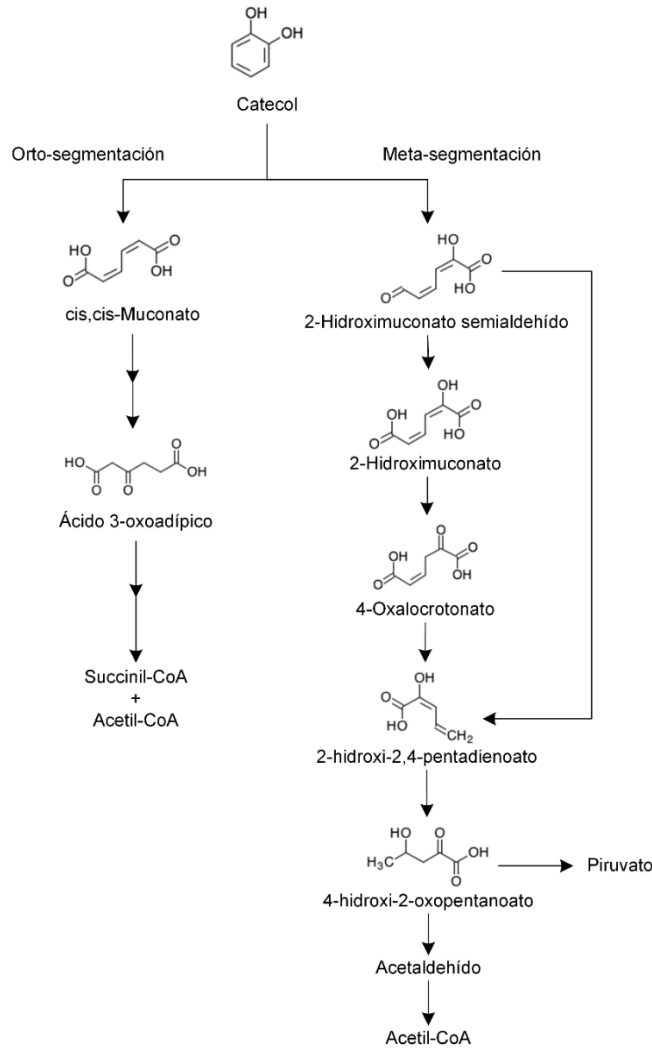


Figura 3. Ruta metabólica para degradación de Catecol por vía orto-segmentación (izquierda). Ruta metabólica para degradación de Catecol por vía meta-segmentación (Derecha).

Dado que los productos intermedios y finales son diferentes según la ruta de segmentación, el estado y composición del sistema de biodegradación puede variar. La utilización de una u otra vía depende de la especie microbiana y de la naturaleza del sustrato de crecimiento (Cao et al., 2008), como también en la concentración del sustrato (Loh & Chua, 2002)

En el caso de la *Pseudomona putida mt-2*, esta posee la vía de Meta-segmentación codificada en el plásmido (TOL pWWO) (Kunz & Chapman, 1981) (Parales et al., 2008) y la vía Orto-segmentación codificada por cromosomas (Assinder & Williams, 1990). De forma específica, se ha reportado que la degradación de Tolueno ocurre por la vía Meta-segmentación, debido a que se observaron altos niveles de *Catecol 2,3-dioxigenasa* (Kunz

& Chapman, 1981). Sin embargo, también se observaron actividad de la *Catecol 1,2-dioxigenasa*, pero en niveles bajos (Kunz & Chapman, 1981; Feist' And & Hegeman, 1969).

### 1.5. Síntesis Polihidroxicanoatos (PHAs)

En los procesos de degradación con empleo de bacterias se puede combinar la biorremediación con la producción de un material de alto valor añadido (Kourmentza et al., 2017). Algunos de los productos de valor añadido que se pueden generar son, por ejemplo, la producción de Hidrógeno con el uso de bacterias inmovilizadas usando como fuente de carbono un efluente de biodiesel industrial rico en glicerol crudo (Prakash et al., 2018), la producción de aminoácidos con el uso de bacterias usando como fuente de carbono metanol (Pfeifenschneider et al., 2017), y también la producción de PHAs con el uso de bacterias utilizando diversas fuentes de carbono como glucosa y COVs (Kourmentza et al., 2017).

En el caso de los Polihidroxicanoatos (PHAs), estos son un poliéster biológico o biopolímero utilizado para la producción de bioplástico. Se caracteriza por ser termoplástico, biocompatible, inerte, no toxico e insoluble en agua. Se genera en condiciones de fermentación, bajo ciertas condiciones de estrés. La forma de producción es limitando los nutrientes esenciales como el nitrógeno o el fósforo con exceso de fuente de carbono. Estos poliésteres se acumulan intracelularmente en forma de gránulos, y su función biológica es ser fuente de energía y carbono de reserva para los microorganismos (Kourmentza et al., 2017).

Los PHAs se clasifican en dos grupos según el número de átomos de carbono que componen su unidad numérica. Los PHAs de cadena corta (scl-PHAs) están constituidos por 3 a 5 átomos de carbono, mientras que los PHAs de cadena media (mcl-PHAs) cuentan con 6 a 14 átomos de carbono (Kourmentza et al., 2017).

La producción de PHAs también ocurre en rutas metabólicas descritas, como es el caso de la ruta de síntesis de scl-PHAs y mcl-PHAs a partir de Acetil-CoA (Figura 4 y figura 5). La que podría llevarse a cabo utilizando tolueno como sustrato y Acetil-CoA como metabolito intermedio, previamente obtenido de la ruta de Orto-segmentación y Meta-segmentación mencionada en el punto 1.4.

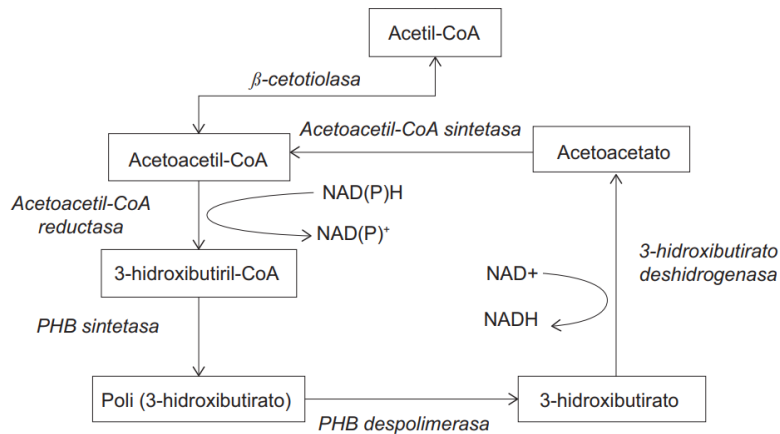


Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de Acetil-CoA. Se indican principales enzimas implicadas en el proceso. (modificada de (García et al., 2013))

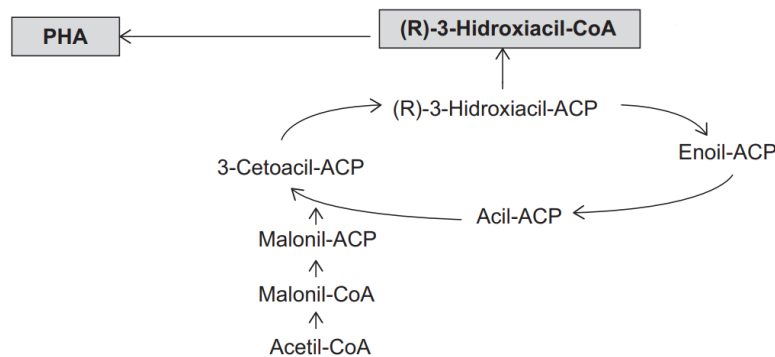


Figura 5. Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en *Pseudomonas* a partir de una fuente de carbono. (modificada de (García et al., 2013))

En cuanto a las aplicaciones de los PHAs, estas pueden ser en la industria de empaques, medicina, farmacia, agricultura y alimentos o como materias primas para la síntesis de químicos enantioméricamente puros y para la producción de pinturas. Por ejemplo, los biopolímeros de cadena corta se utilizan para la fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos. Por otro lado, los biopolímeros de cadena media se utilizan para la fabricación de adhesivos, como cubierta para quesos y fabricación de hule biodegradable, entre otros (García et al., 2013).

Se ha reportado en la literatura que el cultivo por lotes alimentados o el cultivo continuo son métodos eficaces para producir PHAs con altos niveles de productividad. Para esto se utiliza un sistema de dos etapas, en la primera etapa se obtiene una concentración de biomasa sin limitación de nutrientes denominada etapa *Feast* (festín) y en la segunda etapa

se promueve la acumulación de PHAs limitando uno de los nutrientes esenciales, denominada etapa *Famine* (hambruna) (Kourmentza et al., 2017). En ambas etapas la fuente de carbono está en exceso (García et al., 2013).

Por otro lado, se ha reportado producción de PHAs usando *P. Fulva* utilizando como fuente de carbono BTE en *fed-batch* (Ni et al., 2010), producción de PHAs mediante el uso de *P. putida mt-2* usando BTEX como fuente de carbono en un reactor agitado por 48 hrs (Nikodinovic et al., 2008) como también producción de PHAs con *P. putida mt-2* usando como fuente de carbono glicerol/octanoato en botellas agitadas por 60 hrs (Fontaine et al., 2017). Los estudios antes mencionados son llevados a cabo en *batch* o bien en un periodo determinado de operación, no consideran ciclos continuos de operación. Es por esto que, el presente estudio evalúa ciclos continuos de operación para la producción de PHAs utilizando como fuente de carbono Tolueno.

## 2. Hipótesis y Objetivos

### 2.1. General

El objetivo General de este trabajo es estudiar la degradación de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) y la acumulación de Polihidroxiclcanoatos (PHA) en un reactor biológico de forma simultánea.

### 2.2. Específicos

- I. Determinar la capacidad de degradación de las cepas *P. fulva* y *P. putida mt-2* de degradar compuestos TEXS en operación *Batch* y con distinta dosificación nutricional de nitrógeno.
- II. Determinar el efecto de la duración del ciclo *feast-famine* en la degradación de tolueno en un biorreactor semicontinuo con *P. putida mt-2*.
- III. Evaluar la operación semicontinua con ciclos continuos de operación para la degradación de Tolueno y acumulación de PHAs bajo limitación de nitrógeno utilizando *P. putida mt-2*.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Cribado de degradación

A continuación, se presentan el diagrama del proceso y esquema del experimento discontinuo.

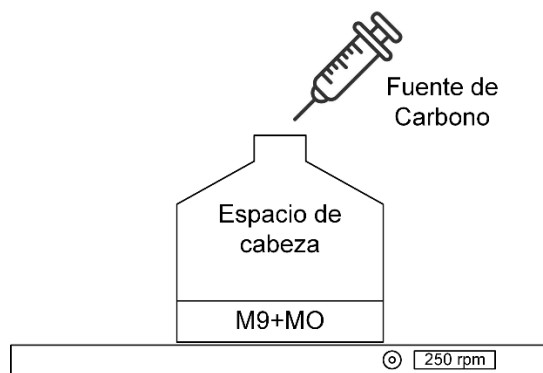


Figura 6. Diagrama del proceso discontinuo.

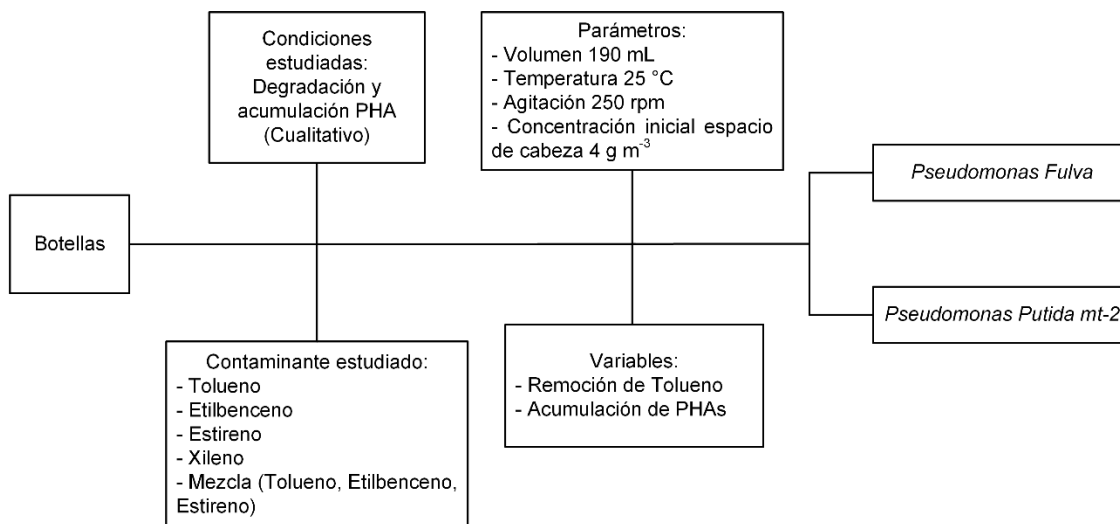


Figura 7. Esquema resumen Cribado de degradación.

##### 3.1.1. Medio de cultivo y operación

El medio que se utilizó para el cultivo y operación *Feast* del reactor es un medio de sales minerales, el cual estaba compuesto por (por L de M9): 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl; 7,52 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g NaCl; 1 mL de una solución 1 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,3 mL de una solución 1 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1 mL de Biotina 1 mg mL<sup>-1</sup>; 1 mL de Tiamina-HCl 1 mg mL<sup>-1</sup>; 10 mL de solución traza (5 g EDTA; 0,83 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 84 mg ZnCl<sub>2</sub>; 13 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 10 mg

CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 10 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,6 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O por litro de solución). M9 sin NH<sub>4</sub>Cl (M9-NF) fue utilizado en la fase de *Famine*.

### 3.1.2. Condiciones experimentales

Los experimentos *Batch* se llevaron a cabo en botellas serológicas de 1,2 L. Se estudiaron cuatro contaminantes individualmente (tolueno, etilbenceno, estireno y xileno) y en mezcla (tolueno, etilbenceno y estireno). Los experimentos se llevaron a cabo en duplicados para cada contaminante y la mezcla. Se considero una botella de control que contenía el medio MSM junto con el contaminante.

Antes de comenzar el experimento, la *Pseudomonas putida mt-2* (Facilitada por la Universidad de Santiago, Chile) y la *Pseudomonas Fulva* (facilitada por la Universidad de Valladolid, España) se cultivaron en diez botellas serológicas con 200 mL de medio M9.

En primera instancia, 190 mL de la biomasa que se cultivó en medio M9 se colocaron en cada botella. La concentración inicial de biomasa de la *P. putida mt-2* fue de 0,73 g L<sup>-1</sup> y la concentración de biomasa de la *P. Fulva* fue de 0,35 g L<sup>-1</sup> en cada botella. Se realizó una aclimatación en medio M9, que consistió en agregar el contaminante en estado líquido a cada botella con una concentración esperada en la fase gas de aproximadamente 4 g m<sup>-3</sup> en el espacio de cabeza. El contaminante se agregó cada vez que la cepa lo degradó y fue medido diariamente.

Luego, las botellas que degradaron el contaminante entre tres y cinco veces se pasaron al siguiente experimento de *Famine*. En este experimento, la biomasa de la botella se re suspendió en medio M9-NF y se agregó el contaminante en estado líquido a cada botella con una concentración de aproximadamente 4 g m<sup>-3</sup> en el espacio de cabeza. El experimento se detuvo cuando el microorganismo disminuyó la degradaron del contaminante.

Para el análisis, se tomaron 6 mL cada día en la fase de *Famine* para la caracterización de PHAs y la cuantificación de la biomasa. Una vez finalizado el experimento, se analizó el nitrógeno total (TN), el carbono orgánico total (TOC) y el carbono inorgánico (IC) de cada botella y se cuantificó la biomasa final.

### 3.1.3. Análisis químicos

#### 3.1.3.1. Cuantificación COVs

El espacio cabeza de las botellas fue medida cada día en un Cromatógrafo de gases Agilent 8869 en una columna HP-5 (30 m × 320 μm × 0,25 μm) con helio como gas de arrastre y con un Detector de Ionización de Llama (FID). La temperatura del inyector y la línea de transferencia fue de 275 °C y 250 °C, respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 80°C por 2,5 min, luego de 80 °C a 150 °C a una tasa de 100 °C por minuto. Se utilizó una jeringa de 250 μL para tomar la muestra gaseosa.

#### 3.1.3.2. Caracterización de polihidroxicanoatos

La caracterización de PHA se determinó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Se tomaron 2 mL de muestra y se suspendieron en 2 mL de una solución de cloroformo con ácido sulfúrico al 15% v/v y 2 mL de solución de metanol con 0,5 mg/mL de ácido metilbenzoico como patrón interno. Luego, se incubó durante 4 horas a 100°C en un termobloque Fisherbrand y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de agua desmineralizada, se tomó la fase orgánica en el fondo y se filtró (0,22 μm). El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) Agilent 7820A acoplado a un espectrómetro de masas (MS) Agilent 5977E con una columna DB-WAX (30 m × 250 μm × 0,25 μm). La relación Split fue de 1:10 y el helio se utilizó como gas portador a un caudal de 0,9 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector fue de 275 °C y la temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C. La temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 2 min, luego de 40 °C hasta 150 °C a una velocidad de 5 °C y finalmente hasta 240 °C a una velocidad de 10 °C. Para la obtención de iones positivos se utilizó ionización por impacto electrónico a 70 eV y se generaron espectros de masas de barrido de iones de m/z 50 a m/z 650. (Borrero-de Acuña et al., 2021).

### 3.2. Estudio de la duración del ciclo *feast-famine*

A continuación, se presentan los materiales y métodos utilizados para el estudio de la duración del ciclo *feast-famine*.

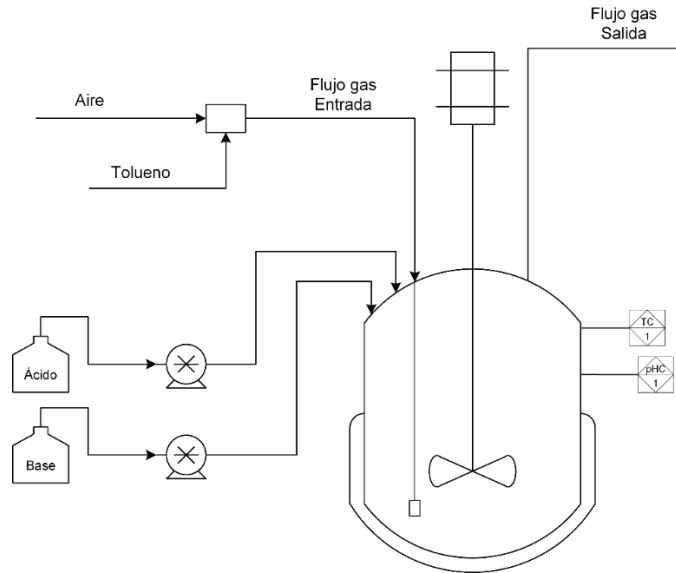


Figura 8. Diagrama del proceso.

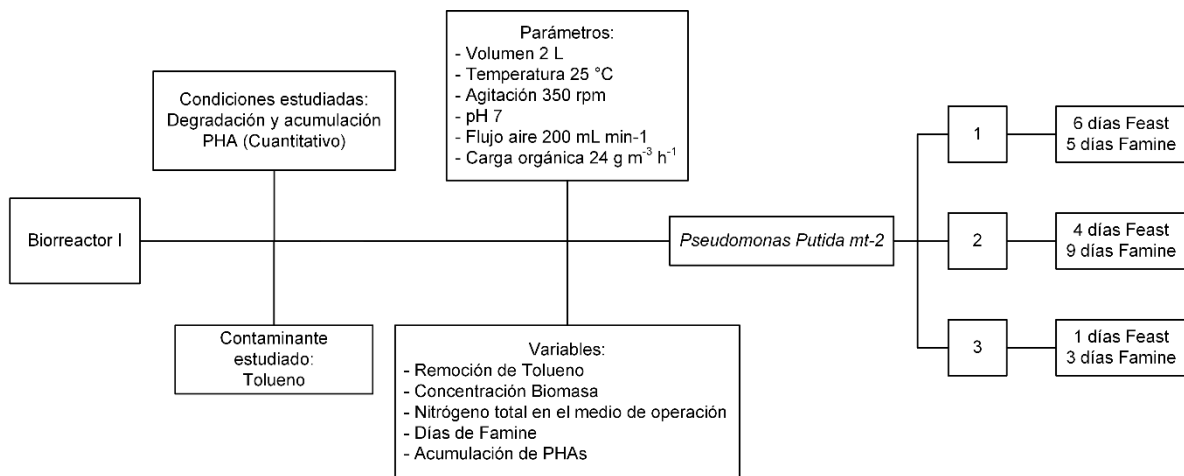


Figura 9. Esquema resumen estudio de la duración del ciclo *feast-famine*.

#### 3.2.1. Medio de cultivo y operación

El medio que se utilizó para el cultivo y operación *Feast* del reactor es un medio de sales minerales, el cual estaba compuesto por (por L de M9): 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl; 7,52 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g NaCl; 1 mL de una solución 1 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,3 mL de una solución 1 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1 mL de Biotina 1 mg mL<sup>-1</sup>; 1 mL de Tiamina-HCl 1 mg mL<sup>-1</sup>; 10 mL de

solución traza (5 g EDTA; 0,83 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 84 mg  $\text{ZnCl}_2$ ; 13 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1,6 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  por litro de solución). M9 sin  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (M9-NF) fue utilizado en la fase de *Famine*.

### 3.2.2. Crecimiento celular

El crecimiento del inóculo de *Pseudomonas putida mt-2* (Facilitada por la Universidad de Santiago, Chile) se realizó en una botella serológica de 1,2 L con 200 mL de M9, 0,4 mL de glucosa y 4,7  $\mu\text{L}$  de Tolueno. La botella estuvo a una agitación de 250 rpm y a 25°C durante una semana. Después, la botella se dividió en dos botellas en las mismas condiciones durante una semana. El medio de cultivo fue renovado una vez a la semana, esto con el fin de tener un inóculo fresco. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones estériles.

### 3.2.3. Biorreactor set-up

Las fases de *Feast* y *Famine* se llevaron a cabo en un biorreactor Biostat®A de vidrio borosilicato de sobremesa con un volumen de trabajo de 2 L. El reactor se agitaba continuamente a 350 rpm con una turbina Rusthon de seis palas y se utilizaba una manta calefactora para mantener la temperatura a 25 °C. El pH se midió en tiempo real con un sensor digital de pH y se mantuvo a 7,0 con una solución de NaOH de 4 M. El tolueno se inyectó con el objetivo de alcanzar una concentración en la corriente de entrada de 4 g  $\text{m}^{-3}$  con una bomba de jeringa, la cual dosificó compuesto a una velocidad de 0,05 mL  $\text{h}^{-1}$ , y con un tiempo de residencia del gas en el reactor de 10 min, siendo la carga orgánica igual a 24 g  $\text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ . La entrada de flujo de aire se alimentó a 200 mL  $\text{min}^{-1}$  y se ajustó con un rotámetro. La mezcla de aire y tolueno se difundió en el reactor con un difusor de gas de acero inoxidable de 2  $\mu\text{m}$  de poros.

### 3.2.4. Condiciones experimentales

En primera instancia, se añadió el inóculo *Pseudomonas putida mt-2* al biorreactor previamente esterilizado y se completó el volumen hasta 2 L con M9. El biorreactor comenzó con un  $\text{OD}_{650}$  de 0,021 (equivalente a 0,01 g  $\text{L}^{-1}$ ) y 165 mg  $\text{L}^{-1}$  de nitrógeno.

Se realizaron tres ciclos de operación, donde la etapa *Famine* tendría una duración de 2, 9 y 3 días. En el primer ciclo, el reactor comenzó con una biomasa inicial de aproximadamente 1,5 g  $\text{L}^{-1}$  y una concentración inicial de nitrógeno de 30 mg  $\text{L}^{-1}$ . Después de 2 día se renovaron 500 mL de M9 medio dos veces con el propósito de incrementar la concentración

de la biomasa. El siguiente ciclo operación comenzó con una biomasa inicial de aproximadamente  $1,92 \text{ g L}^{-1}$  y una concentración inicial de nitrógeno de  $29 \text{ mg L}^{-1}$ . Luego de 9 días se renovó 500 mL de medio M9 dos veces. El tercer ciclo comenzó con una biomasa inicial de aproximadamente  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  y una concentración inicial de nitrógeno de  $29 \text{ mg L}^{-1}$ . Después de 3 días en condición *Famine* se renovó 500 mL de medio M9.

Durante todo el tiempo de la operación, se renovó 100 mL de muestra del biorreactor cada día para realizar análisis de TOC/IC/TN, cuantificación de biomasa y cuantificación y caracterización de PHAs. La operación completa tuvo una duración de 49 días.

### 3.2.5. Análisis Químicos

#### 3.2.5.1. Cuantificación biomasa

La cantidad de biomasa se determinó por gravimetría, se tomaron 5-10 mL diarios de muestra del reactor y se filtraron ( $0,45 \mu\text{m}$ ) en un filtro previamente masado. El filtro se secó durante 24 horas a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  y se enfrió a temperatura ambiente en un desecador (American Public Health Association, 2017). Finalmente, se masó el filtro. Al inicio de la operación, el crecimiento celular se registró midiendo la densidad óptica (OD) a  $650 \text{ nm}$ .

#### 3.2.5.2. Cuantificación COVs

La corriente gaseosa de entrada y salida de tolueno fue medida cada día en un Cromatógrafo de gases Agilent 8869 en una columna HP-5 ( $30 \text{ m} \times 320 \mu\text{m} \times 0,25 \mu\text{m}$ ) con helio como gas de arrastre y con un Detector de Ionización de Llama (FID). Las condiciones operacionales del equipo son las mencionadas en el punto 3.1.3.1. Se utilizó una jeringa de  $250 \mu\text{L}$  para tomar la muestra gaseosa.

#### 3.2.5.3. Cuantificación de Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono Inorgánico en el medio

La concentración del nitrógeno total (TN), carbono orgánico total (TOC) y carbono inorgánico (IC) fue medida cada día en un Analizador de carbono total TOC-LCSH/CSN acoplado con una unidad TNM-1. Para el análisis se filtraron ( $0,45 \mu\text{m}$ ) 30 mL de muestra del reactor y se realizaron diluciones 1:2.

#### 3.2.5.4. Cuantificación de polihidroxicanoatos

El método de cuantificación de PHA fue por gravimetría. Se tomaron 6 mL de muestra del reactor y se lavaron dos veces con solución de NaCl (0,9%). El pellet se secó a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas en un vial previamente pesado. Luego, se pesó el vial para obtener la

masa de microorganismo. El pellet se molió y se resuspendió en 4 mL de cloroformo y se incubó durante 4 horas a 100°C en un termobloque Fisherbrand. La muestra incubada se filtró y secó durante 24 horas en un vial previamente pesado. El vial se pesó, y la diferencia de masa fue la cantidad de PHA determinada. (método modificado, (Lageveen et al., 1988))

### 3.3. Estudio de ciclos continuos de operación

A continuación, se presentan los materiales y métodos utilizados para el estudio de la duración de los ciclos continuos de operación.

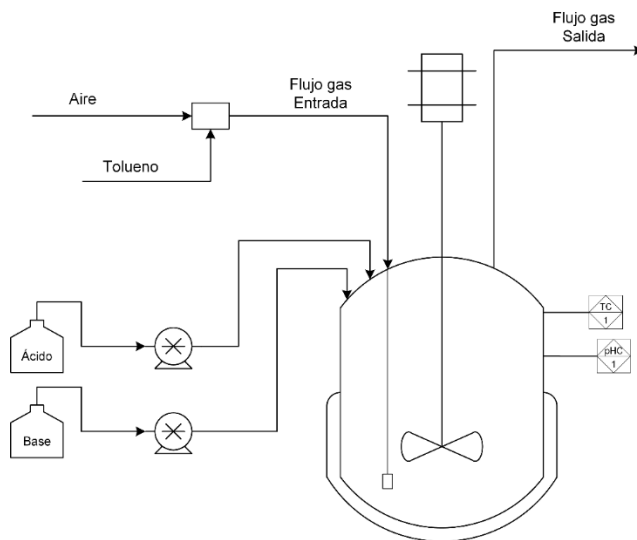


Figura 10. Diagrama del proceso.

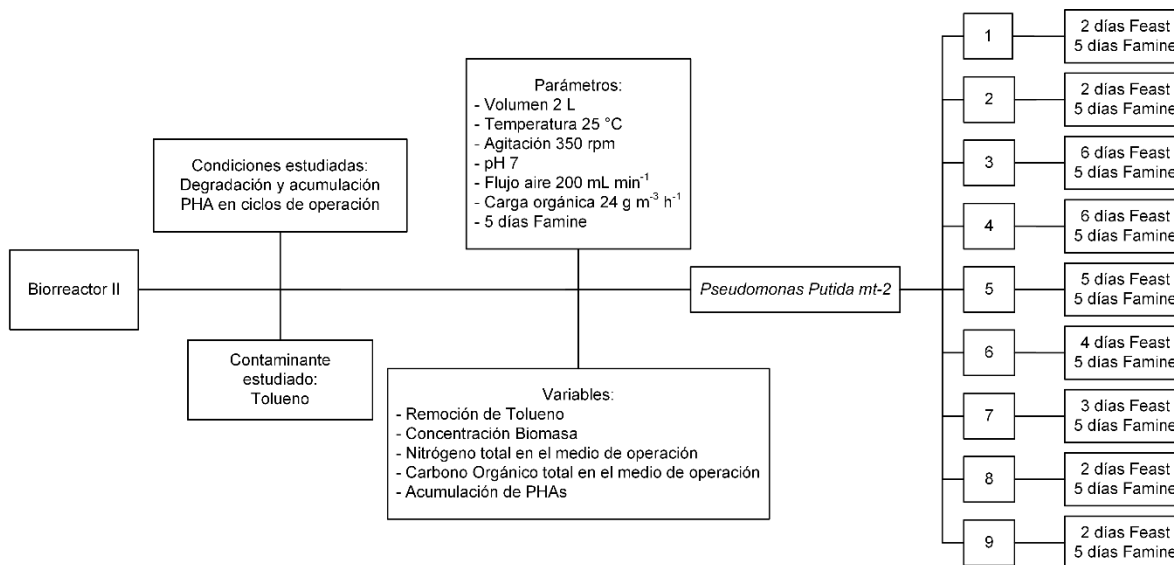


Figura 11. Esquema resumen estudio de ciclos continuos de operación.

#### 3.3.1. Medio de cultivo y operación

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento del microorganismo corresponde a un medio Caldo Soja Trypticaseína (TSB). Por otro lado, el medio que se utilizó en la operación *Feast* del reactor fue un medio de sales minerales, el cual estaba compuesto por (por L de MSM): 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 6,4 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{NaCl}$ ; 0,2 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,03 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,5 g NaHCO<sub>3</sub>; 1 mL de solución traza (0,58 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 3,96 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,48 g H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 5,56 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 4,68 g Cl<sub>2</sub>Co·6H<sub>2</sub>O; 0,34 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,04 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0,06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O por litro de 1 N de HCl). MSM sin NH<sub>4</sub>Cl (MSM-NF) fue utilizado en la fase de *Famine*.

### 3.3.2. Crecimiento celular

El crecimiento del inóculo de *Pseudomonas putida mt-2* (Facilitada por la Universidad de Santiago, Chile) se realizó en una botella ISO de 250 mL con 200 mL de TSB y 2 µL de Tolueno. La botella estuvo a una agitación de 170 rpm y a 25°C durante 4 días. El microorganismo se suspendió en medio MSM para inocular el reactor. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones estériles.

### 3.3.3. Biorreactor set-up

Las fases de *Feast* y *Famine* se llevaron a cabo en un biorreactor de vidrio borosilicato de sobremesa con un volumen de trabajo de 2 L. El reactor se agitaba continuamente a 350 rpm con una turbina de palas y se utilizaba un baño termoregulado para mantener la temperatura a 25 °C. El pH se midió en tiempo real con un sensor digital de pH y se mantuvo a 7,0 con una solución de NaOH de 1 M y una solución de HCl 1M. El tolueno fue adicionado al reactor en las mismas condiciones mencionadas en el punto 3.2.3, al igual que el flujo de aire y la difusión de la mezcla gaseosa.

### 3.3.4. Condiciones experimentales

En primera instancia, se añadió el inóculo *Pseudomonas putida mt-2* al biorreactor previamente esterilizado y se completó el volumen hasta 2 L con MSM. El biorreactor comenzó con una concentración de biomasa de 0,046 g L<sup>-1</sup> y 101 mg L<sup>-1</sup> de nitrógeno.

Para iniciar un ciclo de operación se estableció un valor de biomasa inicial de aproximadamente 0,6 g L<sup>-1</sup> y una concentración de nitrógeno inicial de 100 mg L<sup>-1</sup>. Para alcanzar estas concentraciones nitrógeno y biomasa se retiraron aproximadamente 1.500 mL de medio del reactor al finalizar cada ciclo de operación, y se adicionó 1.500 mL de medio MSM-NF más 10 mL de una solución concentrada de NH<sub>4</sub>Cl (100 g L<sup>-1</sup>) previamente elaborada.

Se estableció una duración de 5 días para la etapa de *Famine*, esto considerando el promedio de días de *Famine* realizados en los ciclos de la experimentación anterior 2, 9 y 3 a modo de punto de inicio. Como punto de inicio una concentración de nitrógeno de

aproximadamente 20 mg L<sup>-1</sup>. La duración de la etapa de *Feast* fue variable en el tiempo de operación.

Las muestras para análisis de PHAs fueron recolectadas al finalizar cada ciclo de operación y al día siguiente de iniciar la etapa *Famine*.

Como medida para reducir la concentración de carbono orgánico total en el medio, se realizó un lavado del reactor, en donde se centrifugaron 500 mL del reactor para recuperar la biomasa. La biomasa recuperada fue suspendida en 500 mL MSM-NF, para luego ser añadida al reactor junto con 1500 mL de MSM-NF y 10 mL de una solución de NH<sub>4</sub>Cl con una concentración de 100 g L<sup>-1</sup>. Este procedimiento se realizó el día 76 de operación.

### 3.3.5. Análisis Químicos

#### 3.3.5.1. Cuantificación biomasa

La cantidad de biomasa se determinó por gravimetría utilizando el mismo procedimiento mencionado en el punto 3.2.5.1 (American Public Health Association, 2017). El crecimiento celular se registró midiendo la densidad óptica (OD) a 600 nm.

#### 3.3.5.2. Cuantificación COVs

Las mediciones de concentración de tolueno se realizaron mediante Cromatografía de Gases (CG) en un equipo Agilent 7890B en una columna HP-5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm) con helio como gas de arrastre y con un Detector de Ionización de Llama (FID). La temperatura del inyector y la línea de transferencia fue de 275 °C y 250 °C, respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 80°C por 2,5 min, luego de 80 °C a 150 °C a una tasa de 100 °C por minuto. Se utilizó una jeringa de 250 µL para tomar la muestra gaseosa.

#### 3.3.5.3. Cuantificación de Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico en el medio

Las mediciones de concentración de nitrógeno total (TN), carbono orgánico total (TOC) y carbono inorgánico (IC) se realizaron con un equipo analizador multi N/C 3100 Analytik Jena. Para el análisis se filtraron (0,45 µm) 30 mL de muestra del reactor y se realizaron diluciones 1:2.

#### 3.3.5.4. Cuantificación de Polihidroxicanoatos

El método de cuantificación de PHA utilizado fue el descrito en el punto 3.2.5.4.

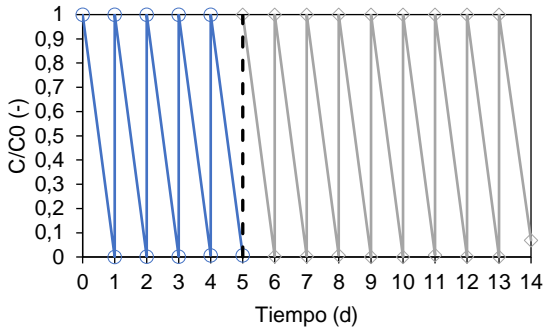
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Cribado de degradación

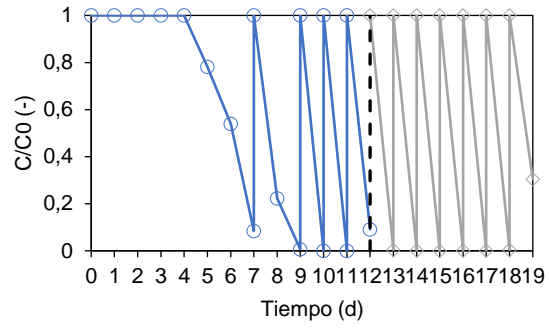
En la figura 12 se presentan las concentraciones normalizadas de los contaminantes estudiados en función del tiempo en las botellas que contenían el microorganismo *P. Fulva*. Se pudo observar que la cepa estudiada degradó los contaminantes de Tolueno, Etilbenceno, Estireno y la mezcla de estos mismos, tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno en el medio. Sin embargo, no degradó el contaminante Xileno. Además, se pudo observar que, para los contaminantes de Etilbenceno, Estireno y la mezcla, la cepa tuvo un periodo de aclimatación debido a que el inóculo fue cultivado en presencia de Tolueno.

Para la cepa *P. putida mt-2*, en la figura 13 se presentan las concentraciones normalizadas de los contaminantes estudiados en función del tiempo. Se pudo observar que la cepa estudiada degradó los contaminantes de Tolueno y Etilbenceno, tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno en el medio. Sin embargo, en el caso de los contaminantes Estireno, Xileno y la mezcla estudiada, se observó que en el estireno dejó de degradar al agregar el contaminante en el día 5, el Xileno la cepa dejó de degradar al agregar el contaminante en el día 7 que correspondió a la tercera inyección de Xileno. Para la mezcla se observó que la cepa dejó de degradar al agregar el contaminante en el día 8 que correspondió a la cuarta inyección de mezcla. Al igual que la cepa anterior, se observó un periodo de aclimatación para el contaminante Etilbenceno.

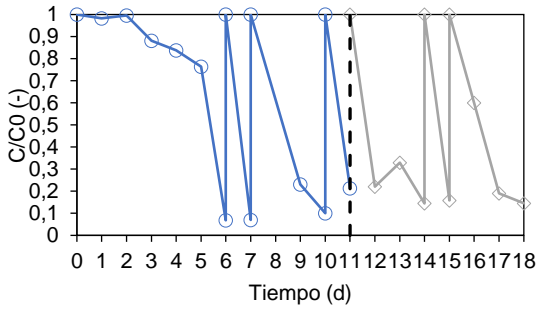
Los resultados de degradación observados para la *P. Fulva* son similares a los obtenidos por *J. Acevedo* cuando la misma cepa degradó sobre un 80% los compuestos de Tolueno, Etilbenceno y Estireno en botellas agitadas (*J. Acevedo et al., 2023*). También, se observó la remoción de Tolueno y Etilbenceno por *Y. Ni* usando *P. Fulva* en un proceso *fed-batch* (*Ni et al., 2010*). Por otro lado, los resultados de degradación de *P. putida mt-2* son similares a los obtenidos por *J. Nikodinovic* cuando la misma cepa degradó Tolueno en un reactor agitado (*Nikodinovic et al., 2008*). Los distintos comportamientos de las cepas observados se deben a que la tasa de alimentación del contaminante pudo dar a una disminución significativa en el crecimiento celular debido a su toxicidad (*Ni et al., 2010; Nikodinovic et al., 2008*) y a una afinidad por el nivel de expresión de la vía de degradación del contaminante (*Duetz et al., 1994*).



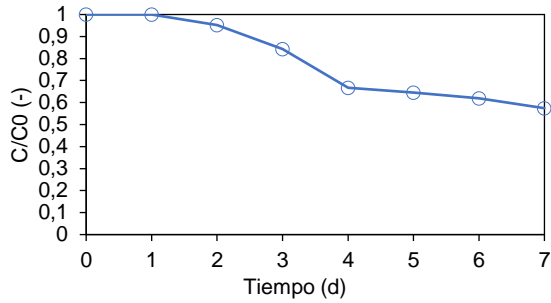
(a)



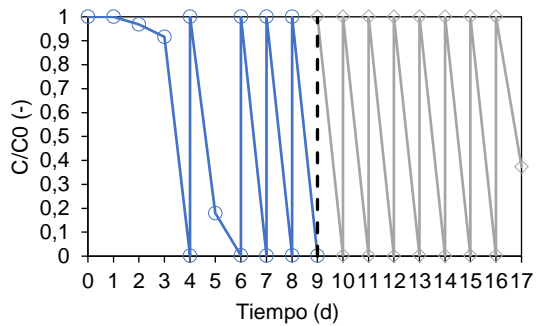
(b)



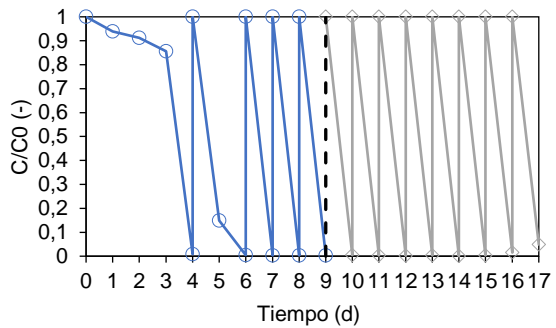
(c)



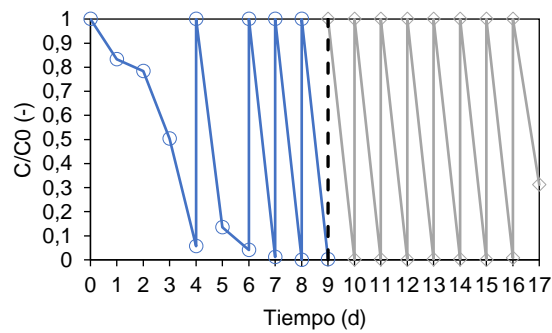
(d)



(e.1)

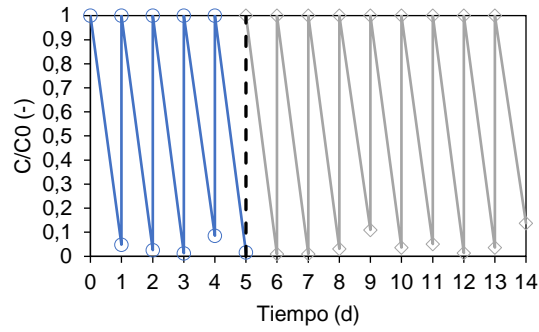


(e.2)

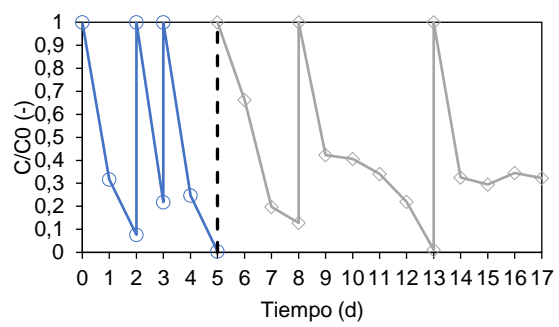


(e.3)

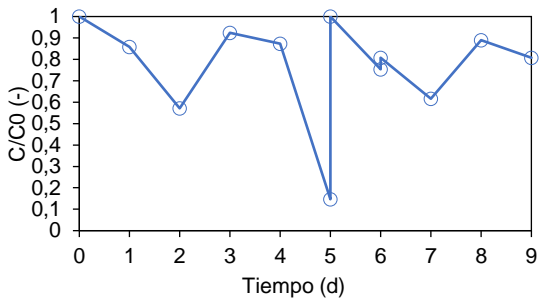
Figura 12. Resultados botellas con *P. fulva*. (a) Tolueno; (b) Etilbenceno; (c) Estireno; (d) Xileno; (e) Mezcla (Tolueno (e.1), Etilbenceno (e.2), Estireno (e.3)). Etapa con Nitrógeno ( $\circ$ ). Etapa sin Nitrógeno ( $\diamond$ ).



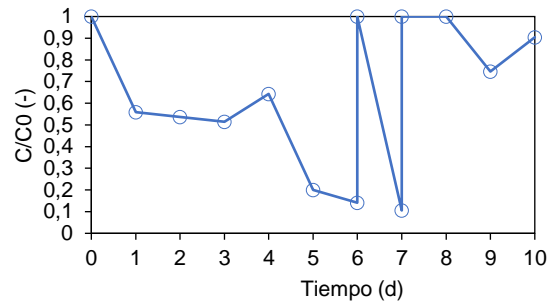
(f)



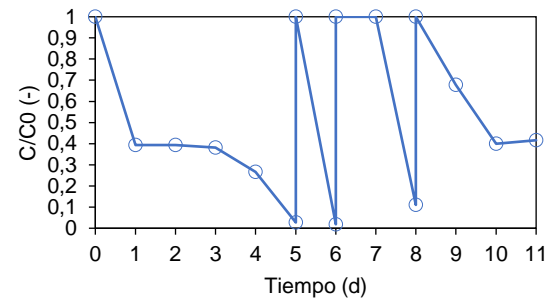
(g)



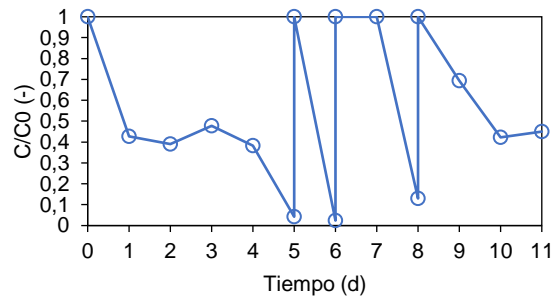
(h)



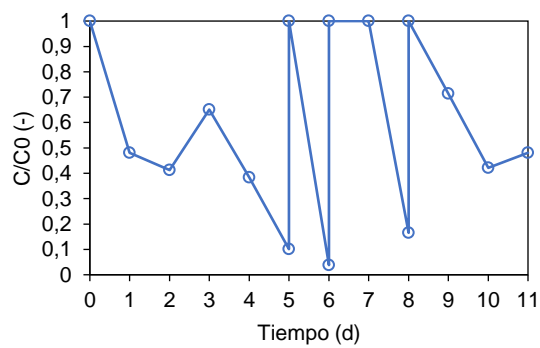
(i)



(j.1)



(j.2)



(j.3)

Figura 13. Resultados botellas con *P. putida* mt-2. (f) Tolueno; (g) Etilbenceno; (h) Estireno; (i) Xileno; (j) Mezcla (Tolueno (j.1), Etilbenceno (j.2), Estireno (j.3)). Etapa con Nitrógeno (○). Etapa sin Nitrógeno (◇).

Con las dos cepas analizadas, se pudo observar que la *P. Fulva* tiene la capacidad de degradar una mayor parte de los contaminantes estudiados a diferencia de la *P. putida mt-2*. Sin embargo, al analizar las muestras extraídas de las botellas en el GC-MS se pudo observar que en el caso de la *P. fulva* solo la botella que contenía Tolueno presentaba PHA, ver figura 14. Por otro lado, al analizar las muestras de *P. putida mt-2* se pudo observar presencia de PHA tanto para el contaminante de Tolueno y de Etilbenceno, ver figura 15 y 16.

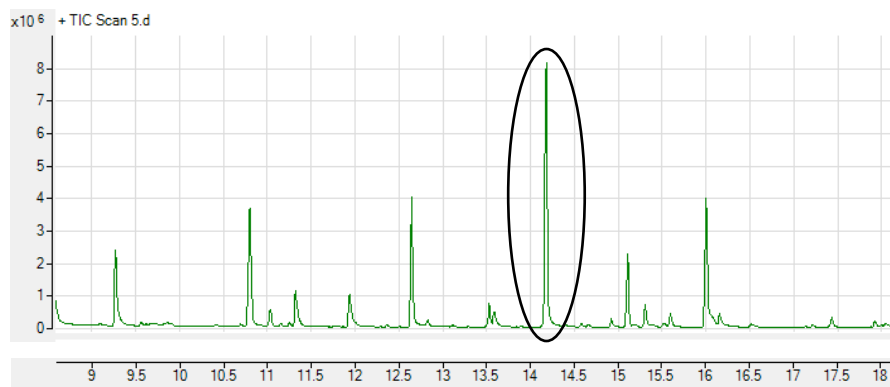


Figura 14. Diagrama obtenido por GC-MS para *P. fulva* usando como fuente de carbono Tolueno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampoothiri, 2016).

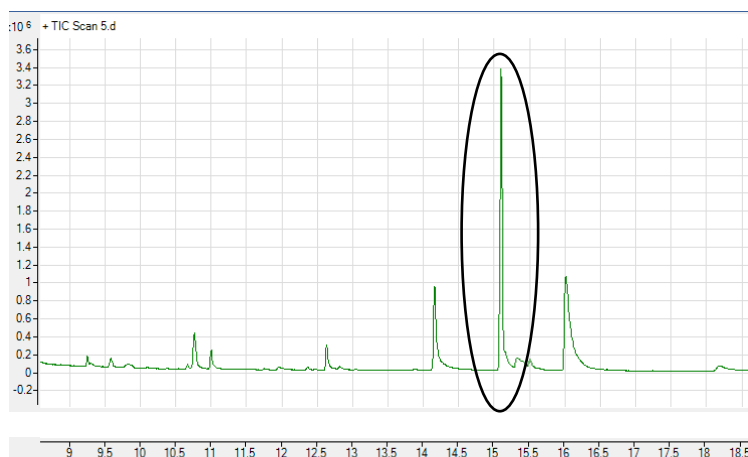


Figura 15. Diagrama obtenido por GC-MS para *P. putida mt-2* usando como fuente de carbono Tolueno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampoothiri, 2016).

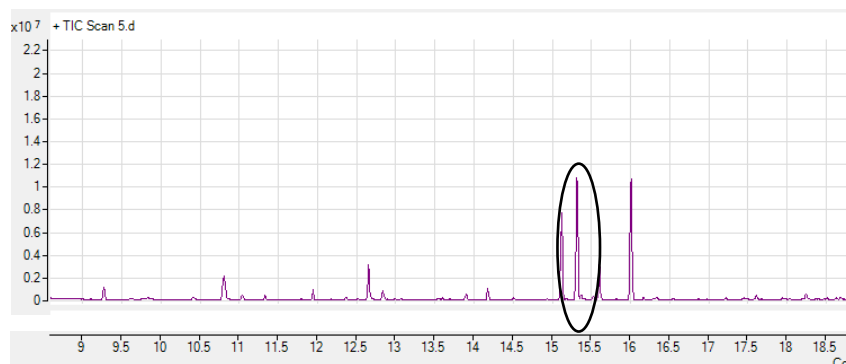


Figura 16. Diagrama obtenido por GC-MS para *P. putida mt-2* usando como fuente de carbono Etilbenceno. Se señala la presencia de Acido 3-hidroxipentanoico (Moorkoth & Nampootheri, 2016).

Dada la posibilidad de utilizar la cepa *P. putida mt-2* con una mezcla de Tolueno y Etilbenceno en una operación semicontinua los siguientes experimentos se realizaron usando dicha cepa y como primer análisis se utilizó como fuente de carbono solo Tolueno con el fin de estudiar el comportamiento individual del contaminante en una operación semicontinua.

#### 4.2. Estudio de la duración del ciclo *feast-famine*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la primera operación semicontinua utilizando como única fuente de carbono Tolueno y el microorganismo *P. putida mt-2*.

##### 4.2.1. Remoción Tolueno

Al estudiar la remoción de Tolueno en un biorreactor de operación semicontinua (ver figura 17) se observó que en la etapa de aclimatación llevada a cabo los primeros 12 días, el microorganismo alcanzó una remoción del 99% del tolueno el día 9. Para el primer ciclo de operación, en la etapa de *Feast* (entre los días 13 a 23), se pudo observar que la remoción del contaminante se mantuvo en un 100%, para luego disminuir a un 63% en el día 25, correspondiendo con la etapa de *Famine*. En el segundo ciclo, se pudo observar nuevamente una remoción del 100% del tolueno cuando el nitrógeno estuvo disponible nuevamente (en la etapa de *Feast* entre los días 29 a 34), y una disminución de la remoción a un valor de 85% en el día 43 de la etapa de *Famine* (días 35 a 43). Finalmente, en el último ciclo, nuevamente se recuperó la remoción del tolueno al 100%, tanto durante el día de *Feast* (45 a 46 día) como en la etapa de *Famine* (47 a 49 día). Durante los días de mantención del reactor, días 24 a 29 y días 43 a 45, también se observó una remoción del

100% del contaminante. Cabe destacar que la disminución de la remoción se observó en los días en que la operación se encontraba en el último día de la etapa de la etapa *Famine*.

El fenómeno observado en los primeros dos ciclos (reducción de la degradación en la etapa *famine*), se ha observado previamente por *P. holubar*, *C. Andorfer* y *R. Braun* cuando estudiaron la degradación de Tolueno y n-heptano usando como microorganismo lodo activado y observaron una disminución de la degradación cuando se limitaba el nitrógeno (Holubar et al., 1998). Esto se debe a que al no tener disponible nitrógeno en cantidad suficiente el metabolismo debe realizar cambios y por lo tanto se retrasa el transporte de la fuente de carbono al interior del microorganismo (Chen & Strevett, 2002). Al reducir la duración del ciclo *feast-famine* en el último ensayo se observa que la remoción de tolueno se mantiene constante en comparación con las otras dos operaciones, esto debido a que en una fase de *Famine* más corta los microorganismos consumirán su fuente de carbono para crecer ya que la limitación de los factores internos de crecimiento es baja (Oliveira et al., 2017). Cabe destacar, que se pudo identificar en el segundo ciclo de operación iniciado el día 29 que la capacidad de degradación disminuyó al día 9 de la etapa *Famine*.

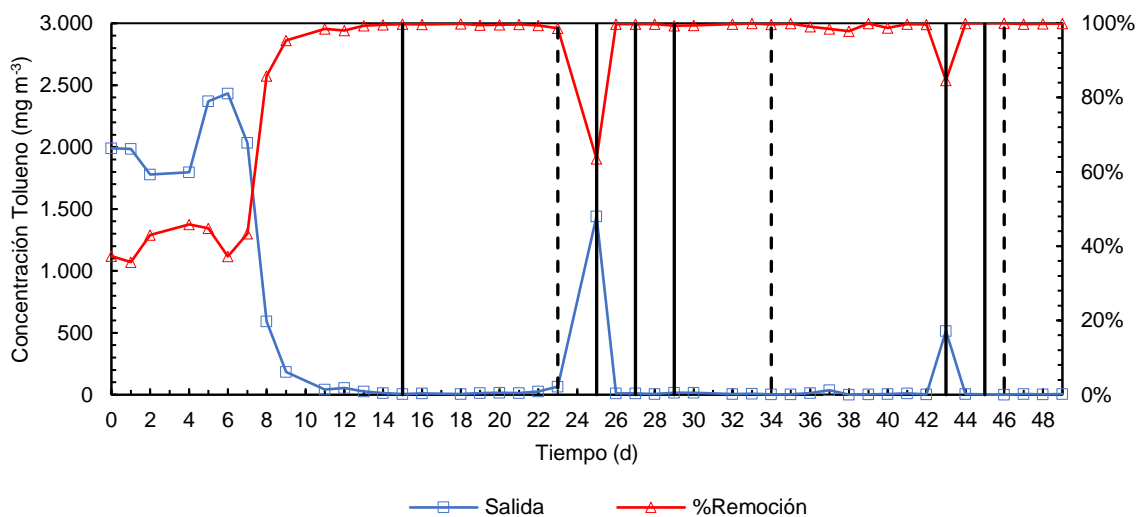


Figura 17. Concentración de Tolueno a la salida del reactor (□) y porcentaje de remoción (Δ) en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

#### 4.2.2. Crecimiento biomasa

En la figura 18 se presentan las concentraciones de biomasa en el reactor durante el periodo de operación de 49 días. Durante el periodo de aclimatación del día 0 al día 15, se

pudo observar que el microorganismo tuvo un periodo de latencia de 8 días, en donde la concentración de biomasa se mantuvo por debajo de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , esto se debe a un bajo consumo de la fuente de carbono. Luego, desde el día 9 al día 15 de operación se observó un aumento de la concentración de la biomasa a un valor de  $0,66 \text{ g L}^{-1}$ . Luego de añadir nitrógeno el día 15, se pudo observar un aumento en la concentración de biomasa a un valor de  $1,9 \text{ g L}^{-1}$ , dicho valor se mantuvo durante el primer periodo de *Famine* y las dos posteriores etapas de mantención, días 25 y 27, en donde se añadió nitrógeno. Luego de añadir nitrógeno el día 29, la etapa de *Famine* se inició en el día 34 con una concentración de biomasa de  $1,92 \text{ g L}^{-1}$ , dicha concentración disminuyó a un valor de  $1,8 \text{ g L}^{-1}$  al finalizar el periodo de *Famine*, esto se pudo deber a que la biomasa se adhirió y aglomero en las paredes del reactor durante la operación formando un *biofilm* que dificultó el análisis de la concentración de biomasa. La formación de *biofilm* se ha observado antes por M. Espinosa, A. Salido y J. Ramos en la adhesión de *P. putida* a semillas maíz (Espinosa-Urgel et al., 2000), y es también mencionado por A. Lopez, A. Morales y L. Jiménez como una característica de este microorganismo de formar *biofilm* en diversas superficies (López-Sánchez et al., 2016). El último periodo de *Famine* se inició con una concentración de biomasa de  $2,46 \text{ g L}^{-1}$  en el día 46 y finalizó con una concentración de  $2,96 \text{ g L}^{-1}$  el día 49.

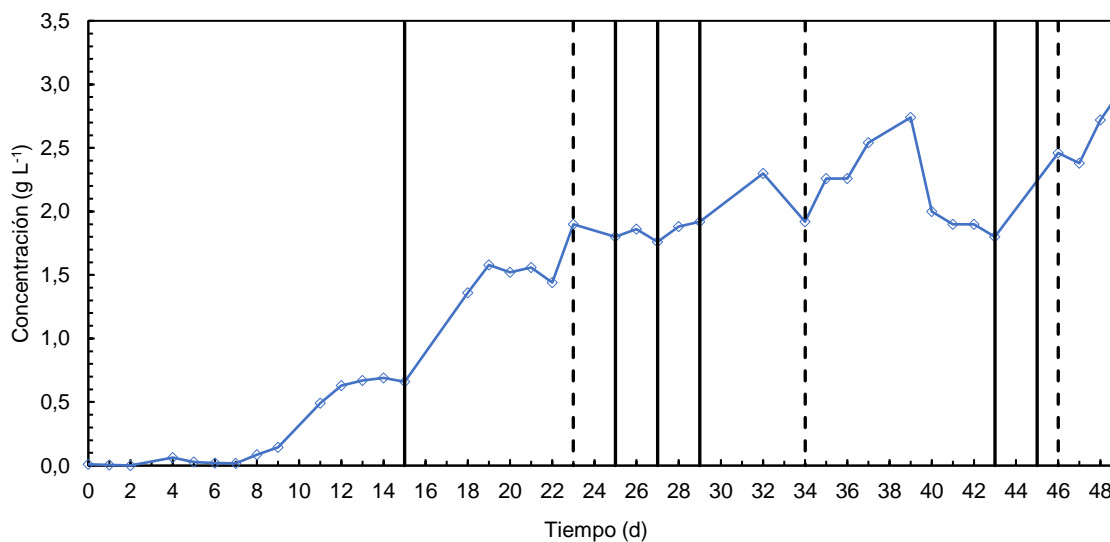


Figura 18. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

#### 4.2.3. Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico

En la figura 19 se presentan las concentraciones de nitrógeno total, carbono orgánico total y carbono inorgánico en el reactor durante el periodo de operación de 49 días.

Durante el periodo de aclimatación del día 0 al día 15, se pudo observar un consumo del nitrógeno disponible en el medio, disminuyendo su valor de  $165 \text{ mg L}^{-1}$  a  $15,32 \text{ mg L}^{-1}$ . Este consumo de nitrógeno está asociado al crecimiento de la biomasa, ver figura 18. En cuanto al carbono orgánico total, se pudo observar un aumento en su concentración desde un valor de  $31 \text{ mg L}^{-1}$  a  $238 \text{ mg L}^{-1}$ , este aumento se puede deber a la presencia de metabolitos asociados a la ruta metabólica de degradación de Tolueno. No se observó variación en la concentración del carbono inorgánico.

Luego intercambiar 500 mL de medio del reactor por medio M9 el día 15, se pudo observar una concentración de nitrógeno en el medio de  $125 \text{ mg L}^{-1}$ , cuyo valor disminuyó a  $30 \text{ mg L}^{-1}$  el día 23 iniciando la etapa de *Famine*. En cuanto al carbono orgánico total, el día 15 se observó un valor de  $202 \text{ mg L}^{-1}$ , el cual aumentó a  $366 \text{ mg L}^{-1}$  al finalizar la etapa de *Famine*. No se observó variación en la concentración del carbono inorgánico.

En las dos posteriores etapas de mantención, días 25 y 27, en donde se intercambiaron 500 mL de medio del reactor por M9, se observó un consumo del nitrógeno y una disminución en la concentración del carbono orgánico en el medio. No se observó variación en la concentración del carbono inorgánico.

Luego de intercambiar 500 mL de medio del reactor por M9 el día 29, se pudo observar una disminución de la concentración de nitrógeno en el medio de un valor de  $119 \text{ mg L}^{-1}$  a  $29 \text{ mg L}^{-1}$  iniciando la etapa de *Famine* el día 34. En cuanto al carbono orgánico total, el día 29 se observó una concentración de  $155 \text{ mg L}^{-1}$ , valor que aumentó levemente a  $172 \text{ mg L}^{-1}$  al finalizar la etapa de *Famine* el día 43. No se observó variación en la concentración del carbono inorgánico.

El último periodo de operación se inició el día 45 con una concentración de nitrógeno de  $77 \text{ mg L}^{-1}$  que disminuyó a un valor de  $29 \text{ mg L}^{-1}$  el día 46 el cual correspondió al inicio de la etapa de *Famine*. En cuanto a la concentración de carbono orgánico total en el medio, este disminuyó su valor desde  $116 \text{ mg L}^{-1}$  a  $107 \text{ mg L}^{-1}$ . No se observó variación en la concentración del carbono inorgánico.

El comportamiento de la concentración de TN que se observó durante la operación de cada ciclo concuerda con lo observado en los ciclos *feast-famine* descritos por C. Oliveira, C. Silva, G. Carvalho y M. Reis en su estudio de estrategias para seleccionar eficientemente productores de PHA (Oliveira et al., 2017). Por otro lado, el comportamiento de la concentración de TOC durante los ciclos de operación se puede deber a la presencia de metabolitos intermedios en la ruta de degradación del tolueno, como se mencionó en el punto 1.4, la degradación del contaminante puede ocurrir por dos rutas metabólicas dependiendo de cuál sea inducida por el sustrato (Cao et al., 2008).

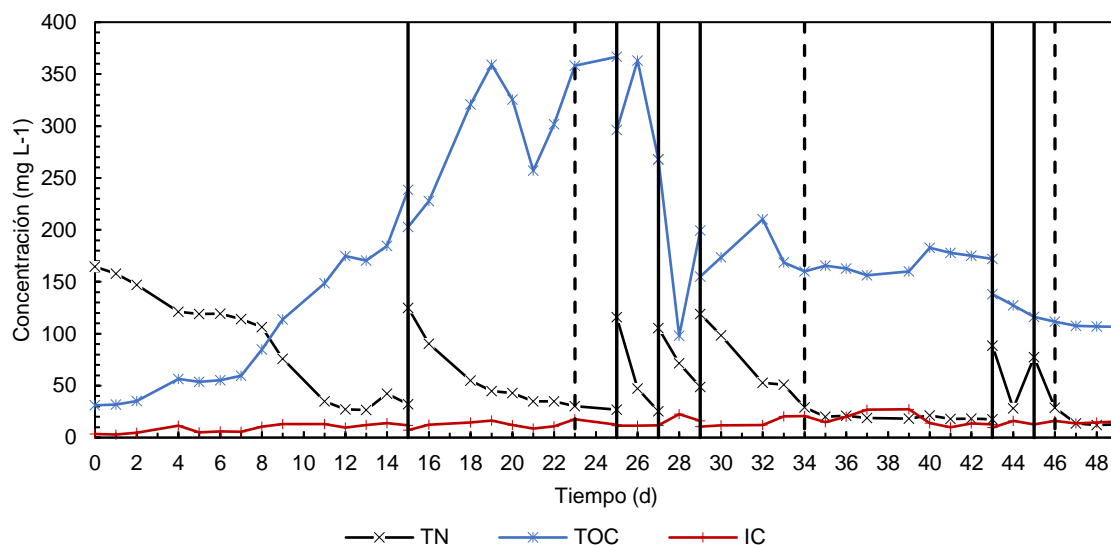


Figura 19. Concentración de Nitrógeno Total (x), Carbono Orgánico Total (\*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

#### 4.2.4. Acumulación PHA

En la figura 20 se presenta la acumulación de PHAs durante la operación de 49 días. Durante el periodo de aclimatación (entre 0 y 15 días), se analizó solo una muestra colectada el día 13, donde se obtuvo una acumulación de 0% en peso de PHA. En el primer ciclo de operación con un periodo de *Famine* de 2 días se obtuvo una acumulación de 3,4% y 2,1% en peso de PHA los días 24 y 25, respectivamente. En el segundo ciclo de operación, con la etapa de *Famine* iniciada el día 34, se obtuvo una acumulación promedio de 12,7%. Por último, en el tercer ciclo, con la etapa de *Famine* iniciada el día 46 se pudo observar una acumulación promedio de un 3,1%. La acumulación de PHA que se obtuvo durante el segundo ciclo de operación corresponde a aproximadamente la mitad de la

reportada por *J. Nikodinovic* y *S. Kenny* (21,9% de acumulación de PHA) en su estudio de degradación de Tolueno utilizando *P. putida mt-2* en una operación continua de 48 horas (Nikodinovic et al., 2008). La diferencia de la acumulación de PHAs se pudo deber a los distintos métodos de cuantificación utilizados junto con las pérdidas en el proceso de filtrado y secado, como también se pudo deber a la diferencia en las cargas orgánicas. En el estudio realizado por *J. Nikodinovic* y *S. Kenny* utilizan una carga orgánica de  $130,05 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y  $260,1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a diferencia de esta investigación en que utiliza una carga orgánica significativamente menor de  $24 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ .

En la figura 20 también se presenta la concentración de carbono orgánico total (TOC) en el reactor durante el periodo de operación de 49 días, donde se pudo observar una menor acumulación de PHA cuando la concentración de TOC fue alta, cuyo valor promedio fue de  $362 \text{ mg L}^{-1}$ . En cambio, se observó una mayor acumulación de PHA durante el periodo en que la concentración de TOC disminuyó a un valor promedio de  $168 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento en el último periodo de *Famine*, donde la concentración de TOC en promedio fue de  $108 \text{ mg L}^{-1}$  y la acumulación fue similar a la obtenida con el valor de alta concentración de TOC. Este comportamiento se pudo deber a que la biomasa en este último periodo de *Famine* fue en aumento (ver figura 18) al adicionar nitrógeno al medio (ver figura 19), por lo que el microorganismo pudo haber destinado la fuente de carbono y el nitrógeno para su crecimiento y no para la acumulación de PHAs. Este comportamiento se asimila al observado por *B. Anaf* usando *E. Coli* donde se observó que la concentración de biomasa fue incrementando durante la etapa *Famine* (Bren et al., 2013).

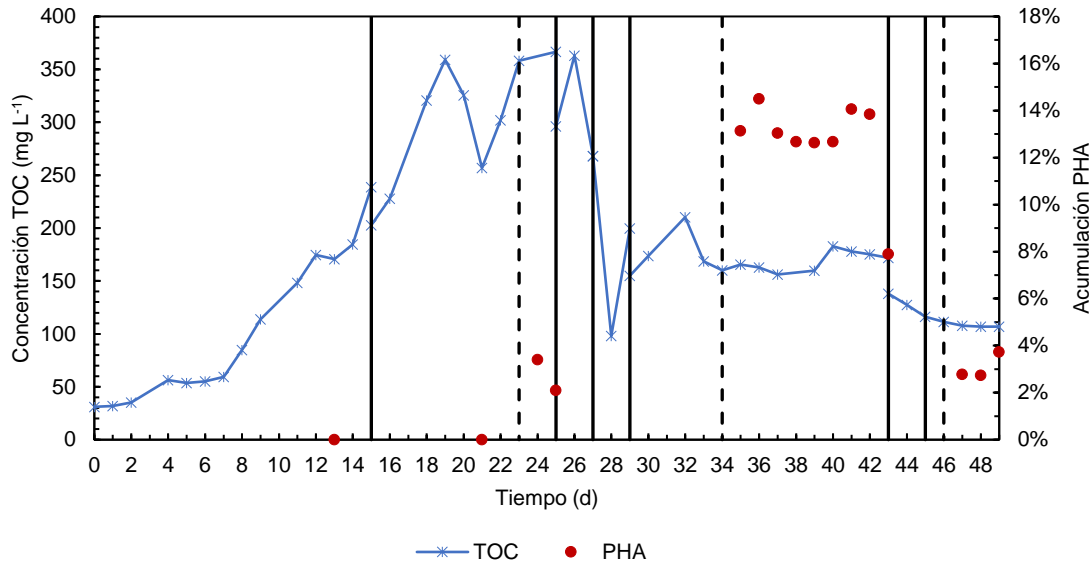


Figura 20. Porcentaje de acumulación de PHA (●) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (\*) en el medio en función del tiempo. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

### 4.3. Estudio de ciclos continuos de operación

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la segunda operación semicontinua utilizando como única fuente de carbono Tolueno, el microorganismo *P. putida mt-2* y una duración de la etapa *Famine* de 5 días, correspondiente al promedio de las etapas *Famine* realizadas en el estudio del punto anterior

#### 4.3.1. Remoción Tolueno

En las figuras 21 y 22 se presentan las concentraciones del contaminante a la salida del reactor y el porcentaje de remoción de este con respecto a la concentración de entrada durante el periodo de operación de 98 días.

En la figura 21 se presentan los datos de remoción de Tolueno entre los días 0 a 35 de operación. El periodo de aclimatación abarcó los días 0 a 7, donde se observó una remoción de 100% al día 3 y una remoción del 40% al día 7. Esta disminución de la remoción se observó al finalizar la etapa *Famine*, por lo que se pudo provocar un retraso en el transporte de la fuente de carbono al interior del organismo debido a la baja disponibilidad de nitrógeno en el metabolismo (Chen & Strevett, 2002). Por otro lado, en los dos primeros ciclos de operación la etapa *Feast* tuvo una duración de 2 días y la etapa *Famine* tuvo una duración

de 5 días, en los cuales se observó una remoción sobre el 99% y el 82% respectivamente. Finalmente, desde el día 21 al día 35 la remoción de tolueno se mantuvo sobre 90%.

En la figura 22, se presentan los datos de remoción de Tolueno entre los días 35 a 98 de operación. Se observó que la remoción se mantuvo sobre el 94% en los ciclos realizados tanto en la etapa de *Feast* como *Famine*, exceptuando en los días 79 y 80 en donde se observó una disminución de la remoción a un 41% y 40%, respectivamente en la etapa *Famine*. El comportamiento observado concuerda con la capacidad de remoción de Tolueno de la *P. putida mt-2* evidenciado por *J. Nikodinovic* en su investigación en un reactor agitado (Nikodinovic et al., 2008).

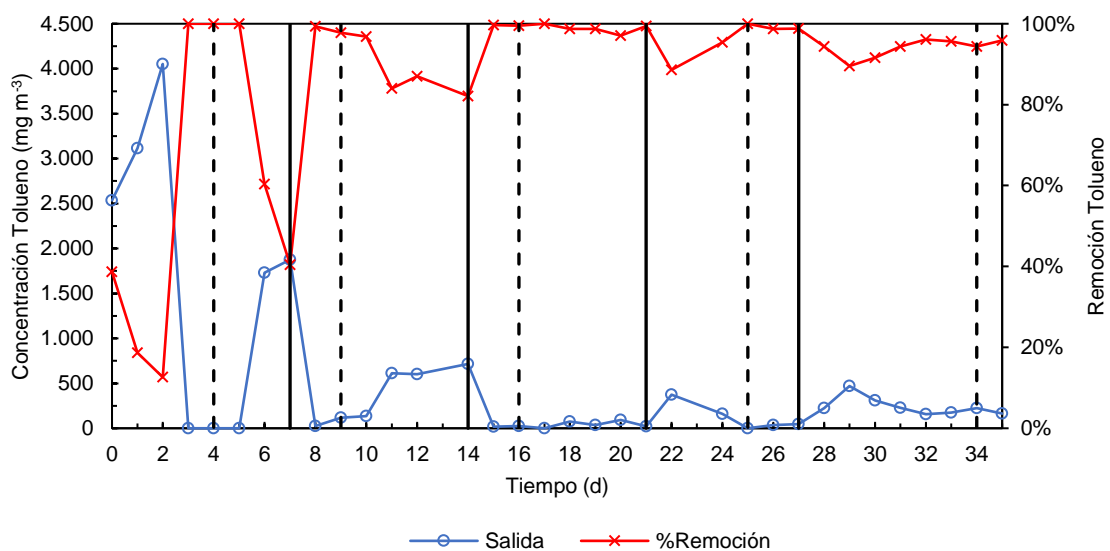


Figura 21. Concentración de Tolueno a la salida del reactor ( $\square$ ) y porcentaje de remoción ( $\Delta$ ) en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

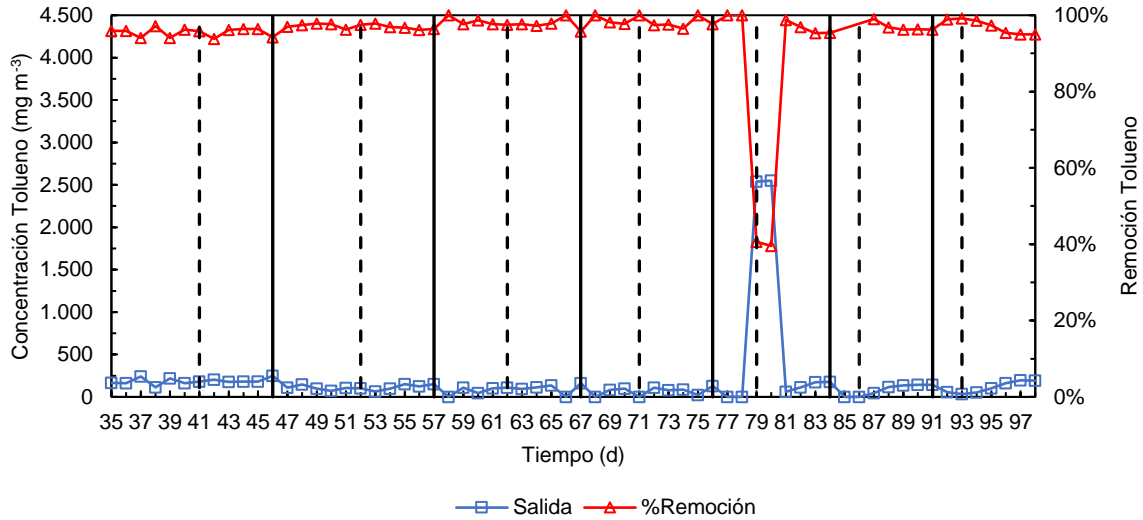


Figura 22. Concentración de Tolueno a la salida del reactor (□) y porcentaje de remoción (Δ) en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

#### 4.3.2. Crecimiento biomasa

En la figura 23 y 24 se presentan las concentraciones de biomasa en el reactor durante el periodo de operación de 98 días.

En la figura 23 se pudo observar durante el periodo de aclimatación del día 0 al día 7, se pudo observar que el microorganismo tuvo un periodo latencia de 2 días, en donde la concentración de biomasa se mantuvo por debajo de 0,1 g L<sup>-1</sup>, para luego alcanzar una concentración de biomasa de 0,948 g L<sup>-1</sup> el día 7. El primer ciclo de operación inició el día 7 con una concentración de biomasa de 0,594 g L<sup>-1</sup> y finalizó el día 14 con una concentración de 0,910 g L<sup>-1</sup>. En cuanto al segundo ciclo, este inició el día 14 con una concentración de biomasa de 0,489 g L<sup>-1</sup> y finalizó el día 21 con una concentración de 0,651 g L<sup>-1</sup>, la disminución de la concentración de biomasa con respecto al ciclo anterior se pudo deber a que la biomasa se adhirió a las paredes del reactor. Los días 21 y 27 se tuvo una concentración de biomasa inicial de 0,310 g L<sup>-1</sup> y 0,489 g L<sup>-1</sup> respectivamente. Los días 27 y 35 se tuvo una concentración final de 1,10 g L<sup>-1</sup>.

En la figura 24, se pudo observar que la concentración inicial de biomasa de los ciclos iniciados los días 35, 46, 57, 67, 76, 84 y 91 fueron de 0,760 g L<sup>-1</sup>, 0,690 g L<sup>-1</sup>, 0,770 g L<sup>-1</sup>, 0,640 g L<sup>-1</sup>, 0,580 g L<sup>-1</sup>, 0,560 g L<sup>-1</sup>, 0,480 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. El promedio de la concentración inicial de biomasa fue de 0,640 g L<sup>-1</sup> y su desviación estándar fue de 0,108

g L<sup>-1</sup>. Por otro lado, las concentraciones finales de biomasa al término del ciclo en los días 46, 57, 67, 76, 84, 91 y 98 fueron de 1,60 g L<sup>-1</sup>, 1,94 g L<sup>-1</sup>, 1,72 g L<sup>-1</sup>, 1,66 g L<sup>-1</sup>, 2,12 g L<sup>-1</sup>, 2,52 g L<sup>-1</sup>, 2,46 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Cabe mencionar que al terminar cada ciclo de operación se intercambiaron 1500 mL de medio fresco con nitrógeno para diluir el reactor e iniciar con una concentración aproximada de 0,600 g L<sup>-1</sup>, la tasa de dilución fue de 0,75 por ciclo terminado.

También, se observó que la concentración de biomasa fue incrementando durante la etapa *Famine* de los ciclos, este comportamiento se asimila al observado por *B. Anan* usando *E. Coli*, donde se concluyó que una parada abrupta crecimiento por la limitación de nitrógeno va acompañada de un pulso de regulación positiva de la expresión de genes en las áreas relevantes de las vías de asimilación de nutrientes, este mecanismo permite que las células mantengan su tasa de crecimiento durante aproximadamente una generación en la que pueden utilizar bajos niveles de nutrientes (Bren et al., 2013).

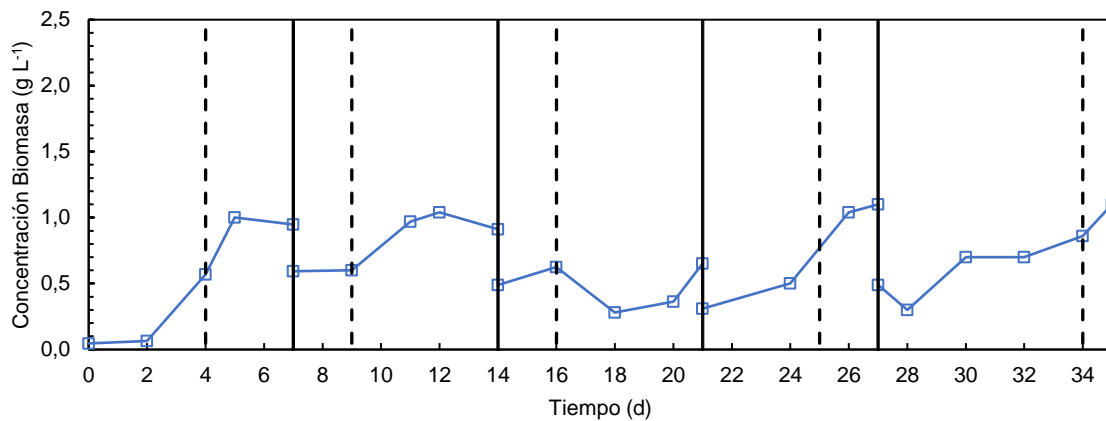


Figura 23. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

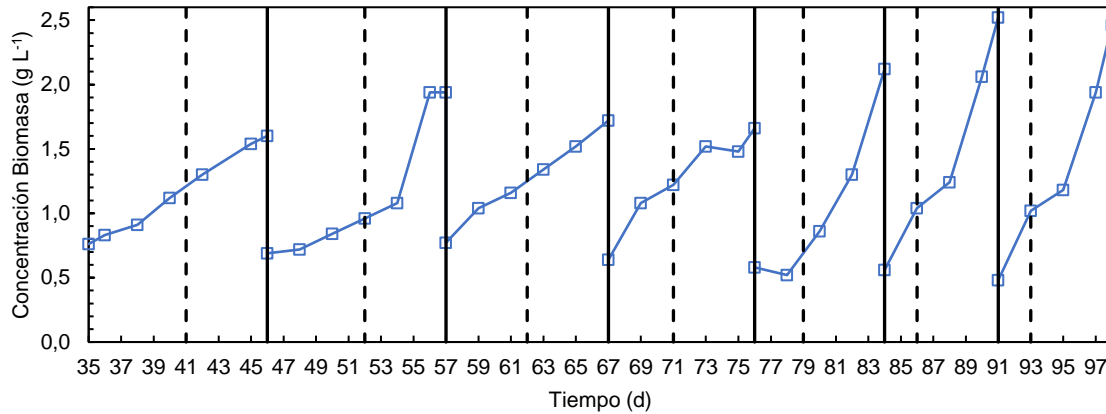


Figura 24. Concentración de biomasa en el reactor en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

#### 4.3.3. Nitrógeno Total, Carbono Orgánico Total y Carbono inorgánico

En la figura 25 y 26 se presentan las concentraciones de Nitrógeno Total (TN), Carbono Orgánico Total (TOC) y Carbono inorgánico (IC) en el reactor durante el periodo de operación de 98 días.

En la figura 25 se presentan las concentraciones de TN, TOC y IC en el reactor durante el periodo de operación de 0 a 35 días. El periodo de aclimatación inició con una concentración de 101 mg L<sup>-1</sup> de TN y de 26,99 mg L<sup>-1</sup> de TOC (0 al día 7). Durante este periodo se observó un consumo de TN asociado al crecimiento de la biomasa y no se observó variación significativa en la concentración de IC. Los ciclos de operación entre los días 0 a 35 iniciaron con una concentración de TN promedio de 102 mg L<sup>-1</sup> para la etapa *Feast* y una concentración inicial de TN promedio de 27 mg L<sup>-1</sup> para la etapa *Famine*. La etapa *Famine* finalizó con una concentración promedio de TN de 9 mg L<sup>-1</sup>. En cuanto a la concentración de TOC, se observó un aumento en su valor durante los ciclos de operación. Los dos primeros ciclos iniciaron con una concentración TOC promedio de 16 mg L<sup>-1</sup> y finalizaron la etapa *Famine* con una concentración promedio de 97 mg L<sup>-1</sup>. La operación entre los días 21 a 35 iniciaron con una concentración TOC promedio de 44 mg L<sup>-1</sup>, y finalizaron con una concentración de 61,9 mg L<sup>-1</sup> y 142 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No observó una variación en la concentración del IC significativa.

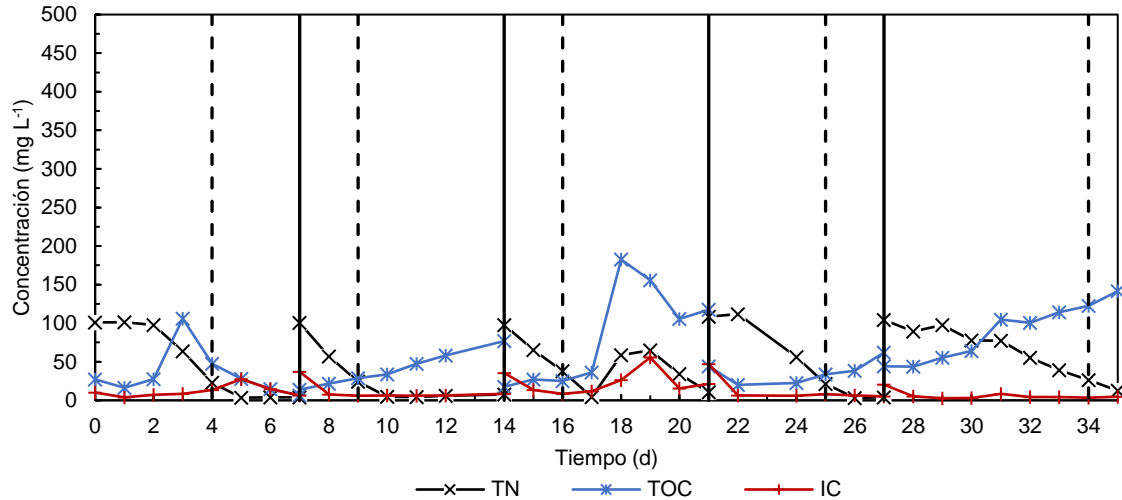


Figura 25. Concentración de Nitrógeno Total (x), Carbono Orgánico Total (\*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

En la figura 26 se presentan las concentraciones de nitrógeno total, carbono orgánico total y carbono inorgánico en el reactor durante el periodo de operación de 35 a 98 días. Los ciclos de operación iniciaron con una concentración de TN promedio de 101 mg L<sup>-1</sup> para la etapa *Feast* y una concentración inicial de TN promedio de 23 mg L<sup>-1</sup> para la etapa *Famine*. La etapa *Famine* finalizó con una concentración promedio de TN de 11 mg L<sup>-1</sup>. En cuanto a la concentración de TOC, se observó en los ciclos realizados entre los días 35 a 76 una concentración TOC inicial promedio de 164 mg L<sup>-1</sup> y una concentración final promedio de 398 mg L<sup>-1</sup>. No se observó variación significativa en la concentración de carbono inorgánico.

La operación iniciada los días 76, 84 y 91 corresponden a los ciclos después del lavado del reactor para reducir la concentración de TOC en el medio. Después del lavado, el ciclo inició con una concentración de TOC de 10,9 mg L<sup>-1</sup> y finalizó con una concentración de 222 mg L<sup>-1</sup>. Los siguientes ciclos de operación iniciaron con una concentración de 49,3 mg L<sup>-1</sup> y 73 mg L<sup>-1</sup> y finalizaron con una concentración de 334 mg L<sup>-1</sup> y 282 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No se observó variación significativa en la concentración del carbono inorgánico en el medio.

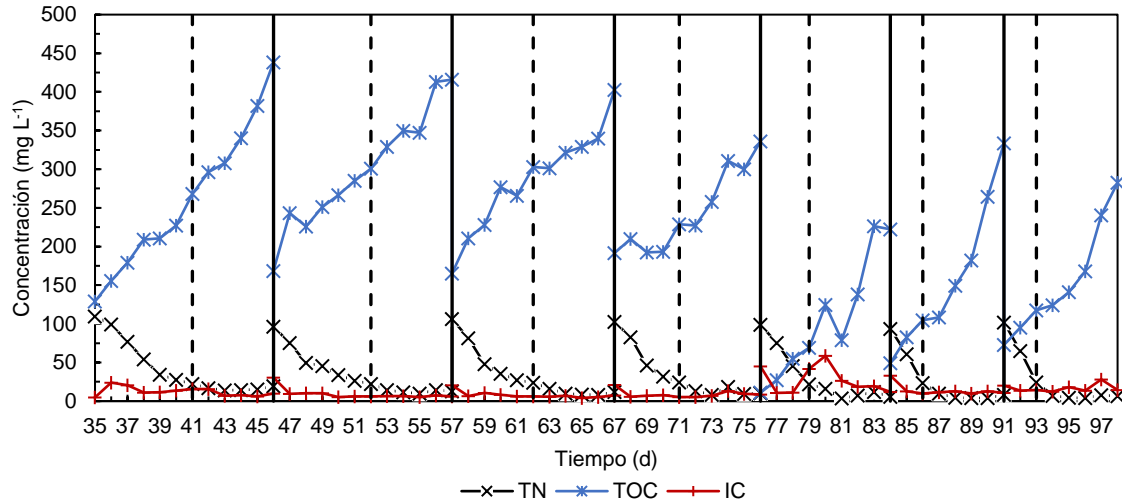


Figura 26. Concentración de Nitrógeno Total (x), Carbono Orgánico Total (\*) y Carbono Inorgánico (+) en el medio en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

Finalmente, la concentración promedio inicial de nitrógeno en cada ciclo fue de  $102 \text{ mg L}^{-1}$  y la concentración promedio de nitrógeno en que se estableció el inicio de la etapa *Famine* fue de  $24,7 \text{ mg L}^{-1}$ . El comportamiento observado de la concentración de TN concuerda con la estrategia *Feast-Famine* mencionada por C. Oliveira donde en promedio se tuvo una ratio de *Feast-Famine* de 0,7, siendo en promedio mayor la fase *Famine* lo que beneficia la acumulación de PHAs (Oliveira et al., 2017).

Por otro lado, en ambos gráficos se pudo observar que la concentración de carbono orgánico total en el medio tuvo una tendencia al aumento, esto se vio con más claridad en los ciclos realizados entre los días 35 a 98, donde se alcanzó una concentración promedio de  $347 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono orgánico total al finalizar los ciclos de *Famine*. Esta alta concentración de carbono orgánico total en el medio se podría deber a la presencia de un metabolito intermediario de la ruta de degradación de tolueno, esto se comenta en mayor profundidad en la siguiente sección.

#### 4.3.4. Acumulación PHA

En los gráficos a continuación, figura 27 y 28, se presentan los porcentajes de acumulación de PHA y la concentración de carbono orgánico total (TOC) en el reactor durante el periodo de operación de los días 0 a 98.

La acumulación de PHAs en el reactor durante el periodo de operación de 0 a 35 días. Durante el periodo de aclimatación del día 0 al día 7, se tomó una muestra el día 4 para determinar la acumulación de PHA antes de iniciar con los ciclos de operación, obteniendo un valor de 2,8%. También, se analizaron las muestras de los días 5 y 7, donde se obtuvo acumulación de 9,6% y 15,6%, respectivamente.

En el primer periodo de *Famine* iniciado el día 9 se obtuvo un porcentaje de 5,8% y 15,5% los días 10 y 14 respectivamente. Por otro lado, la etapa de *Famine* iniciada el día 16 tuvo una acumulación de 8,6% el día 17 y de 8,4% el día 21, donde no se observó un aumento en la acumulación. En la etapa *Famine* iniciada el día 25, se observó una acumulación de 8,4% y 14,3% en los días 26 y 27, respectivamente. Por último, se observó una acumulación de 10,4% el día 35.

Por otro lado, acumulación de PHAs en el reactor durante el periodo de operación de los días 35 a 98, en donde se pudo observar que la acumulación se mantuvo por debajo del 6% en todos los ciclos de operación realizados. Durante la etapa *Famine* iniciada el día 41 se obtuvo una acumulación de 4,6% y 6,3% los días 42 y 46, respectivamente. En la etapa *Famine* que inició el día 52 se pudo observar una acumulación de 6,3% y 5,3% en los días 53 y 57, respectivamente. La acumulación de la etapa *Famine* que inició el día 62 fue de 4,5% y 2,0% los días 63 y 67, respectivamente. En la etapa *Famine* iniciada el día 71 se obtuvo un porcentaje de acumulación de 1,9% el día 72 y 3,3% el día 76. El porcentaje de acumulación de la etapa *Famine* iniciada el día 79 fue de 3,5% el día 80 y 1,8% el día 84. Por otro lado, en la etapa *Famine* iniciada el día 86 se obtuvo un porcentaje de acumulación de 1,9% y 2,7% los días 87 y 91, respectivamente. Finalmente, en la etapa *Famine* iniciada el día 93 se obtuvo una acumulación de 2,6% el día 92 y 2,8% el día 98.

Se pudo observar que en los ciclos de operación con una baja concentración de TOC durante la etapa *Famine*, por debajo de  $182 \text{ mg L}^{-1}$ , tuvieron una acumulación de PHA, con un valor promedio de 12,8%. Por el contrario, los ciclos de operación que tuvieron una alta concentración de TOC durante la etapa *Famine*, sobre el  $182 \text{ mg L}^{-1}$ , tuvieron una baja acumulación de PHA, con un valor promedio de 4,2%. Sin embargo, en los últimos tres ciclos realizados entre los días 76 y 98, donde en el día 76 se realizó el lavado del reactor, se pudo observar que a pesar de haber disminuido la concentración de TOC inicial de la etapa *Famine* a un valor promedio de  $97 \text{ mg L}^{-1}$  la concentración de TOC siguió su tendencia de aumento hasta un valor promedio final de  $279 \text{ mg L}^{-1}$ , por lo que la acumulación de PHA se mantuvo en un valor promedio de 2,5%.

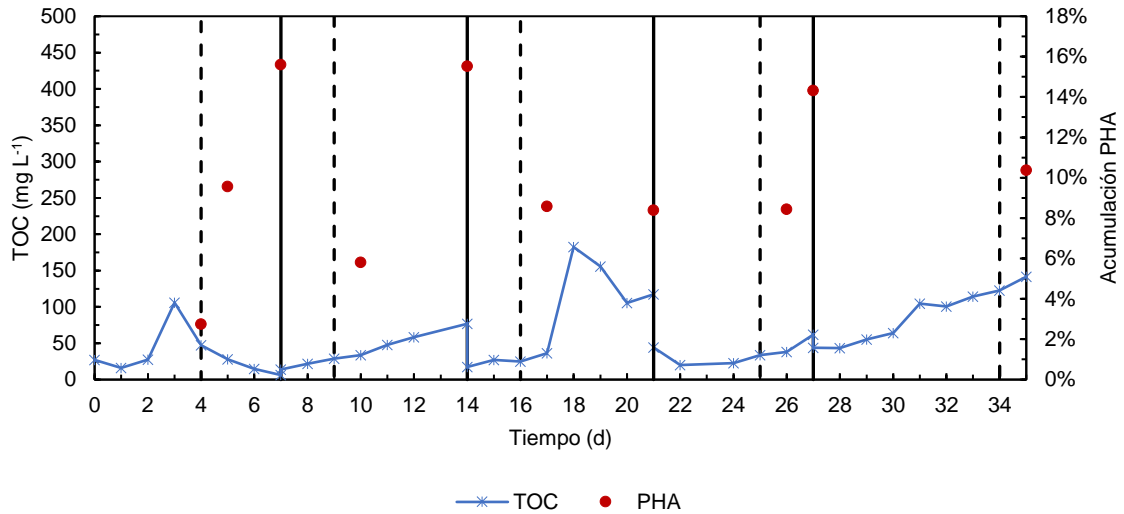


Figura 27. Porcentaje de acumulación de PHA (●) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (\*) en el medio en función del tiempo durante los días 0 a 35 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

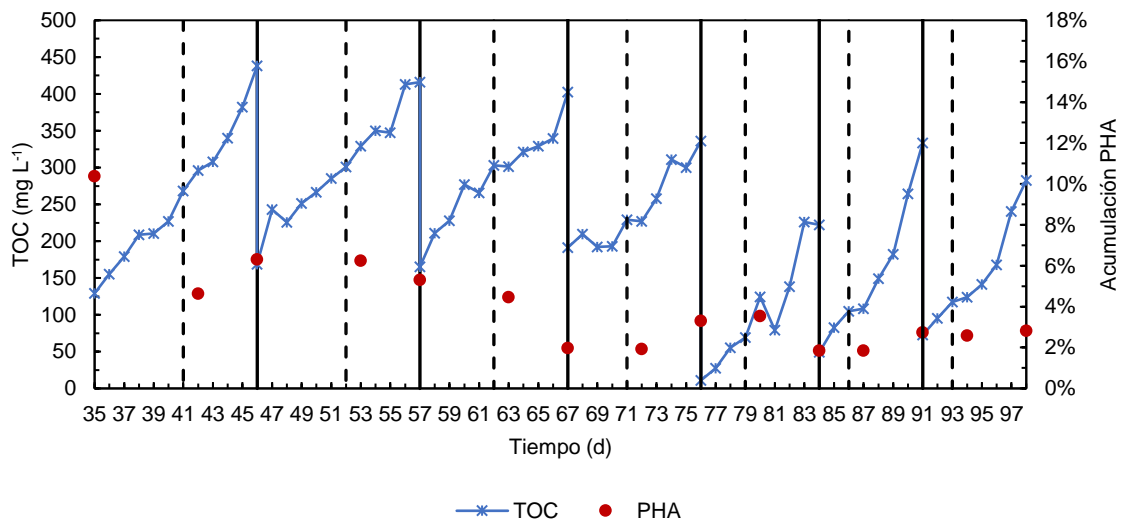


Figura 28. Porcentaje de acumulación de PHA (●) y Concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) (\*) en el medio en función del tiempo durante los días 35 a 98 de operación. La línea continua representa el inicio de la etapa de Feast y la línea discontinua el inicio de la etapa de Famine.

En las figuras 27 y 28 se observó que desde el día 35 de operación la concentración de TOC en el medio fue en aumento y la acumulación de PHAs fue en disminución, por lo que se podría plantear como hipótesis que el microorganismo presenta acumulación de PHAs hasta 5 periodos de limitación de nitrógeno, puesto que después de estos periodos se observó que la acumulación de PHAs disminuyó y la acumulación de TOC aumentó en el

medio. Sin embargo, a modo de descartar que la disminución de esta acumulación se debía a la alta concentración de TOC se realizó una re-suspensión de la biomasa del reactor en medio fresco el día 76 de operación, pero se observó el mismo comportamiento de los ciclos anteriores, por lo que también esta disminución de acumulación se pudo deber a la edad del microorganismo y al tiempo de estrés. Esto se observó por *Allison Pieja, Eric Sundstrom y Craig Criddle* en el estudio de ciclos continuos de operación con limitación de nitrógeno usando como fuente de carbono metano, en su investigación observaron que la acumulación de PHB disminuía al realizar múltiples ciclos de limitación de nitrógeno (Pieja et al., 2012). Esto también fue observado por *K. Johnson, R. Kleerebezem y M. van Loosdrecht*, donde indicaban que una comunidad enriquecida de lodos activados usando como fuente de carbono Acetato y con limitación de nitrógeno repetida exhibían una disminución de la capacidad para producir PHB en comparación con cultivos que no se sometieron repetidamente a la limitación de nitrógeno (Johnson et al., 2010).

También, se observó en la figura 23 que la biomasa final de los ciclos realizados entre los días 0 a 35 en promedio fue de  $0,942 \text{ g L}^{-1}$ , periodo en el que se observa una mayor acumulación de PHAs (figura 27). Por otro lado, en la figura 24 se observó que la biomasa final de los ciclos realizados entre el día 35 a 98 en promedio fue de  $2,01 \text{ g L}^{-1}$ , periodo en el que se observa una baja acumulación de PHAs (figura 28). Esta diferencia se pudo deber a que el microorganismo en los primeros días de operación destino parte de la fuente de carbono a la acumulación de PHAs, por eso se observa un menor crecimiento de la biomasa. En cambio, en los siguientes días de operación se observa una menor acumulación de PHAs pero un mayor crecimiento de la biomasa, por lo que el microorganismo pudo haber destinado la fuente de carbono al crecimiento. Este comportamiento se asimila al observado por *B. Anat* usando *E. Coli* donde se observó que la concentración de biomasa fue incrementando durante la etapa *Famine* de los ciclos (Bren et al., 2013).

Además, este crecimiento observado coincide con la adición de nitrógeno al medio, por lo que se observa una sensibilidad a la adición del nitrógeno del microorganismo, destinando el nutriente y la fuente de carbono al crecimiento de la biomasa (figura 26). Acompañado de este crecimiento, se observa un aumento en la concentración del TOC (figura 26).

La alta concentración de TOC que se observó en el medio en la figura 28 se podría deber a la presencia de un metabolito intermediario de la ruta de síntesis de PHA. En la figura 29, se pueden observar dos imágenes del sobrenadante obtenido después de centrifugar 500

mL de muestra del reactor del día 76 de operación. Se pudo observar que el sobrenadante tenía una coloración amarilla.

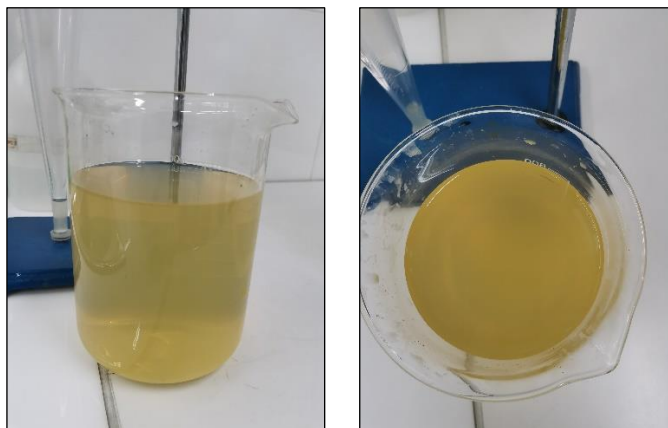


Figura 29. Sobrenadante del reactor del día 76 de operación.

El color amarillo del medio se asocia a la presencia de 2-HMS (Barbosa et al., 2019) (Bai et al., 2021a) (Bai et al., 2021b) (Lé Onard et al., 1999), metabolito que está presente en la vía de meta-segmentación del microorganismo utilizado. Este es un compuesto orgánico que posee los grupos funcionales aldehído, enlace doble carbono-carbono, grupos carboxi e hidroxilo. Los múltiples grupos funcionales que posee hacen que el compuesto tenga una amplia aplicación en la preparación de productos químicos, debido a que se puede someter fácilmente a oxidación, esterificación, hidrogenación y halogenación (Bai et al., 2021a). Entre los productos químicos se tienen adhesivos, vitaminas, inhibidores de corrosión y pesticidas. Por ejemplo, fueron preparados Ácido picolínico (Veliz et al., 2011) y Piridina (Ali Altaf et al., 2015) haciendo reaccionar el 2-HMS con Hidróxido amónico (Davis et al., 1968) o amina primaria (Dagley et al., 1960).

En estudios con la *Pseudomonas stutzeri* N2 degradando compuestos fenólicos como el Fenol, Clorofenol, Cresol y Carecol, se observó grandes cantidades de 2-HMS a través de la vía de meta-segmentación (Nie et al., 2016) (Bai et al., 2021a). En otro estudio se observó la acumulación de 2-HMS usando como fuente de carbono Benzoato sódico y el microorganismo *Pseudomonas putida* TCC 49451. (Loh & Chua, 2002). En la figura 30 se puede observar la acumulación de 2-HMS en las investigaciones mencionadas anteriormente.

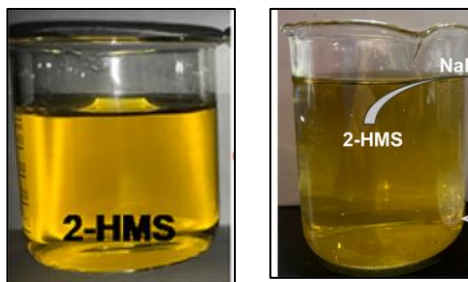


Figura 30. 2-HMS producido por *Pseudomona stutzeri* N2. Sobrenadante obtenido después de centrifugar el medio de operación. Imagen izquierda (Bai, Nie, Diwu, & et al., 2021). Imagen derecha (Bai, Nie, Diwu, & et al., 2021).

Las enzimas encargadas de degradar este metabolito son la *2-hidroxiacetoaldehído deshidrogenasa* (EC 1.2.1.85) y la *2-hidroxiacetoaldehído hidrolasa* (EC 3.7.1.9). Debido a la acumulación observada de este metabolito a lo largo de los ciclos realizados, las enzimas encargadas de degradarlo pueden haber disminuido su actividad. En su investigación *David Leonard y Nicholas Lindley* estimaron que probablemente la enzima *2-hidroxiacetoaldehído deshidrogenasa* estuviera saturada por sustrato a altos radios de crecimiento, usando como sustrato Fenol y como microorganismo *Alcaligenes eutrophus* (Leonard & Lindley, 1998). Por otro parte, *Jun Inoue* en su investigación mencionó que el pH óptimo para la catálisis *2-hidroxiacetoaldehído deshidrogenasa* para la oxidación de 2-HMS es de 8,3 en *Pseudomona putida* usando como sustrato Alcohol bencílico (Inoue et al., 1995). Por lo que, para investigaciones futuras se podría analizar el efecto del pH en la catálisis de esta enzima.

Cabe destacar que a pesar de que el microorganismo pudo haber acumulado este metabolito en el medio, la biomasa siguió creciendo y la degradación del contaminante se mantuvo por lo que no se observó una inhibición del metabolismo de la cepa.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

De la presente investigación realizada se puede concluir que:

- I. La *Pseudomonas fulva* es capaz de degradar en presencia y ausencia de nitrógeno los compuestos de Tolueno, Etilbenceno, Estireno y la mezcla de estos. Por otra parte, la *Pseudomonas putida mt-2* es capaz de degradar en presencia y ausencia de nitrógeno solo los compuestos de Tolueno y Etilbenceno. Por otro lado, la *Pseudomonas fulva* es capaz de acumular PHAs en ausencia de nitrógeno con el compuesto de Tolueno. Pero, la *Pseudomonas putida mt-2* es capaz de acumular PHAs en ausencia de nitrógeno con los compuestos de Tolueno y Etilbenceno. De este punto se concluye que la *Pseudomonas putida mt-2* da una oportunidad de utilizar una fuente de carbono en mezcla de esos compuestos.
- II. En una operación semicontinua la *Pseudomonas putida mt-2* degrada el Tolueno tanto en la etapa *Feast* como en la etapa *Famine*, con remociones sobre el 90%. Al modificar la razón *Feast-Famine* se observa que la degradación de Tolueno no varía significativamente en el tiempo de operación. Además, en la operación semicontinua el microorganismo es capaz de acumular PHAs en limitación de nitrógeno con un valor de 12,7% en el segundo ciclo de operación.
- III. En una operación semicontinua con ciclos continuos de operación la *Pseudomonas putida mt-2* degrada el Tolueno tanto en la etapa *Feast* como en la etapa *Famine*, con remociones sobre el 90% a lo largo de todos los ciclos de operación. Por otro lado, en una operación con ciclos continuos se observa que el microorganismo no es capaz de acumular PHAs de forma sostenida en el tiempo. Sin embargo, se observa la acumulación cualitativamente de algún metabolito intermedio en la ruta de degradación, siendo una hipótesis la formación de 2-Hidroximuconato semialdehído, el cual también es un producto de interés.

Finalmente, se concluye que la operación semicontinua con *Pseudomonas putida mt-2* puede ser un tratamiento de remoción para emisiones continuas de Tolueno. Sin embargo, se debe optimizar para la acumulación de PHAs. Por lo que para investigaciones futuras se recomienda buscar una optimización de ciclos *Feast-Famine* para la acumulación de PHAs e indagar en la producción de metabolitos intermedios para su posible valorización.

## 6. Referencias

- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). A Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 178, Issue 2, pp. 224–250). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1881-y>
- Ali Altaf, A., Shahzad, A., Gul, Z., Rasool, N., Gul, Z., Badshah, A., Lal, B., Khan, E., & Khan, E. A. (2015). Review on the Medicinal Importance of Pyridine Derivatives. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*, 1(1), 1–11. <https://doi.org/10.11648/j.jddmc.20150101.11>
- American Public Health Association. (2017). *Standard Methods for the examination of water of wastewater*. 23. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.216>
- Assinder, S. J., & Williams, P. A. (1990). *The TOL Plasmids: Determinants of the Catabolism of Toluene and the Xylenes*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60119-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60119-8)
- Bai, X., Nie, M., Diwu, Z., & et al. (2021a). Extraction and purification of 2-hydroxymuconic semialdehyde accumulated in phenol degradation by *Pseudomonas stutzeri* N2. *Chemical Engineering Journal*, 419. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129444>
- Bai, X., Nie, M., Diwu, Z., & et al. (2021b). Preparation of 2-hydroxymuconic semialdehyde from catechol by combining enzymatic catalysis with bisulfite nucleophilic addition. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105970>
- Barbosa, P., Araújo, P., Oliveira, J., Fraga, I., Pissarra, J., & Amaral, C. (2019). Metabolic pathways of degradation of malvidin-3-O-monoglucoside by *Candida oleophila*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104768>
- Berenjian, A., Chan, N., & Malmiri, H. J. (2012). Volatile Organic Compounds removal methods: A review. In *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 220–229). <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2012.220.229>
- Borrero-de Acuña, J. M., Rohde, M., Saldias, C., & Poblete-Castro, I. (2021). Fed-Batch mcl- Polyhydroxyalkanoates Production in *Pseudomonas putida* KT2440 and  $\Delta$ phaZ

- Mutant on Biodiesel-Derived Crude Glycerol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.642023>
- Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., & Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-27>
- Cao, B., Geng, A., & Loh, K. C. (2008). Induction of ortho- and meta-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(1), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1728-3>
- Chen, G., & Strevett, K. A. (2002). *Impact of carbon and nitrogen conditions on E. coli surface thermodynamics*. [www.elsevier.com/locate/colsurfb](http://www.elsevier.com/locate/colsurfb)
- Dagley, S., Evans, W., & Ribbons, D. (1960). New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Nature*, 560–566. [https://doi.org/S\\_DAGLEY,\\_W\\_C\\_EVANS,\\_D\\_W\\_RIBBONS](https://doi.org/S_DAGLEY,_W_C_EVANS,_D_W_RIBBONS)
- Davis, R. S., Hossler, F. E., & Stone, R. W. (1968). Metabolism of p-and m-xylene by species of *Pseudomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*, 14, 1005–1009. <https://doi.org/10.1139/m68-166>
- Duetz, W. A., De Jong, C., Williams, P. A., & Van Andel, J. G. (1994). Competition in Chemostat Culture between *Pseudomonas* Strains That Use Different Pathways for the Degradation of Toluene. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 60, Issue 8). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Edwards, F. G., & Nirmalakhandan, N. (1996). Biological treatment of airstreams contaminated with VOCs: An overview. *Water Science and Technology*, 34(3-4-4 pt 2), 565–571. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00597-5](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00597-5)
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., & Ramos, J.-L. (2000). Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 182, Issue 9). [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)
- Feist' And, C. F., & Hegeman, G. D. (1969). Regulation of the meta Cleavage Pathway for Benzoate Oxidation by *Pseudomonas putida*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 100, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.1121-1123.1969>

- Fontaine, P., Mosrati, R., & Corroler, D. (2017). Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.115>
- García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, G., Antonio, J., & López, C. (2013). SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 77–115. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&tlng=es)
- Holubar, P., Andorfer, C., & Braun, R. (1998). *Effects of nitrogen limitation on biofilm formation in a hydrocarbon-degrading trickle-bed filter*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002530051430>
- Huub HJ Cox, & Marc A Deshusses. (1998). *Biological waste air treatment in biotrickling filters*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80056-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80056-6)
- Inoue, J., Shaw, J. P., Rekik, † Monique, & Harayama, S. (1995). Overlapping Substrate Specificities of Benzaldehyde Dehydrogenase (the xylC Gene Product) and 2-Hydroxymuconic Semialdehyde Dehydrogenase (the xylG Gene Product) Encoded by TOL Plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 177, Issue 5). <http://jb.asm.org/>
- J. Acevedo, C. Lobos, I. Poblete, R. Lebrero, & A. Carvajal. (2023). *Treatment and valorization of toluene and styrene from waste gas streams by Pseudomonas fulva*.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, 44(7), 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.031>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. In *Bioengineering* (Vol. 4, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kunz, D. A., & Chapman, P. J. (1981). Catabolism of Pseudocumene and 3-Ethyltoluene by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for New Functions of the TOL (pWWO)

- Plasmid. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 146, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1128/jb.146.1.179-191.1981>
- Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., & Witholt, B. (1988). Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 54, Issue 12). <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.2924-2932.1988>
- Lé Onard, D., Youssef, C. Ben, Destruhaut, C., Lindley, N. D., & Queinnec, I. (1999). Phenol Degradation by *Ralstonia eutropha*: Colorimetric Determination of 2-Hydroxymuconate Semialdehyde Accumulation to Control Feed Strategy in Fed-Batch Fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 65, 407–415. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19991120\)65:4<407::aid-bit5>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19991120)65:4<407::aid-bit5>3.0.co;2-#)
- Loh, K.-C., & Chua, S.-S. (2002). *Ortho pathway of benzoate degradation in Pseudomonas putida: induction of meta pathway at high substrate concentrations*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00016-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00016-9)
- López-Sánchez, A., Leal-Morales, A., Jiménez-Díaz, L., Platero, A. I., Bardallo-Pérez, J., Díaz-Romero, A., Acemel, R. D., Illán, J. M., Jiménez-López, J., & Govantes, F. (2016). Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida* Running title: Biofilm-defective mutants in *P. putida* Downloaded from. In *FEMS Microbiology Letters Advance Access*. <http://femsle.oxfordjournals.org/>
- Moorkoth, D., & Nampoothiri, K. M. (2016). Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresource Technology*, 201, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.046>
- Mukesh Doble, & Anil Kumar. (2005). *Biotreatment of Industrial Effluents*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-075067838-4/50031-2>
- Ni, Y. Y., Kim, D. Y., Chung, M. G., Lee, S. H., Park, H. Y., & Rhee, Y. H. (2010). Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technology*, 101(21), 8485–8488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.033>

- Nie, H., Nie, M., Yang, Y., Zhao, J., Zhang, X., Guo, Y., Wan, Y., & Zi, J. (2016). Characterization of Phenol Metabolization by *P. stutzeri* N2. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 36(5), 587–600. <https://doi.org/10.1080/10406638.2015.1033434>
- Nikodinovic, J., Kenny, S. T., Babu, R. P., Woods, T., Blau, W. J., & O'Connor, K. E. (2008). The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 665–673. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1593-0>
- Oliveira, C. S. S., Silva, C. E., Carvalho, G., & Reis, M. A. (2017). Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnology*, 37, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.008>
- Parales, R. E., Parales, J. V., Pelletier, D. A., & Ditty, J. L. (2008). Chapter 1 Diversity of Microbial Toluene Degradation Pathways. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 64, pp. 1–73). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00401-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00401-2)
- Pfeifenschneider, J., Brautaset, T., & Wendisch, V. F. (2017). Methanol as carbon substrate in the bio-economy: Metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals. In *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 11, Issue 4, pp. 719–731). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/bbb.1773>
- Pieja, A. J., Sundstrom, E. R., & Criddle, C. S. (2012). Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community. *Bioresource Technology*, 107, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.044>
- Prakash, J., Gupta, R. K., Xx, P., & Kalia, V. C. (2018). Bioprocessing of Biodiesel Industry Effluent by Immobilized Bacteria to Produce Value-Added Products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(1), 179–190. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2637-7>
- Raza, N., Hashemi, B., Kim, K. H., Lee, S. H., & Deep, A. (2018). Aromatic hydrocarbons in air, water, and soil: Sampling and pretreatment techniques. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 103, pp. 56–73). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.012>

- Schilling, C. H., Schuster, S., Palsson, B. O., & Heinrich, R. (1999). Metabolic pathway analysis: Basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnology Progress*, 15(3), 296–303. <https://doi.org/10.1021/bp990048k>
- Stanley E. Manahan. (2006). *Environmental Science and Technology: A Sustainable Approach to Green Science and Technology SECOND EDITION*. <https://doi.org/10.1201/9781420003215>
- Thurston, G. D. (2016). Outdoor Air Pollution: Sources, Atmospheric Transport, and Human Health Effects. In *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 367–377). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00320-9>
- Veliz, L., Martínez, J., Araujo, M., Brito, F., Lubes, G., Rodríguez, M., & Lubes, V. (2011). Estudio de la hidrólisis del ion Niquel(II) y de la formación de los complejos de Niquel(II) con los ácidos Picolínico y Dipicolínico en NaCl 1,0 mol.dm<sup>-3</sup> a 25°C. *Avances En Química*, 6, 3–8. [www.saber.ula.ve/avancesenquimica](http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica)