



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Optimización del proceso de
bioconversión de compuestos orgánicos
volátiles en biopolímeros**

Autor:

Rodríguez Francos, Silvia

Tutor(es):

**Lebrero Fernández, Raquel
Pérez Fernández, Rebeca
Departamento de Ingeniería
Química y tecnología del Medio
Ambiente**

Universidad de Valladolid

Valladolid, Julio 2022.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



RESUMEN

La producción de biopolímeros para sustituir a los plásticos convencionales a partir de sustancias contaminantes o de desecho constituye una alternativa de gran interés a los métodos de tratamiento convencionales. El presente trabajo se centró en la producción de polihidroxibutirato (PHB) empleando la cepa *Rhodococcus opacus* (DSM 43205), compuestos orgánicos volátiles (COVs) como fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Los ensayos preliminares demostraron que el COV que mejor se adaptó a las condiciones de operación establecidas fue el tolueno, alcanzando un rendimiento de eliminación del 100% y dando lugar a la síntesis de PHB. Posteriormente, se operó un reactor de tanque agitado destinado al crecimiento celular, a la degradación de tolueno y a la producción de PHB. Se empleó una concentración de tolueno de 4 g m^{-3} y una concentración en nitrógeno variable, limitando en N para optimizar la productividad de PHB alcanzando valores máximos de 39,7% de PHB (en peso) tras 4 días de limitación de N. Además, se observó una eliminación completa de tolueno durante todo el periodo experimental.

Palabras clave: *Compuestos orgánicos volátiles, tolueno, polihidroxibutiratos, Rhodococcus opacus, limitación en nitrógeno.*

ABSTRACT

The production of bioplastics as substitutes of conventional plastics using waste as carbon source constitutes an interesting alternative to conventional waste management. The present work aimed at the production of polyhydroxybutyrate (PHB) using the strain *Rhodococcus opacus* (DSM 43205), VOCs as carbon source and NH_4Cl as nitrogen. Preliminary assays showed that the VOC that best adapted to the established operating conditions was toluene, reaching a removal performance of 100% and resulting in PHB synthesis. The second trial consisted of a stirred tank reactor for cell growth, toluene degradation and PHB production was operated for 85 days. A toluene concentration of 4 g m^{-3} and a variable nitrogen concentration were used, limiting N to promote a higher PHB productivity. Maximum PHB values of 39.7% (w/w) were achieved after 4 days of N limitation. A complete toluene abatement was recorded during the experimental period.

Keywords: *Volatile organic compounds, toluene, nitrogen-limiting conditions, polyhydroxybutyrate, Rhodococcus opacus*



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Compuestos orgánicos volátiles.....	1
1.1.1. Emisiones ambientales de COVs	5
1.1.2. Alternativas para la eliminación de COVs.....	7
1.2. El problema de la contaminación por plásticos derivados del petróleo y sus alternativas biológicas: los PHAs	8
1.2.1. Contaminación por plásticos derivados del petróleo	8
1.2.2. Bioplímeros como alternativa a los plásticos convencionales: los PHAs 10	
1.2.2.1. Historia y producción	11
1.2.2.2. Características químicas y físicas.....	11
1.2.2.3. Biosíntesis	14
1.2.2.4. Purificación y extracción de PHA	15
1.2.2.5. Aplicaciones de los PHAs	17
1.3. Producción de PHA a partir de COVs.....	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Materiales	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Preparación de inóculo	25
3.2.2. Procedimiento experimental	26
3.2.3. Métodos analíticos.....	30
3.2.4. Cálculos	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Ensayos de degradación en batch	34
4.1.1. Eficacia de eliminación de VOCs.....	34
4.1.2. Productividad de PHB	38
4.2. Operación en continuo	43
4.2.1. Eficacia de eliminación, concentración de sólidos y nitrógeno total 43	
4.2.2. Productividad de PHB	51



4.2.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	56
5. CONCLUSIONES	60
6. BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS	71
ANEXO I: Curvas de calibrado	71



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular de tolueno.....	1
Figura 2: Estructura molecular de etilbenceno.....	3
Figura 3: Estructura molecular de estireno.....	3
Figura 4: Estructura molecular de los tres isómeros del xileno. (A) p-xileno, (B) m-xileno, (C) o-xileno	4
Figura 5: Evolución de las emisiones mundiales de COVDM por sector. Fuente: Emissions Database for Global Atmospheric Research.	6
Figura 6: Tendencias de crecimiento de la producción global de plástico y SUP (plásticos de un solo uso). Fuente: Chen et al., 2021.....	8
Figura 7: Esquema de un gránulo de PHB. Fuente: (M. ben García, 2015.) ...	10
Figura 8: Morfología de células produciendo gránulos de PHA. Fuente: de Eugenio Martínez, 2009	11
Figura 9: Estructura general de los polihidroxialcanoatos. Fuente: (Malán Courdín , 2011.)	12
Figura 10: Ruta general de la síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir de acetil-CoA	15
Figura 11: Propiedades de los PHAs cuando se utiliza como biomaterial.....	18
Figura 12: Diagrama de flujo sistema experimental	27
Figura 13: Sistema experimental del ensayo 2	28
Figura 14: Evolución de consumo de tolueno en los ensayos en batch inoculados con (A) 0,5 g L ⁻¹ y (B) 0,22 g L ⁻¹ de biomasa (línea negra botella 1; línea gris botella 2)	35
Figura 15: Evolución de consumo de etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	36
Figura 16: Evolución de consumo de estireno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	36
Figura 17: Evolución de consumo de o-xileno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	37
Figura 18: Evolución de consumo de tolueno (■), etilbenceno (▲) y estireno (●) (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	38
Figura 19: Evolución de consumo de tolueno en el experimento 1 inoculado con 0,5 gL ⁻¹ de biomasa (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	39
Figura 20: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	39
Figura 21: Evolución de consumo de tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	40
Figura 22: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	40



Figura 23: Evolución de consumo de etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2).....	42
Figura 24: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)	42
Figura 25: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 1. Las líneas verticales representan los intercambios de medio del reactor	44
Figura 26: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 2. Las líneas naranjas verticales representan los intercambios de medio del reactor y las líneas verticales punteadas representa el aporte de N	46
Figura 27: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 3. Las líneas naranjas verticales representan los intercambios de medio del reactor y las líneas verticales punteadas representa el aporte de N	48
Figura 28: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 4. Las líneas verticales punteadas representan el aporten de N	50
Figura 29: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en tres muestras de la etapa 1	52
Figura 30: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en tres muestras de la etapa 2	53
Figura 31: %PHB medio producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en la etapa 3	54
Figura 32: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en la etapa 4.....	55
Figura 33: Imagen al microscopio electrónico del medio de cultivo. Se puede apreciar los gránulos de PHB acumulados intracelularmente	56
Figura 34: Evolución temporal de la concentración de N (●) a lo largo del ensayo en continuo.....	57
Figura 35: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) a lo largo del ensayo en continuo	57
Figura 36: Curva de calibrado de tolueno	71
Figura 37: Curva de calibrado de etilbenceno	71
Figura 38: Curva de calibrado de estireno	72
Figura 39: Curva de calibrado de xileno.....	72
Figura 40: Curva de calibrado de la concentración de sólidos.....	73



ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Propiedades físicas y termodinámicas del tolueno	2
Tabla 2: Propiedades físicas y termodinámicas de etilbenceno	3
Tabla 3: Propiedades físicas y termodinámicas de estireno	4
Tabla 4: Propiedades físicas y termodinámicas de los 3 isómeros del xileno ..	5
Tabla 5: Propiedades físicas de diferentes polímeros	13
Tabla 6: Propiedades del PHB y PP	14
Tabla 7: Composición del medio mineral	24
Tabla 8: Evolución del %PHB producido en función de la concentración celular	41
Tabla 9: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 1.....	51
Tabla 10: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 2.....	52
Tabla 11: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 3.....	53
Tabla 12: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 4.....	55



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos orgánicos volátiles.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) están constituidos principalmente por carbono y poseen una gran facilidad para pasar a fase gas debido a su elevada presión de vapor a temperatura ambiente (Stirchak y col., 2021). De acuerdo con la directiva Europea 1999/13/CE, se consideran COVs a aquellos compuestos con una presión de vapor superior a 0,01 KPa a 20°C. Estos reaccionan con otros compuestos a través de reacciones fotoquímicas que se dan en la interfase líquido-vapor, concretamente aire-agua, (Wang y col., 2022) contribuyendo así al aumento del smog fotoquímico y produciendo efectos negativos tanto en el medio ambiente como en la salud debido a sus efectos de carcinogenicidad y mutagénesis entre otras. (Runhua Ou y col., 2022).

Una fracción de COVs es la denominada BTEXS, formada por benceno, tolueno, etilbenceno, xileno y estireno. Se caracterizan por encontrarse en estado gaseoso a temperatura ambiente, son insolubles en agua, pero solubles líquidos orgánicos. Estos compuestos aromáticos se encuentran en combustibles fósiles, principalmente en el petróleo y en productos derivados de él, como la gasolina (Blas Martín, 2012). Además, su elevado poder disolvente hace que el tolueno y xileno, sean apreciados en la industria como disolventes para la síntesis de varios compuestos orgánicos como plásticos, fibras sintéticas o pesticidas. (El-Naas y col., 2014)

A continuación, se describen los componentes que forman la fracción BTEXS. El benceno no fue estudiado en este trabajo de fin de grado.

- Tolueno

El tolueno (Figura 1) o metilbenceno, es un hidrocarburo aromático de fórmula empírica C_7H_8 , líquido a condiciones ambientales e incoloro con un olor característico fuerte y penetrante. (Martínez & Ariza, 2012.)

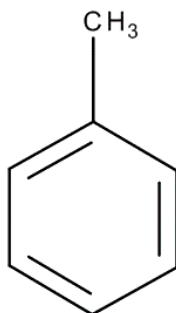


Figura 1: Estructura molecular de tolueno

Se origina de forma natural a partir del petróleo crudo mediante el reformado catalítico de gasolinas y naftas, por coquizado de carbón tipo hulla o mediante craqueo al vapor.

Las propiedades físicas y termodinámicas del tolueno se recogen en la Tabla 1

Tabla 1: Propiedades físicas y termodinámicas del tolueno

Propiedad	Valor
Masa Molecular	92.1 g/mol
Punto de ebullición	111 °C
Punto de fusión	-95 °C
Densidad relativa	0.87
Presión de vapor	3.8 KPa a 25 °C
Densidad relativa de vapor	3.1
Punto de inflamación	4 °C c.c.
Temperatura autoignición	480 °C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	1.1-7.1

Cabe destacar que no se trata de una sustancia corrosiva, no reacciona con ácidos o bases además de que en la atmósfera reacciona de rápidamente con hidroxilos. Es muy poco soluble en agua, miscible en éter, etanol, cloroformo, ácido acético glacial, disulfuro de carbono y aceites (Quijano y col., 2020.).

- Etilbenceno

El etilbenceno (Figura 2) o feniletano, de fórmula empírica C_8H_{10} , es líquido en a temperatura y presión ambiente, de carácter inflamable e incoloro. Posee un olor similar a la gasolina y reacciona con oxidantes fuertes además de atacar a materiales plásticos y al caucho. Es insoluble en agua, pero es miscible en disolventes orgánicos y sustancias lipófilas como aceites y grasas. En forma gaseosa se mezcla bien con el aire, formando mezclas explosivas.

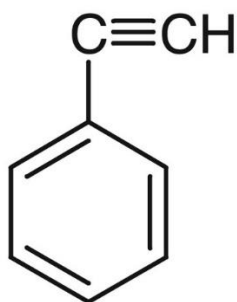


Figura 2: Estructura molecular de etilbenceno

Las propiedades fisicoquímicas del etilbenceno se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2: Propiedades físicas y termodinámicas de etilbenceno

Propiedad	Valor
Masa Molecular	106.2 g/mol
Punto de ebullición	136 °C
Punto de fusión	-95°C
Densidad relativa	0.9 g/ml (a 20°C)
Presión de vapor	0.9 kPa (a 20°C)
Densidad relativa de vapor	3.7 g/m ³
Punto de inflamación	18 °C c.c.
Temperatura autoignición	432 °C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	1.0-6.7
Viscosidad	0.6 mm ² /s a 25 °C

- Estireno

El estireno (Figura 3) o vinil benceno de fórmula empírica C₈H₈ es un hidrocarburo aromático líquido de carácter aceitoso, incoloro o de color amarillento, insoluble en agua y soluble en alcohol y éter. Se evapora rápidamente y tiene un olor dulce.

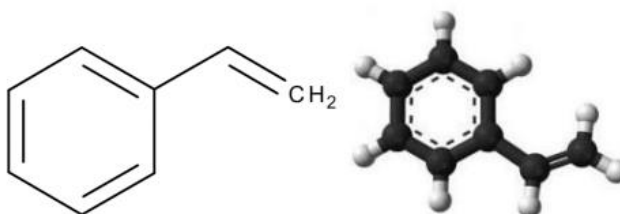


Figura 3: Estructura molecular de estireno

Se obtiene a partir del proceso de refino de petróleo mediante el proceso de alquilación de benceno con una posterior deshidrogenación para producir el monómero.

Las propiedades físicas y termodinámicas del estireno se recogen en la Tabla 3

Tabla 3: Propiedades físicas y termodinámicas de estireno

Propiedad	Valor
Masa Molecular	104.2 g/mol
Punto de ebullición	145 °C
Punto de fusión	-30.6 °C
Densidad relativa	0.91
Presión de vapor	0.67 KPa a 20 °C
Densidad relativa de vapor	3.6
Punto de inflamación	31 °C c.c.
Temperatura autoignición	490 °C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	0.9-6.8
Viscosidad	0.7 mPa a 25 °C

- Xileno

El xileno (Figura 4), con fórmula empírica C_8H_{10} , es una de las sustancias más demandadas en el mercado, también es de las más contaminantes debido a que puede filtrarse al suelo, aguas de superficie o en aguas subterráneas. La mayoría del xileno que se libera accidentalmente se evapora al aire, aunque una cierta cantidad de libera a ríos o lagos. Elevadas cantidades de xileno pueden entrar al suelo, al agua o al aire como consecuencia de derrames accidentales o de escapes que ocurren cuando se almacena o entierra en un sitio de desechos. Posee tres isómeros: p-xileno, m-xileno y o-xileno.

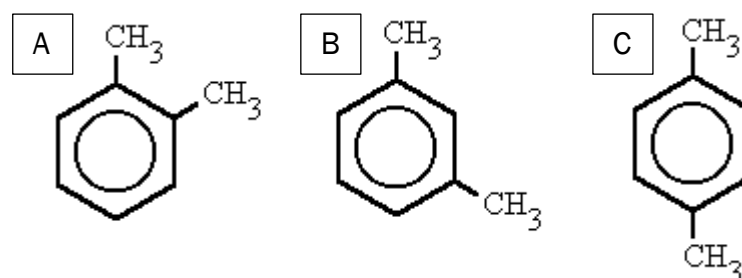


Figura 4: Estructura molecular de los tres isómeros del xileno. (A) p-xileno, (B) m-xileno, (C) o-xileno

- m-Xileno

El meta-xileno (Figura 4-A), es utilizado para la producción de recubrimientos de gel y otros además de jugar un papel muy importante en la obtención de poliésteres para tuberías resistentes a la corrosión marina. Además, forma parte de los revestimientos de aparatos electrodomésticos, automóviles...

- p-Xileno

El para-xileno (Figura 4-B) es utilizado principalmente como materia prima para la producción de fibras de poliéster y para la fabricación de terftalato de polietileno (PET), componente principal en la industria de envases alimentarios. Además, se utiliza en la producción de colorantes, perfumes sintéticos, medicamentos y algunos aditivos (Toda Calderón, 2018.).

- o-Xileno

El orto-xileno (Figura 4-C) se utiliza como disolvente en imprenta y en industrias como la del caucho y el cuero. Cabe destacar que además se usa como agente de limpieza, diluyente de pintura y, en pequeñas proporciones, se encuentra en combustible de aviones y en gasolina.

En la Tabla 4 se recogen las propiedades físicas y termodinámicas de los tres isómeros.

Tabla 4: Propiedades físicas y termodinámicas de los 3 isómeros del xileno

Propiedad	m - xileno	p - xileno	o- xileno
Masa Molecular	106.2 g mol ⁻¹	106.2 g mol ⁻¹	106.2 g mol ⁻¹
Punto de ebullición	139°C	138°C	144°C
Punto de fusión	-48 °C	13°C	-25°C
Densidad relativa	0.86	0.86	0.88
Presión de vapor	0.8 kPa a 20°C	0.9 kPa a 20°C	0.7 kPa a 20°C
Densidad relativa de vapor	3.7	3.7	3.7
Punto de inflamación	27°C cc	27°C cc	32°C c.c
Temperatura autoignición	527°C	528°C	463 °C
Límites de explosividad, % en volumen en el aire	1.1-7.0	1.1-7.0	0.9-6.7

1.1.1. Emisiones ambientales de COVs

La proporción de BTEXS emitida en los procesos petroquímicos ha aumentado a lo largo de los años debido al rápido desarrollo de la industria moderna lo que ha supuesto una mayor demanda de petróleo (Figura 5). Por ello, hasta que las

nuevas energías no logren reemplazar dicho combustible, la demanda de petróleo se mantendrá en altos niveles y, con ello, la contaminación ambiental por BTEXS. (Q. Liu y col., 2014). El uso de este tipo de compuestos a gran escala es criticado debido a sus graves efectos tanto para la salud humana como para el medio ambiente, principalmente en agua, aire y suelo, ya que poseen propiedades genotóxicas, efectos negativos sobre el sistema respiratorio además de la posible causa de depresión del sistema nervioso central. Además, los COVs contribuyen a aumentar la concentración (Carvajal y col., 2018)

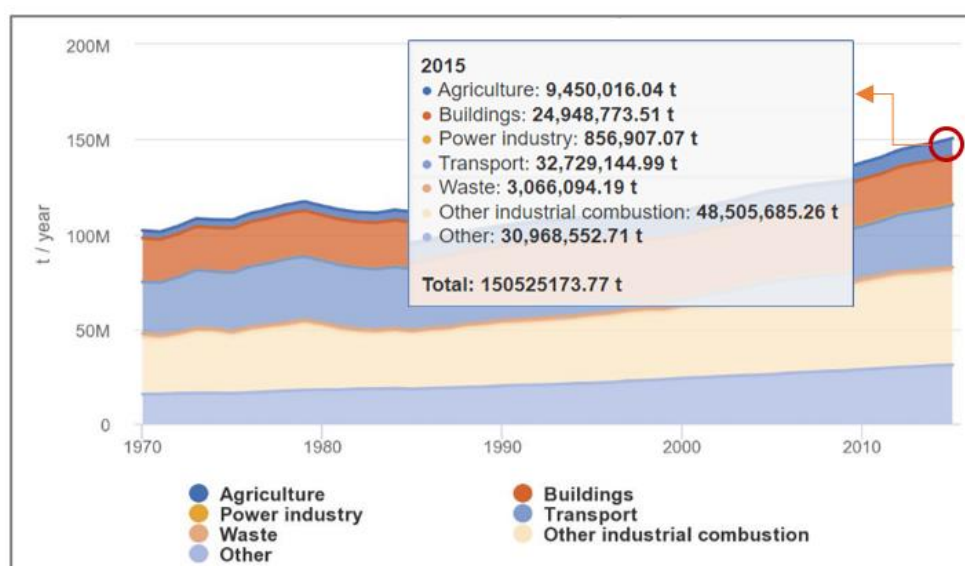


Figura 5: Evolución de las emisiones mundiales de COVDM por sector. Fuente: Emissions Database for Global Atmospheric Research.

Las principales emisiones antropogénicas de BTEX se deben a la quema de combustibles como la gasolina, el carbón, la madera o el gas natural, con un factor de emisión estimado en 0,77 kg-COVs por tonelada de petróleo crudo refinado (Y. Liu y col., 2020). Además, son liberados por disolventes, pinturas y otros productos empleados y almacenados en hogares y lugares de trabajo. Finalmente, los procesos de tratamiento de residuos sólidos constituyen una fuente importante de COVs, con factores de emisión de entre 0,6 y 7,3 kg-COV por tonelada de fracción orgánica de residuo sólido municipal (Font y col., 2011). La tercera fuente principal de BTEXS es la industria de químicos procesados o materiales de construcción, fundamentalmente aquellos que emplean disolventes orgánicos: pinturas y barnices, industria siderúrgica, industria de la madera o las industrias cosmética y farmacéutica. (Q. Liu y col., 2014)

Por todo ello, los BTEX se han clasificado como contaminantes peligrosos del aire a escala nacional por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica por sus propiedades cancerígenas, aunque existen dudas todavía de si producen efectos dañinos a exposiciones prolongadas a bajas concentraciones, aunque dicho organismo ha establecido una concentración máxima de tolueno, etilbenceno y xilenos permisibles en el agua potable en 1000 µg/L, 700 µg/L y 10000 µg/L, respectivamente (S. Wang et al., 2010) y en el aire, con una concentración máxima de tolueno, etilbenceno, estireno de 5 mg/m³, 434 mg/m³, 426 mg/m³, respectivamente. Asimismo, legislaciones europeas como la Directive on Ambient Air Quality (2008/50/EC) o la EU Industrial Emissions Directive (2010/75/EU), junto con otras regulaciones específicas aplicables a distintos sectores industriales, limitan las emisiones de COVs.

1.1.2. Alternativas para la eliminación de COVs

Existen diferentes alternativas para la eliminación de COVs en entornos industriales como puede ser la oxidación catalítica, oxidación fotocatalítica, tratamientos biológicos, adsorción en medios porosos y condensación. (Carvajal y col., 2018). En particular, los métodos físico-químicos como la oxidación térmica, la adsorción con carbón activo o el lavado, aunque les caracteriza su eficiencia superior al 95%, poseen elevados costes de operación y ocasionan impacto ambiental debido a las condiciones extremas de operación, la alta demanda de energía o los elevados costes de materias primas.

Los BTEXS son compuestos producidos naturalmente y se ha demostrado ampliamente que existen una gran variedad de microorganismos capaces de degradarlos (Castro, 2009.). En este sentido, varias cepas bacterianas como las de la especie *Pseudomonas* han demostrado la capacidad de biodegradar una gran cantidad de compuestos aromáticos. La eliminación de COVs mediante procesos biológicos se convierte en una alternativa rentable y medioambientalmente sostenible para el tratamiento de gases de escape que contienen bajas o moderadas concentraciones de estos contaminantes, al operar a temperatura y presión ambiente, no requerir productos químicos ni generar residuos peligrosos. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como la necesidad de condiciones estables de humedad, temperatura y alimentación para el microorganismo, por lo que es necesario diseñar y operar los sistemas biológicos de forma adecuada para asegurar la actividad de la microbiología.

Existen diversas configuraciones de biorreactores donde se ha logrado con éxito la biodegradación aeróbica de BTEXS siendo los biofiltros la más utilizada

(Carvajal y col., 2018). Son biorreactores rellenos con medios de empaque donde los microorganismos crecen en suspensión o adheridos. Los contaminantes no pueden ser tratados directamente en la fase gaseosa y los sustratos deben transferirse primero a la fase líquida (Yang y col., 2018). La eliminación biológica de COVs también se ha implementado tradicionalmente en reactores de biomasa suspendida, agitados mecánicamente y donde la corriente contaminada es introducida al sistema a través de una membrana o difusor, como en el caso del presente estudio. Esto permite la recuperación de la biomasa para una posterior valorización (apartado 1.3), al contrario que los reactores donde la biomasa crece en forma de biopelícula.

1.2. El problema de la contaminación por plásticos derivados del petróleo y sus alternativas biológicas: los PHAs

1.2.1. Contaminación por plásticos derivados del petróleo

El consumo masivo de plásticos supone una amenaza para el medio ambiente. La producción mundial de plásticos y de plásticos de un solo uso (SUP) en el año 2015 llegó hasta 380 millones de toneladas y se pronostica que en el año 2050 esta cifra se cuadruplique (Figura 6). El 90% de dicha producción proviene de plásticos derivados del petróleo (Rivera-Garibay y col., 2020.).

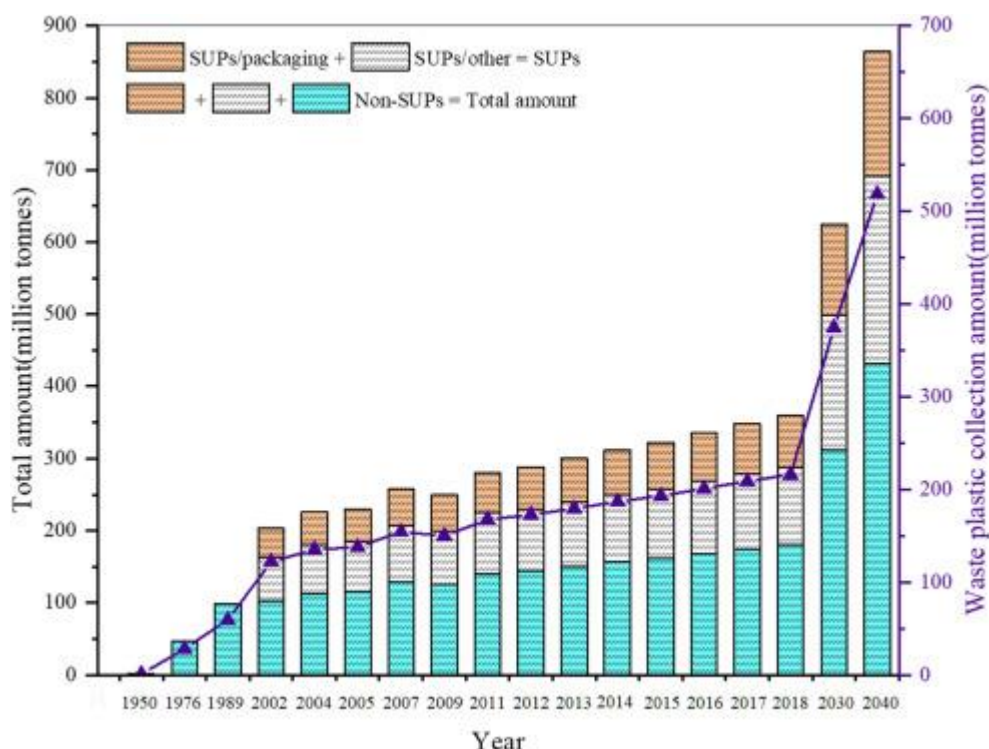


Figura 6: Tendencias de crecimiento de la producción global de plástico y SUP (plásticos de un solo uso). Fuente: Chen et al., 2021

El plástico ha remplazado, en muchos de los casos, el uso del papel y vidrio, y como consecuencia su uso ha aumentado de manera masiva generando anualmente 25 millones de toneladas de residuos, de los cuales cientos de miles son arrojados a ambientes marinos. (G. García y col., 2013).

Los plásticos derivados del petróleo tardan una media de 180 años en degradarse por completo siendo un material de gran uso con una limitada capacidad de autodestrucción y, como consecuencia, se van acumulando a lo largo de los años. Son capaces de dispersar contaminantes metálicos y orgánicos, sobre todo en el mar, como PCB (bifenilos policlorados), PAH (hidrocarburos poliaromáticos) y DDT (plaguicidas). Se ha demostrado que los plásticos, concretamente los SUP al degradarse se fragmentan en pequeñas piezas con diámetros inferiores a 5 mm, conocidos como microplásticos secundarios (Chen y col., 2021). Según diversos estudios en diferentes partes del mundo, dichos microplásticos que se encuentran en el agua contaminan el agua potable. La liberación de sustancias químicas de los microplásticos genera también efectos negativos en la fauna marina. (Luque González, 2019). Además, los microplásticos generados pueden ser arrastrados por vientos y corrientes marinas que se dispersan en ecosistemas, e incluso en el aire que respiramos (Fernando López-Aguirre y col., 2020).

El problema de la acumulación y, como consecuencia, de la contaminación por desechos plásticos se ha intentado atacar de diferentes maneras, ya sea con procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reúso. Sin embargo, estos modos de operación presentan numerosas desventajas, entre ellas la contaminación causada (Chen y col., 2021), por lo que no se consideran medidas del todo efectivas.

El reciclaje parece una medida óptima entre las anteriores propuestas, sin embargo, el proceso está limitado por el elevado tiempo necesario, así como por la presencia de numerosos aditivos, como pigmentos y cubiertas (G. García y col., 2013). Por ello, actualmente son recicladas proporciones mínimas de los plásticos producidos, lo que supone un obstáculo para el concepto de economía circular. (Chen y col., 2021).

La mejor solución para abordar la contaminación de microplásticos es la búsqueda de un material que posea las mismas características que los plásticos que se utilizan de forma habitual, pero con mejores propiedades de degradación, con el fin de evitar la masiva acumulación y los impactos negativos en el medio ambiente. Un ejemplo de ello son los polihidroxialcanoatos (PHAs), aunque su mayor inconveniente es su alto coste respecto a los derivados petroquímicos.

1.2.2. Bioplímeros como alternativa a los plásticos convencionales: los PHAs

Los PHAs son polímeros de carácter biocompatible y biodegradable producidos por diferentes especies bacterianas como *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Burkholderia*, *Rhodospirillum*, etc. (Bhatia y col., 2021) que utilizan como reserva de carbono y energía siendo sometidas a condiciones de estrés.

Los PHAs son biopolímeros de ácidos hidroxialcanoicos, acumulados intracelularmente, concretamente en el citoplasma de la bacteria, en forma de gránulos llegando a acumular de 8 a 10 gránulos (Eugenio Martínez, 2009), donde estas inclusiones presentan un diámetro comprendido entre 0,2-0,5 μm y se encuentran rodeadas por una membrana a la que están unidas las enzimas que participan en su síntesis. (M. ben García, 2015.). Su acumulación se produce como respuesta a un estrés por la falta de nutrientes de su medio (nitrógeno, fósforo, etc.). Los PHAs acumulados se usan posteriormente por la célula como fuente de carbono y energía (Carolina y col., 2015.). Una vez que son extraídos de la célula presentan unas propiedades físicas muy similares a los plásticos derivados del petróleo, por lo que tiene potencial para ser utilizados como sustitutos de estos plásticos, solventando la creciente crisis actual de los desechos plásticos (G. García y col., 2013).

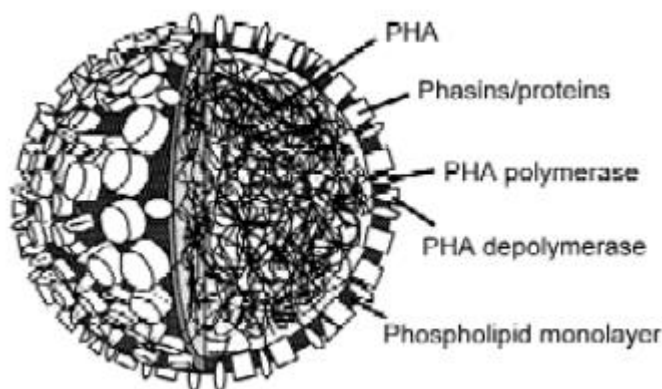


Figura 7: Esquema de un gránulo de PHB. Fuente: (M. ben García, 2015.)

La existencia de una bicapa lipídica en la superficie del gránulo es debido a la naturaleza hidrofóbica del PHA, ya que le confiere estabilidad al gránulo inmerso en el ambiente hidrofílico del citoplasma celular.

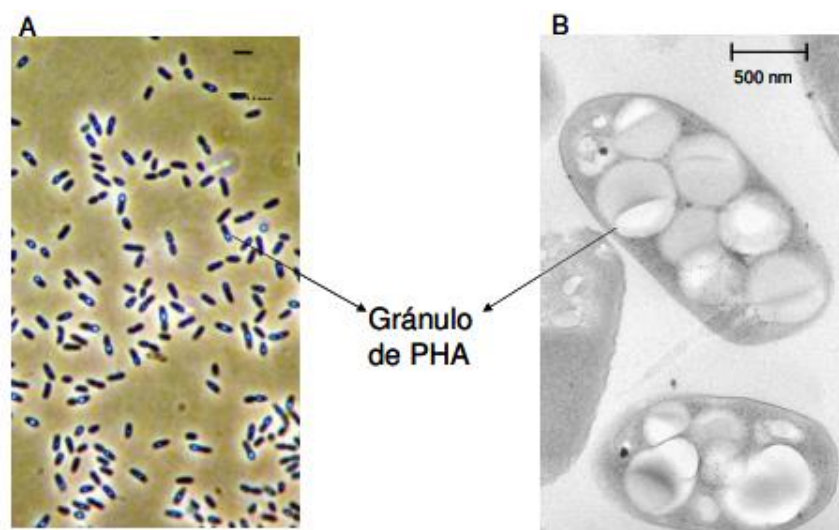


Figura 8: Morfología de células produciendo gránulos de PHA. Fuente: de Eugenio Martínez, 2009

1.2.2.1. Historia y producción

El primer hidroxialcanoato que fue estudiado fue el poli 3-hidroxibutirato (P3HB) descubierto por Lemoigne en 1926 (Lemoigne, 1926). Posteriormente, en 1964 en una bacteria de género *Norcadia* se identificó el 3-hidroxi-2-butenico (Anderson & Dawes, 1990). En las aguas residuales, en el año 1972, se confirmó la presencia de 3-hidroxivalérico (3HV), 3-hidroxihexanoico (3HHx) y 3-hidroxieptanoico (3HHep) (Wallen y Rohdedder, 1974). En 1976 se comenzaron los estudios para la producción de P3HB a partir de la bacteria *Ralstonia eutropha* (Byrom, 1990). y en el año 2004 una empresa estadounidense, Procter & Gamble, desarrolló y comercializó un copolímero de P3HB utilizando microorganismos genéticamente modificados (Noda y col. 1926). En la actualidad, debido al crecimiento económico y demográfico, China se ha convertido en uno de los países con mayor producción de PHAs debido a su elevado consumo de plásticos (Chen, 2008).

1.2.2.2. Características químicas y físicas

Los PHAs son polímeros lineales de 3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero reacciona con el grupo hidroxilo del monómero siguiente formando un enlace de tipo éster. Por ello, también son denominados biopolíesteres (M. ben García, 2015).

En la Figura 9 se puede observar la estructura química del monómero de PHA donde el valor n dependerá del grupo R y varía entre 100 y 30000. (Carolina y col., 2015.). Actualmente se conocen 150 ácidos hidroxialcanoicos (Diego Armando, 2008.).

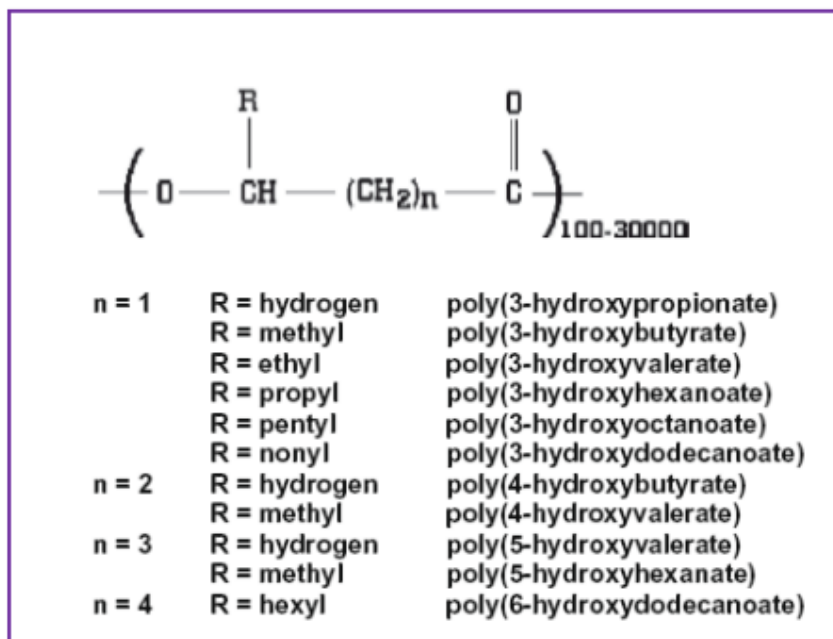


Figura 9: Estructura general de los polihidroxicanoatos. Fuente: (Malán Courdín , 2011.)

Dependiendo del número de átomos de carbono de las unidades monoméricas se pueden clasificar, de acuerdo con su estructura química en: PHAs de cadena corta (scl-PHA) compuestos de 4 o 5 átomos de carbono, PHAs de cadena media (mcl-PHA) procedentes de monómeros de 6 a 14 átomos de carbono y PHAs de cadena larga (lcl-PHA) con monómeros de más de 14 átomos de carbono. El PHB (polihidroxi butirato o ácido polihidroxi butírico), biopolímero a estudiar en este trabajo de fin de grado, es un polihidroxicanoato de cadena corta (Eugenio Martínez, 2009).

Además de la longitud de su cadena, existen otros criterios para su clasificación. Atendiendo a su origen se puede distinguir entre PHA naturales, si son producidos de manera natural por los microorganismos a partir de sustratos generales o PHA semisintéticos, si por el contrario se añaden precursores para favorecer la biosíntesis. Por otro lado, dependiendo de la naturaleza de los monómeros que componen la cadena se clasifican en homopolímeros, si la unidad monomérica se encuentra unida a otra igual o heteropolímeros si dos o más unidades monoméricas diferentes se unen entre sí formando un copolímero. Por último, según la naturaleza química de los monómeros se distingue entre PHA que contienen ácidos grasos alifáticos, aromáticos o si contienen ambos tipos (M. ben García, 2015).

Dependiendo de la longitud de las cadenas laterales unidas al esqueleto del polímero o la distancia entre las uniones éster, los PHA presentarán propiedades diferentes.

En general, son insolubles en agua y muestran propiedades elastoméricas y/o termoplásticas. El largo de la cadena influye en la hidrofobicidad del polímero, su temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea (T_g) y el grado de cristalinidad. Los scl-PHA se caracterizan por ser muy frágiles, rígidos y con una elongación para ruptura menor del 5%, mientras que los mcl-PHA son más elásticos y poseen menos fuerza mecánica (Diego Armando, 2008.) (Carolina y col., 2015.)

En la Tabla 5 se recogen las propiedades físicas de los diferentes tipos de PHAs y su comparación con las observadas para los plásticos derivados del petróleo (Y. G. García y col., 2013.) .

Tabla 5: Propiedades físicas de diferentes polímeros

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (Mpa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB)	179	3,5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2,9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1,5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0,7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1,7	3,5	400	45
Polietileno-tereftalato	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2,8	83	60	*

* Información no disponible

Intracelularmente, se encuentran en un estado amorfo y fluido mientras que una vez que se extrae su grado de cristalinidad aumenta. Los PHA de cadena corta poseen una alta temperatura de fusión (180°C) con una temperatura de transición vítrea comprendida entre -5 y 20°C. Por el contrario, los PHA de cadena media son altamente amorfos y, por ello, se clasifican como elastómeros. (Y. G. García y col., 2013.)

El PHB o P3HB es el polímero más comercializado y mejor estudiado de la familia de poliésteres PHA. Se trata de un polímero frágil con estructura y propiedades similares al polipropileno (PP) (Tabla 6). Es un biopolíéster semicristalino investigado ampliamente en aplicaciones biomédicas, medioambientales y de envasado de alimentos debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad.

La temperatura de degradación de PHB se encuentra a 200°C lo que implica un acotado rango de trabajo. Sin embargo, dichas propiedades se pueden mejorar mediante la adición de un copolímero, como puede ser 3-hidroxivalerato para el PH3B, que hace descender la temperatura de fusión, pudiendo trabajar evitando su degradación (Ana Karen Malán, 2011.)

Tabla 6: Propiedades del PHB y PP

Parámetro	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50-70
Fuerza de tensión (Mpa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

1.2.2.3. Biosíntesis

La composición monomérica de los PHAs depende de las rutas metabólicas a partir de las cuales son sintetizados y la fuente de carbono que utilice como materia prima para dicha ruta. Los PHAs provienen principalmente de dos rutas metabólicas: degradación de azúcares mediante la obtención de Acetil-CoA o degradación de ácidos grasos por β -oxidación (Yadira & Riaño, 2010.). Cabe destacar que esta ruta puede ser reversible en el caso en el que el microorganismo se encuentre en déficit de fuente de energía (carbono y nitrógeno) por lo que acabaría consumiendo el propio polímero (Carolina y col., 2015.)

La ruta general de síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir de acetil-CoA consta de 3 etapas catalizadas por la enzima β -ketotiolasa, (Figura 10)

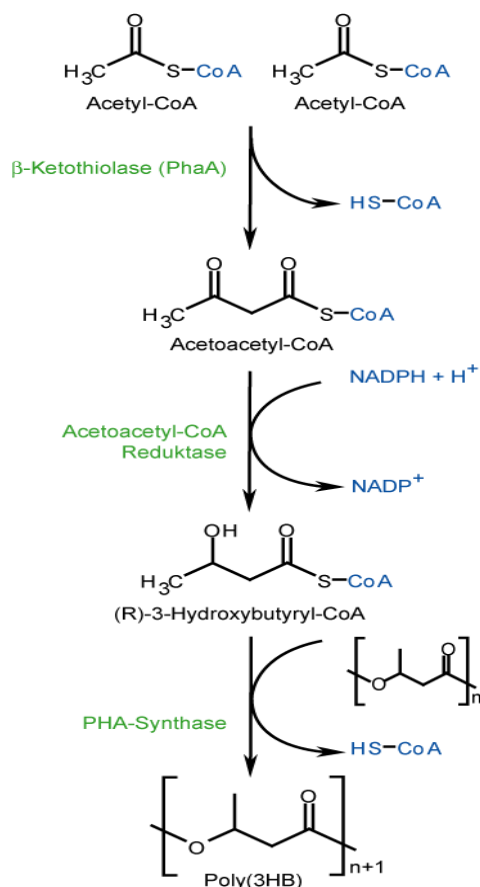


Figura 10: Ruta general de la síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir de acetil-CoA

1.2.2.4. Purificación y extracción de PHA

Los PHA son acumulados intracelularmente por los microorganismos de tal manera que es necesaria su extracción.

La extracción y purificación de PHA son dos etapas decisivas en el proceso ya que poseen una gran influencia en las aplicaciones del producto además de su precio final. Son procesos que constan de diversas etapas y diversas vías o alternativas con las que se puede operar.

Para la extracción, primeramente, es necesaria la separación de las células bacterianas del medio de cultivo utilizando para ello técnicas como la filtración o la centrifugación. A continuación, se lleva a cabo la extracción del polímero de la matriz celular además de la separación de la biomasa no polimérica y la posterior retirada de residuos de lípidos y otros metabolitos secundarios generados en el proceso de fermentación. Para llevar a cabo este proceso se combinan diferentes técnicas.

La elección de dichas técnicas depende de los siguientes factores:

- Cepa microbiana: existen diferentes niveles de fragilidad de la membrana celular.
- El tipo de PHA generado: el tipo de PHA determina el solvente óptimo para su extracción y purificación.
- El porcentaje en masa de PHA acumulado intracelularmente.
- La pureza requerida del producto: es determinada por la aplicación que se le va a dar al polímero.
- Las propiedades térmicas, mecánicas y el peso molecular del polímero.

A continuación, se realiza una descripción de las diferentes alternativas existentes para la extracción de los PHAs producidos mediante fermentaciones bacterianas.

- Extracción con solventes orgánicos

Existen diferentes solventes que, a temperatura ambiente, han sido utilizados para la extracción de PHAs de cadena corta y de cadena media como el diclorometano, el dicloroetano o el cloroformo. Una de las ventajas que ofrecen estos solventes frente a otros es que permiten obtener altos niveles de recuperación y pureza. Esto es debido a que sólo solubilizan el polímero, además de algunas impurezas lipídicas de biomasa restantes (estas se pueden eliminar mediante tratamientos sencillos). Tras la extracción, la solubilidad del polímero se reduce, y como consecuencia el polímero precipita, añadiendo un “antisolvente”, que por lo general se trata de un alcohol de bajo peso molecular.

La principal desventaja de la utilización de solventes halogenados es su elevada toxicidad, tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Además, son necesarias elevadas cantidades de solvente. Este hecho ha promovido el estudio de alternativas del proceso de extracción utilizando solventes amigables con el medio ambiente. (Felipe & Farfán, 2019)

- Tratamiento con hipoclorito de sodio.

El hipoclorito de sodio es un fuerte oxidante capaz de destruir membranas biológicas además de todos los componentes celulares, sin embargo, en concentraciones controladas este tratamiento es efectivo para la extracción de PHAs.

Se trata de un método de digestión química, económico donde se logran alcanzar elevados grados de pureza del polímero (>99.5%), aunque como principal inconveniente cabe destacar la posible degradación parcial del polímero por el propio hipoclorito de sodio, además de los problemas ambientales generados en el área del tratamiento de aguas residuales. Al añadir hipoclorito de sodio, el peso molecular del polímero disminuye, aunque

esta degradación se consigue prevenir con el uso de agentes oxidantes, como el bisulfito de sodio. Por este motivo, esta técnica de purificación queda descartada a escala industrial. (Felipe & Farfán, 2019)

- Tratamiento con agentes surfactantes

A concentraciones bajas, estas moléculas se incorporan a la bicapa lipídica de la membrana bacteriana. A medida que la concentración de agente surfactante aumenta se incorpora un mayor número de moléculas a la bicapa.

Una vez que se ha saturado la membrana, un aumento de concentración de agente surfactante supone la ruptura de la misma, formándose grandes micelas que contienen fosfolípidos y moléculas de surfactante. Los agentes surfactantes más utilizados son el dodecil sulfato de sodio y el Triton X-100. (Arias Carbajal, 2014.)

- Métodos enzimáticos

Enzimas como proteasas, nucleasas, lisosomas o lipasas tienen propiedades hidrofílicas esenciales en las proteínas de la membrana bacteriana y son capaces de producir una ruptura celular sin generar efectos relevantes en los gránulos de PHA.

- Métodos mecánicos

Existen diversos métodos mecánicos ampliamente estudiados para la liberación de PHAs de las células bacterianas. Sin embargo, estas alternativas solo son utilizadas a escala de laboratorio. Destacan la lisis con molino de bolas y la homogeneización a alta presión. La eficacia de estos procesos depende de la concentración de biomasa existente, a bajas concentraciones no se obtienen buenos resultados. (Felipe & Farfán, 2019)

1.2.2.5. Aplicaciones de los PHAs

Las aplicaciones de estos biopolímeros son muy diversas, tanto como las de los plásticos derivados del petróleo.

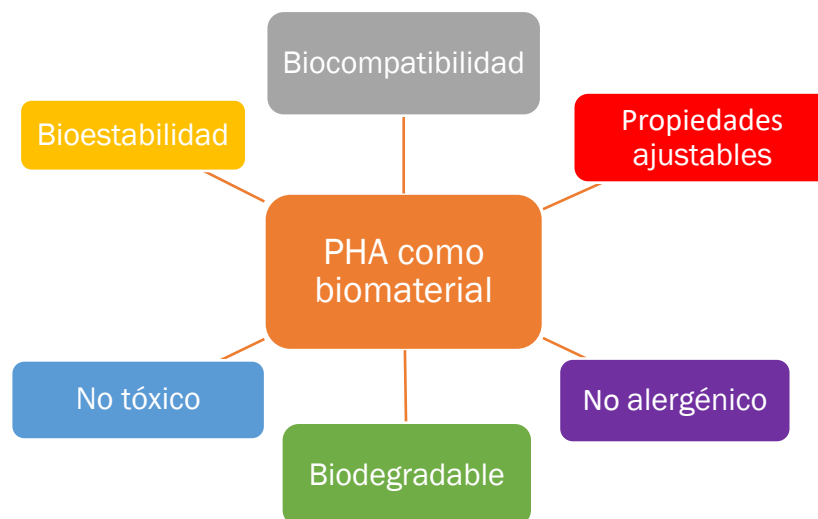


Figura 11: Propiedades de los PHAs cuando se utiliza como biomaterial.

Debido a la alta biocompatibilidad y las apropiadas propiedades mecánicas que poseen los PHA, pueden ser utilizados en el campo biomédico ya que son componentes no tóxicos ni alergénicos y disponen de un grado de degradación controlado (Figura 11). Las fibras electrohiladas de PHBV son utilizadas en la administración de fármacos o en la ingeniería de tejidos como en tejido óseo, tejidos de cartílago, tejido nervioso, tejidos cardiovasculares, cicatrización de heridas y tejidos de la piel o en ingeniería del tejido hepático.

Por otro lado, proporcionan soporte tridimensional para el crecimiento celular, degradándose posteriormente.

Al ser moléculas que presentan quiralidad, sirven como materia prima en la industria farmacéutica como precursores quirales para la síntesis de nuevas moléculas además de formar parte de una matriz que libera el fármaco de forma progresiva.

Propiedades como su baja difusividad del oxígeno y la resistencia al agua los hacen apropiados en aplicaciones en la industria del envasado y en la industria alimentaria, como en la fabricación de botellas para bebidas o aditivos y sustitutos de crema de leche respectivamente.

Además, forma parte de diversos materiales para pesca y construcción o, debido a su elevada resistencia al agua, puede ser utilizado como látex acuoso.

En la industria agrícola se utilizan en macetas biodegradables (con una degradación en torno a 120 días), tubos de irrigación, y matrices para la liberación de forma controlada de pesticidas y plaguicidas.

Forman parte de la industria de cosméticos y de cuidado de la piel ya que son capaces de absorber y retener aceites.

Por último, aunque sus aplicaciones se han centrado mayoritariamente en medicina y farmacia, se pueden utilizar como sensores piezoeléctricos que midan ensayos de materiales, detectores ultrasónicos o en medidas de presión de teclados, auriculares o micrófonos. (Álvarez Da Silva, 2016.)

1.3. Producción de PHA a partir de COVs

Una alternativa novedosa pero que ha sido muy poco estudiada consiste en la utilización de COVs como fuente de carbono para la producción de biopolímeros como PHAs. Esta alternativa ofrece la doble ventaja de utilizar un residuo para producir materiales de alto valor añadido abaratando así sus costes de producción. Los estudios preliminares sobre la viabilidad de la conversión bacteriana de hidrocarburos aromáticos en PHA fueron desarrollados por primera vez por (Tobin & O'Connor, 2005.), quienes demostraron la capacidad de la especie bacteriana *Pseudomonas*, en concreto las cepas *P. putida* S12 y CA-1, para degradar estireno y ácido fenilacético, contaminante ambiental e intermediario del metabolismo de estireno, respectivamente. Se obtuvo un nivel moderado de acumulación de mcl-PHA hasta el 14% para *P. putida* S12 y 8% para *P. putida* CA-1 con composiciones monoméricas variables. (Nikodinovic y col., 2008) evaluó la capacidad de degradación de *P. putida*, utilizando como única fuente de carbono benceno, tolueno, etilbenceno y p-xileno (BTEX), y su capacidad para acumular mcl-PHA a partir de sustratos individuales. El nivel más alto de PHA fue de 26% del peso seco celular y se obtuvo para *P. Putida* mt-2 con p-xileno como fuente de carbono. Por otro lado, se suministró una mezcla sintética de benceno, tolueno, etilbenceno, estireno y p-xileno a un cultivo mixto definido de *P. putida* F1, mt-2 y CA-3 logrando una acumulación de PHA hasta el 24% y 36% en matraces agitados y fermentador, respectivamente, demostrando un mejor rendimiento y mayores tasas de acumulación de PHA para un suministro de la fuente de carbono a través de la alimentación líquida en un fermentador.

Otro candidato prometedor para la conversión de desechos petroquímicos tóxicos en valiosos polímeros es *Pseudomonas fulva* TY16. *P. fulva* acumuló mcl-PHA, copoliéster que constaba principalmente de 3-hidroxidecanoato (55,2 %) y 3-hidroxi octanoato (26,8 %) con componentes menores de 3-hidroxi hexanoato (3,7 %), 3-hidroxidodecanoato (8,2 %) y 3-hidroxidodecanoato (6,1%), utilizando como fuente de carbono los compuestos BTE volátiles suministrados de forma continua. Alcanzó un contenido en mcl-PHA de 19,1%, 58,9% y 28,6% para benceno, tolueno y etilbenceno, respectivamente (Ni y col., 2010.). (Narancic y col., 2012.) lograron la acumulación de mcl-PHA, utilizando



tensoactivos para aumentar la biodisponibilidad de los PHA, para siete cepas de *Pseudomonas sp* (TN21, TN130, TN221, TN222, TN301, TN302 y TN321) utilizando como fuente de carbono hidrocarburos monoaromáticos (mezcla BTEX) o hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno, fenantreno, criseno, 1-etilnaftaleno, 2-metilnaftaleno y dimetilnaftaleno) donde *Pseudomonas sp* TN301 fue la cepa que mayor productividad de PHA presentó, $23 \pm 3\%$, utilizando naftaleno como fuente de carbono. Otros estudios han demostrado la capacidad de acumulación de PHA a partir de COVs con diferentes especies bacterianas, como (Hori y col., 2009) que utilizó la cepa *Rhodococcus aetherivorans* IAR1 logrando sintetizar poli (3-hidroxibutirato- co -3-hidroxivalerato) a partir de tolueno como única fuente de carbono, alcanzando una productividad de 35% en moles de 3HB y 65% en moles de 3HV.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos en los procesos de degradación de COVs mencionados anteriormente y acumulación simultánea de PHAs, es necesario todavía optimizar el proceso de producción en continuo y buscar nuevas cepas que alcancen altos rendimientos. El presente trabajo de fin de grado se centró en el estudio de degradación de COVs con la cepa *Rhodococcus opacus*, con la finalidad de producir PHB en condiciones limitantes de nitrógeno. se realizó un primer ensayo en batch con el fin de seleccionar el COV óptimo tanto a nivel de degradación como de producción de PHA. Una vez escogido el COV pertinente, siendo en este trabajo de fin de grado el tolueno, se sometió a un proceso en una sola etapa en continuo donde se llevó a cabo la degradación de tolueno y la producción de PHAs de forma simultánea.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



2. OBJETIVOS

El objetivo general que se plantea en este trabajo fin de grado es el estudio de degradación de diferentes compuestos orgánicos volátiles (COVs) y la producción de PHB empleando esos COVs como fuente de carbono. Se opera con un reactor de tanque agitado bajo condiciones limitantes de nitrógeno de forma que se favorezca la acumulación del biopolímero y con cepa *Rhodococcus opacus*.

El objetivo general se abordó mediante los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar la capacidad de degradación de los diferentes contaminantes: tolueno, etilbenceno, estireno y o-xileno en la cepa *R. opacus*.
- Evaluar la capacidad de producción de PHAs en dicha cepa bacteriana.
- Estudiar las condiciones óptimas de operación para la optimización del crecimiento y acumulación de PHAs por parte de la cepa utilizada.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para llevar a cabo los diferentes ensayos se ha empleado la cepa *Rhodococcus opacus* (DSM 43205) adquirida en la colección de cultivo Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Para el cultivo de *R. opaccus*, se empleó amonio como fuente de nitrógeno. La composición de las diferentes soluciones y los volúmenes empleados para obtener el medio mineral salino (MSM) se encuentran en la Tabla 7

Tabla 7: Composición del medio mineral

Solución I: Macronutrientes 10×

Na_2HPO_4	75,2 g L ⁻¹
KH_2PO_4	30 g L ⁻¹
NaCl	5 g L ⁻¹
NH_4Cl	5 g L ⁻¹

Solución II (20 mL L⁻¹)

Glucosa (20%)	200 g L ⁻¹
---------------	-----------------------

Solución III (1 mL L⁻¹)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M)	246,5 g L ⁻¹
--	-------------------------

Solución IV (0,3 mL L⁻¹)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1M)	147,7 g L ⁻¹
--	-------------------------

Solución V: Elementos traza (10 mL L⁻¹)

EDTA	5 g L ⁻¹
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,83 g L ⁻¹
ZnCl_2	0,168 g L ⁻¹
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,13 g L ⁻¹
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g L ⁻¹
HBO_3	0,01 g L ⁻¹
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0016 g L ⁻¹

Solución VI: Biotina (1 mL L⁻¹)

Biotina	1 g L ⁻¹
---------	---------------------

Solución VII: Tiamina (1 mL L⁻¹)

Tiamina

1 g L⁻¹

Para garantizar la esterilidad del medio mineral empleado, las soluciones I, II, III y IV se autoclavan a 121°C durante 20 min; por otro lado, las soluciones V, VI y VII se filtran con filtros estériles de 0,22 µm. Todas las sales empleadas para la elaboración del medio mineral fueron adquiridas en PanReac AppliChem (Barcelona).

A lo largo de la realización del experimento se utilizaron diferentes medios de cultivo, en función de la etapa de operación. Así, el medio completo contenía glucosa como fuente rica en carbono, mientras que el medio mineral incompleto no llevaba solución II. En función de la cantidad de N a añadir, se prepararon distintos MSM incompletos adicionando al volumen final cantidades variables de la solución I: MSM sin N (sin solución I); MSM-N 1× (100 mL L⁻¹), MSM-N 2× (200 mL L⁻¹) y MSM-N 4× (400 mL L⁻¹).

los contaminantes utilizados en la degradación fueron tolueno (C₇H₈, ≥99,5%), etilbenceno (C₈H₁₀, ≥99,8%), estireno (C₈H₈, ≥99%) y o-xileno (C₈H₁₀, ≥99%). (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU).

Para el análisis de PHB y la elaboración de sus patrones se utilizaron el copolímero PHB-PHV (88%PHB-12%PHV), 1-propanol (C₃H₈O, 99,7%), ácido benzoico (C₇H₆O₂, ≥99,5%), ácido clorhídrico (HCl, 37% w/v) y cloroformo (CHCl₃, ≥99%) adquiridos en PanReac AppliChem (Barcelona).

3.2. Métodos**3.2.1. Preparación de inóculo**

Se preparó el inóculo, bajo condiciones estériles, a partir de un cultivo crecido de *R. opacus* almacenado a 4°C y se adicionan 20 mL a 200 mL de medio mineral completo (Tabla 7) en botellas serológicas de 1,2 L, con un volumen de 1 L de espacio de cabeza formado por aire. El cultivo fue incubado durante aproximadamente 3 días con una agitación de 200 rpm (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) a una temperatura de 25 °C.

3.2.2. Procedimiento experimental

Ensayos de degradación en batch

Se realizaron varios ensayos para determinar la capacidad de la cepa para degradar los contaminantes y acumular PHAs empleándose botellas serológicas de 1,2 L, con un volumen de 1 L de espacio de cabeza formado por aire y el contaminante correspondiente en cada experimento. Para cada contaminante, se prepararon 2 botellas de inóculo con una concentración de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de *R. opacus* con MSM incompleto $1\times$ (Tabla 7), llevándose a un volumen final de 200 mL. Además, se preparó un control negativo sin inocular. Para todos los ensayos, se adicionó $4,5 \mu\text{L}$ del contaminante correspondiente (tolueno, etilbenceno, estireno y o-xileno) en fase líquida, equivalente a una concentración 4 mg m^{-3} en el espacio de cabezas. Además, se llevó a cabo un quinto test adicionando una mezcla de tolueno, etilbenceno y o-xileno ($1,5 \mu\text{L}$ de cada uno de ellos). Se trabajó en las condiciones óptimas de crecimiento de *R. opaccus* con una velocidad de agitación de 200 rpm y una temperatura de 25°C .

Se midieron diariamente las concentraciones de los contaminantes en la fase gas para comprobar su degradación, añadiendo de nuevo el contaminante correspondiente una vez consumido por completo. Después de 5 ciclos de consumo se procedió a lavar la biomasa previamente centrifugada con medio incompleto sin nitrógeno (Tabla 7), se adicionó el contaminante en la fase gas y se analizó el consumo del contaminante en ausencia de N en el medio de cultivo. Esto genera una situación de estrés bacteriano provocada por la ausencia de nitrógeno, y promueve la producción de PHB por *R. opaccus* como sustancia de reserva.

Además del seguimiento de la fase gas, se realizó una monitorización diaria de sólidos suspendidos totales (2 mL, midiendo su densidad óptica a 650 nm), y de la concentración de carbono orgánico total y nitrógeno total disuelto (TOC/TN~15 mL) tanto al inicio como al final de cada test. Una vez limitado el caldo de cultivo en N se extrajeron diariamente ~10 mL por botella, para realizar el análisis de PHAs (duplicados de 8 mL).

Operación en continuo

El sistema utilizado fue un quimiostato cuya función fue el crecimiento de la biomasa además de la degradación de uno de los componentes de la fracción BTEXS y la acumulación de PHB.

El quimiostato empleado fue el biorreactor Biostat ® A (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania), se trata de un reactor automatizado formado por un

vaso de cultivo de vidrio de una sola pared de 2,5 L de volumen útil y una torre de control con tres bombas peristálticas y diferentes sensores que permitían un control continuo de pH y temperatura. Equipado con un agitador de flujo radial acoplado en la parte superior, fue operado a 300 rpm para conseguir una mezcla completa y favorecer la transferencia de materia gas-líquido. La parte superior del quimiostato dispone de 3 conexiones a tuberías que fueron destinadas a la toma de muestra, a la entrada de la solución reguladora de pH (NaOH, 4M) y a la entrada de medio fresco. Además, dispone de conexiones de entrada y salida de la corriente de gas, sensor de pH, y de temperatura. Para mantener en su interior una temperatura constante se dispuso de una camisa térmica.

El ensayo se llevó a cabo con un volumen de trabajo de 2 L, una temperatura constante de 25°C y un pH de 7.

La corriente de entrada consiste en una corriente de aire comprimido, con un caudal de 200 mL min⁻¹ regulado mediante un rotámetro, en la que se inyecta tolueno en fase líquida suministrado mediante una bomba de jeringa a una velocidad de 0,05 mL min⁻¹ para alcanzar una concentración de 4 g m⁻³. La corriente resultante se lleva a una cámara de mezcla para favorecer la homogeneización y se burbujea de forma continua a través de un difusor de acero inoxidable con un tamaño de poro de 2 µm (Supelco, EE. UU.) situado en el fondo del reactor con un tiempo de residencia de 30 s.

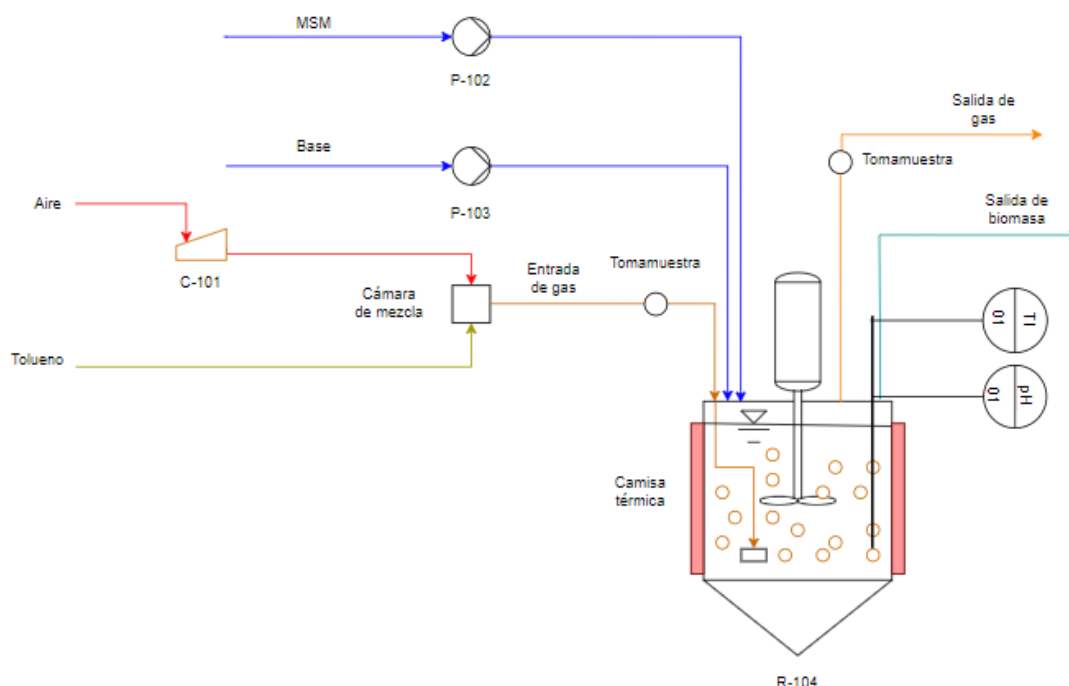


Figura 12: Diagrama de flujo sistema experimental

En la Figura 12 se muestra el diagrama de flujo del sistema experimental donde se pueden identificar un compresor (C-101) que comprime el aire hasta la cámara de mezcla, dos bombas peristálticas (P-102 y P-103) que impulsan el medio mineral fresco y la base cuya función es ajustar el pH del medio y un reactor de tanque agitado (R-104), donde se lleva a cabo el ensayo.



Figura 13: Sistema experimental del ensayo 2

Este segundo ensayo se inició con una etapa de aclimatación en el Biostat previa a la operación en continuo seguido de diferentes etapas con diversas condiciones de operación que se describen a continuación. El biorreactor fue inoculado con *R. opacus* en una concentración de $0,24 \text{ g L}^{-1}$ bajo condiciones estériles con un medio MSM-N (1x) (Tabla 7), alcanzando un volumen final de 2 L.

- Etapa 1 (días 0-15)

El ensayo comenzó con una etapa de aclimatación del sistema, con una duración de 15 días, partiendo de las condiciones de operación mencionadas anteriormente y en la que se trabajó para concentrar la biomasa hasta 4 g L^{-1} . Los días 3, 6 y 8 de operación se centrifugó 500 mL del caldo de cultivo y se resuspendió en medio incompleto sin N (Tabla 7) para reducir la concentración de TOC en el medio.

- Etapa 2 (días 16-39)

Una vez consumido nitrógeno de forma completa por el sistema el día 16 se inició la segunda etapa del ensayo con una duración de 23 días. En esta etapa el N era adicionado al sistema de acuerdo con los requerimientos del mismo,

dejando a continuación una fase de acumulación sin N. Durante los primeros 9 días de esta etapa se adicionaron 200 mL de medio MSM-N (1x) (Tabla 7), correspondiente a 100 mg de N aumentándose esta cantidad a 500 mL de medio mineral incompleto 10 veces concentrado en nitrógeno equivalente a 2,5 g de nitrógeno en los siguientes 14 días de operación en vista de la elevada velocidad de consumo que presentó el sistema. Cabe destacar que en la etapa presente y en las siguientes, el volumen adicionado al sistema es previamente retirado, con el fin de mantener un volumen constante de 2 L.

Debido a un error experimental, cometido el día 32, en el que se adicionó 2 g de nitrógeno al sistema sin el previo consumo, se procedió a centrifugar 500 mL de biomasa y resuspender en medio MSM-N (1x) (Tabla 9) con la finalidad de recuperar la concentración de nitrógeno en el medio antes del error.

- Etapa 3 (días 40-62)

En la tercera etapa, se iniciaron los ciclos de adición-limitación de N. Durante los 6 primeros días se operó con ciclos 24h:24h, adicionando 200 mL de medio fresco MSM-N (1x) de forma continua durante 24 h, con un caudal de 0,14 mL min⁻¹, para posteriormente parar la alimentación y dejar limitado el sistema durante 24 h. A partir del día 46, se modificó la duración de los ciclos a 24h:48h, es decir, aumentando la fase de limitación a 48h. de nuevo, se resuspendió la biomasa, previamente decantada, en medio incompleto sin N (Tabla 7) (día 45), evitando de esta manera la acumulación de biomasa muerta o metabolitos secundarios.

- Etapa 4 (días 63-87)

A partir del día 62 se observó un notable crecimiento de biomasa y, con ello, un aumento en la velocidad de consumo de nitrógeno por lo que, durante los siguientes 24 días, se aumentó de nuevo la concentración de nitrógeno en el medio mineral fresco, alimentando al sistema con 200 mL de medio MSM-N (4x) el primer día y dejando la biomasa limitada durante 72 horas.

Se determinaron las concentraciones de tolueno tanto en la entrada como en la salida y el CO₂ generado, así como el caudal de salida y la caída de presión en el sistema. Se llevó a cabo la monitorización diaria de pH, análisis de PHAs por triplicado y sólidos suspendidos totales, junto con el análisis de la concentración de carbono orgánico total y nitrógeno total disuelto y de aniones (Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻).

3.2.3. Métodos analíticos

La evolución de la concentración de contaminantes se llevó a cabo mediante cromatografía de gases de un cromatógrafo GC-FID Agilent 8860, equipado con un detector de ionización de llama. Las temperaturas empleadas en el inyector, horno y detector fueron 150°C, 70°C y 250°C, respectivamente empleando helio (He) como gas portador a una velocidad de 2 mL min⁻¹. La inyección de las muestras se llevó a cabo con una jeringa de gases de 250 µL. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Por otro lado, el análisis de CO₂ se realizó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Bruker 430 GC-TCD con un detector de conductividad térmica (TCD). Las temperaturas empleadas en el inyector, horno y detector fueron 150°C, 45°C y 200°C, respectivamente, empleando helio (He) como gas portador con una velocidad de 13,7 mL min⁻¹. La inyección de las muestras gaseosas se realizó con una jeringa de gases de 100 µL.

La medida de caudal se llevó a cabo mediante el desplazamiento de volumen de líquido, empleando una probeta de 250 mL cronometrando durante 30 segundos el caudal de salida, mientras que la caída de presión de entrada fue monitoreada mediante un sensor de presión digital PN7097.

El pH se analizó empleando un pH-metro Basic 20 pH. La evolución del crecimiento de la biomasa se llevó a cabo por la medición de densidad óptica en los ensayos en batch con un espectrofotómetro UVmini-1240, midiendo a 650 nm y empleando como blanco el medio mineral utilizado. En el ensayo en continuo se analizó la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) mediante el método estándar (APHA, 2018) donde las muestras fueron filtradas a vacío, secando posteriormente el filtro en una estufa a 50°C durante aproximadamente 24 h; tras enfriarse a temperatura ambiente en un desecador, fueron pesadas para determinar la cantidad de sólidos suspendidos por la diferencia de masa del filtro antes y después del proceso. La medida de aniones de interés fue llevada a cabo mediante cromatografía líquida de intercambio iónico (HPLC-IC) con un detector de conductividad, siendo previamente filtradas las muestras con filtros de nylon de 0,22 µm. Por otro lado, el nitrógeno total (TN) y el carbono orgánico total (TOC) disueltos en el caldo de cultivo fueron diariamente monitoreados con el equipo TOC-L_{CSH/CSN} acoplado a la unidad TNM-1, siendo previamente filtradas las muestras con filtros de 0,45 µm.

Para realizar la extracción y análisis de PHB se siguió el protocolo descrito en (Pérez et al., 2019) y modificado en el laboratorio, que consistió en una propanólisis ácida con HCl que posteriormente fue medida en un cromatógrafo de gases Agilent 7820A (GC) acoplado a un espectrómetro de masas 5977E

(MS) que se encuentra equipado con la columna DB-WAX. En tubos Eppendorfs de 2 mL se centrifugaron diariamente las muestras del sistema durante 5 min a 13 400 rpm. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis. Se sometieron a digestión con las soluciones 1- propanol y HCl en proporción 80:20 % v/v y ácido benzoico en 1-propanol, que fue empleada como patrón interno. Se adicionó 1 mL de 1-propanol y HCl en cada tubo Eppendorf y se traspasó la suspensión resultante en tubos HATCH. Tras ello, se añadió 2 mL de CH₃Cl y 10 µL de patrón interno en cada tubo. Las muestras y los patrones se digirieron llevada a cabo en un termo-reactor a 100 °C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo y enfriadas las muestras a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de agua tipo I en cada tubo y se vortearon. Transcurrido 5-10 min en reposo se formaron dos fases, se extrajo la fase orgánica y se filtró en los viales del GC-MS con filtros de 0,22 µm. El análisis en GC-MC se realizó mediante la inyección de 1 µL de muestra en el equipo, encontrándose el inyector a 250 °C La temperatura inicial del horno fue de 40°C, que se mantenía durante cinco minutos para después iniciarse la rampa de temperatura a una velocidad de 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 200°C. Esta temperatura se mantuvo durante 2 min para después llevar a cabo un último incremento de temperatura hasta los 240°C a una velocidad de 5°C min⁻¹.

Se analizaron muestras del medio de cultivo tomadas el día 70 en microscopía electrónica en el equipo TEM JEOL JEM-1011 HR, microscopio TEM de 100 kV con filamento de magnesio y Cámara CCD Gatan ES1000W de 4000x2672 pixeles en el puerto de 35mm para un campo de visión muy amplio. Para preparar las muestras que fueron observadas en el microscopio, se introdujeron las rejillas donde se colocó la muestra en el equipo SOLARUS model 950 Advanced Plasma System de GATAN con el fin de eliminar las impurezas que pudieran contener las rejillas. Posteriormente, se aplicaron 20 µL de muestra del sobrenadante en un eppendorf sobre una rejilla (grid) de cobre de 300 Mesh, Carbon Film y, por último, se dejó secar sobre un papel de filtro observando posteriormente en el TEM.

3.2.4. Cálculos

La capacidad de eliminación del sistema se determinó a través del cociente de la diferencia de concentración del contaminante (g m^{-3}) a la entrada $[C_7H_8]_{in}$ y a la salida $[C_7H_8]_{out}$ del sistema entre el volumen del reactor ($V_{reactor}$, m^3), todo ello multiplicado por el caudal de operación del gas (Q_{gas} , $\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$).

$$EC \left(\frac{\text{g } C_7H_8}{\text{m}^3 \cdot \text{h}} \right) = \frac{[C_7H_8]_{in} - [C_7H_8]_{out}}{V_{reactor}} \cdot Q_{gas} \quad \text{Ec. 1}$$

Las mismas concentraciones permiten el cálculo de la eficacia de eliminación del sistema.

$$RE(\%) = \frac{[C_7H_8]_{in} - [C_7H_8]_{out}}{[C_7H_8]_{in}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Para conocer el porcentaje de PHB acumulado presente en el sistema se calcula mediante la Ec. 3 donde V muestra es el volumen de muestra empleados para el análisis. $[Biomasa]$ representa la concentración de biomasa expresada como g SSV L^{-1} y $g \text{ PHB}$ representa la masa de PHB en la muestra.

$$PHB \text{ acumulado } (\%) = \frac{g \text{ PHB}}{V_{muestra} \cdot [Biomasa]} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3}$$



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos de degradación en batch

El presente ensayo se operó en dos etapas diferenciadas. En la primera de ellas, se realizó un seguimiento de la capacidad de eliminación de componentes orgánicos volátiles. Una vez completada la fase de degradación, se limitó el sistema en nitrógeno dando lugar a la segunda etapa en la que se analizó la producción de PHB para cada componente. Los experimentos se realizaron por duplicado con tolueno, etilbenceno, estireno, xileno y una mezcla de los tres primeros en la misma proporción.

4.1.1. Eficacia de eliminación de VOCs

Para comprobar la capacidad de eliminación mencionada y adaptar la cepa al contaminante se realizaron 5 ciclos de consumo.

- Tolueno

En el caso del tolueno, se muestran los resultados de dos experimentos similares realizados con este contaminante, el primero de ellos partiendo de una concentración inicial de biomasa de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, mientras que en el segundo se inoculó con $0,22 \text{ g L}^{-1}$ (esta concentración fue utilizada para los demás contaminantes). En el primero de ellos (Figura 14) de 10 días de duración, se observó que tras 1 día en fase de latencia en el que no hubo consumo de tolueno, se dio comienzo la fase exponencial alcanzando un rendimiento de degradación del 100% prácticamente de forma diaria. En el segundo experimento, comenzó la fase exponencial tras 1 día de operación, obteniéndose velocidades de consumo similares al experimento anterior. Cabe destacar, que al finalizar la etapa el tolueno se degradó de forma más lenta, suceso que pudo darse debido a que, al retirarse biomasa para su análisis, la concentración celular se redujo. En la Figura 14 se puede observar en el último día de etapa (día 10) un consumo completo de tolueno de la botella 1 y un consumo nulo de la botella 2. Esto último pudo deberse a un error experimental de medida, ya que la concentración de tolueno en la botella 2 el día 10 es mayor que en día 9 sin haber adicionado. No obstante, el experimento continuó para ambas botellas.

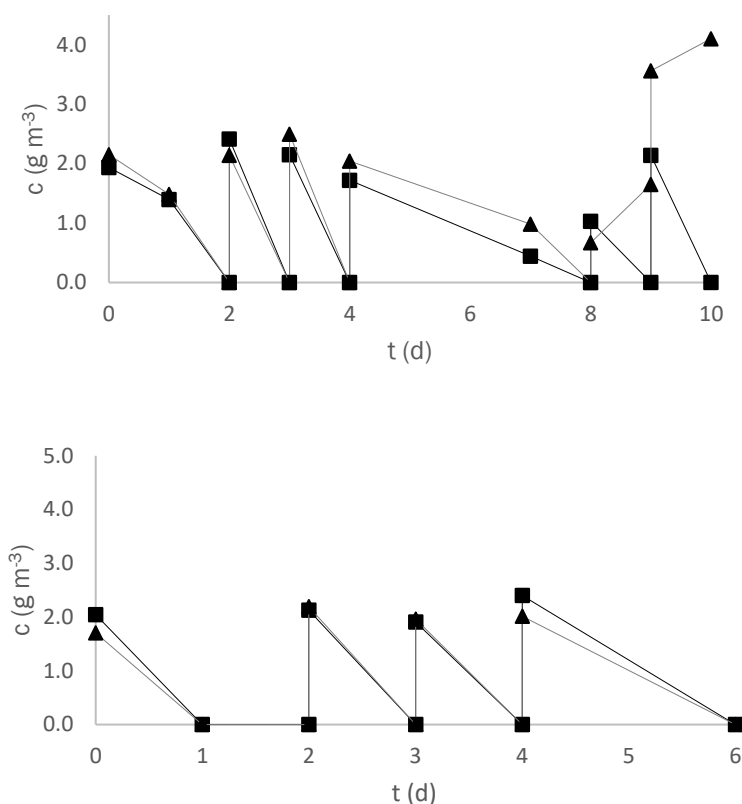


Figura 14: Evolución de consumo de tolueno en los ensayos en batch inoculados con (A) 0,5 g L⁻¹ y (B) 0,22 g L⁻¹ de biomasa (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

A lo largo de la operación en batch se demostró una elevada eficacia de eliminación de tolueno a baja concentración. Experimentos previos ya habían demostrado la capacidad de diferentes microorganismos para eliminar este contaminante. Por ejemplo, mediante un consorcio microbiano mixto, (Maliyekkal y col., 2004) obtuvo una elevada eficacia de eliminación para reducidas concentraciones de tolueno. Se puede por tanto afirmar que el tolueno a reducidas concentraciones en la fase gas puede ser degradado por diversos microorganismos con diferentes estrategias de operación.

- Etilbenceno

El experimento utilizando etilbenceno como fuente de carbono tuvo una duración de 19 días para la botella 1 y de 16 días para la botella 2, comenzando la fase exponencial de degradación en el día 5 para ambas botellas. Se puede observar una degradación más lenta en comparación con el tolueno, además de requerir un tiempo mayor para alcanzar la fase exponencial para unas mismas condiciones de partida del experimento. Otros autores han comparado la capacidad de eliminación de etilbenceno y tolueno en lechos fijos, observando un rendimiento de eliminación de etilbenceno superior a tolueno,

(Gallastegui y col., 2017), lo que podría indicar que la capacidad de eliminación podría estar relacionada con el microorganismo utilizado o la estrategia de operación. En cualquier caso, *R. opacus* demostró ser capaz de degradar este contaminante durante cinco ciclos completos.

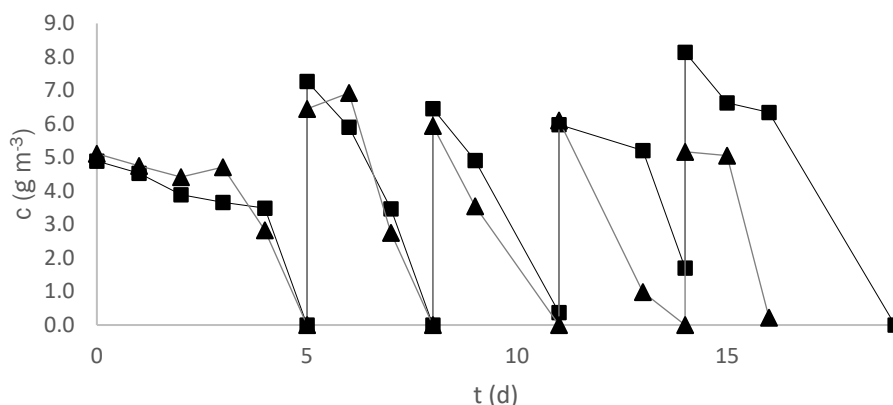


Figura 15: Evolución de consumo de etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

- Estireno

El estireno, alcanzó los cinco ciclos de consumo en un periodo de 15 días con un comienzo de la fase exponencial en el día 5, en el que se pudo observar un rendimiento de eliminación fue prácticamente completo en los cinco ciclos de degradación, cifra similar a la obtenida por (Jang y col., 2004) en la que logró una degradación de un 90% de estireno en 53 h con la cepa *Pseudomonas sp. SR-5* cuyo cultivo líquido contenía 1% (v/v) de estireno.

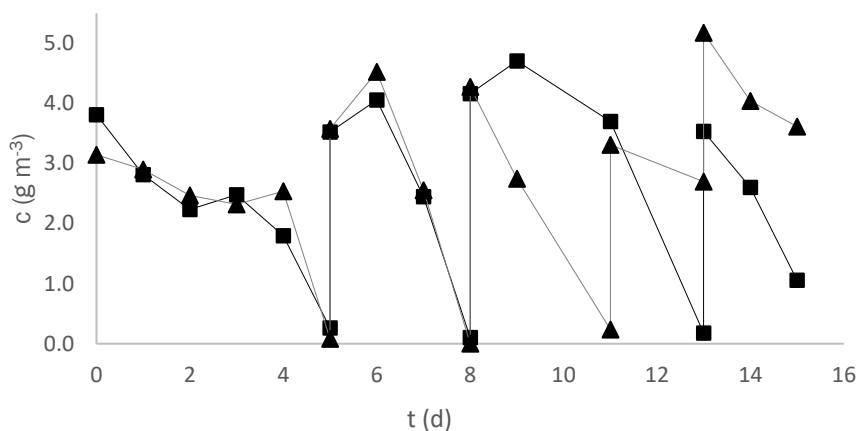


Figura 16: Evolución de consumo de estireno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

- O-xileno

El estudio de degradación de o-xileno concluyó a los 12 días, en las mismas condiciones de partida que los experimentos anteriores. Sin embargo, en este caso, no se observó degradación del contaminante por parte de *R. opacus*, por lo que se descartó como fuente de carbono para los siguientes experimentos. Si bien no existen estudios previos sobre la capacidad de esta cepa para degradar xileno, (Zhang y col., 2013) realizó un estudio de degradación de la fracción BTEX en el que se pudo eliminar un 82% del o-xileno agregado en un periodo de 36 a 42 h para la cepa *Mycobacterium cosmeticum* byf-4, disminuyendo su rendimiento de eliminación para mezclas binarias o ternarias tolueno, benceno, etilbenceno y o-xileno. Cabe destacar que al principio del experimento se observa una ligera disminución de la concentración de xileno. Es posible que la degradación del mismo genere algún compuesto intermediario cuya acumulación en el medio de cultivo resulte tóxica para los microorganismos, interrumpiendo así la actividad biológica.

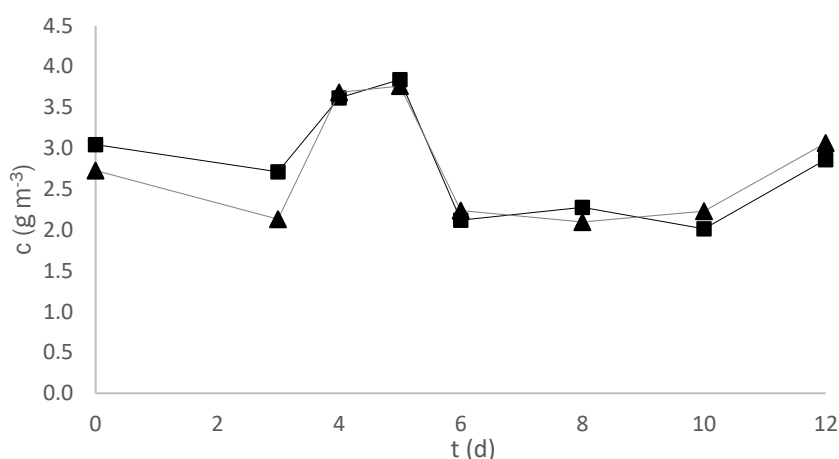


Figura 17: Evolución de consumo de o-xileno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

- Mezcla Tolueno, Etilbenceno y Estireno

Se realizó un estudio de degradación para la mezcla TES que abarcó 19 días en el que se pudo observar una elevada velocidad de consumo de los contaminantes para ambas botellas. Cabe destacar que el presente experimento no se pudo validar y someterlo a la segunda fase debido a un error experimental, al inocular una mayor concentración de contaminante en el último ciclo de consumo (día 11) que inhibió la actividad biológica. Por otro lado, a diferencia de los experimentos realizados con un solo compuesto, en el que se completaba el ciclo a diferentes tiempos dependiendo del componente a degradar, en el caso de la mezcla ternaria los tres componentes completan

el primer ciclo de consumo de forma simultánea en el día 4, degradándose a velocidades similares, por lo que se podría asumir que no existe preferencia por *R. opacus* a la hora de degradar la mezcla ternaria presente, y que la presencia de otros contaminantes no afecta la capacidad de degradación de ninguno de ellos. Sin embargo, (Shim & Yang, 1999) realizó un estudio de degradación para una mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y o-xileno mediante un cultivo mixto de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*, en el que se observa una clara preferencia por el tolueno. Esta notable diferencia de resultados puede estar debida al tipo de cultivo microbiano o a las condiciones de operación establecidas, concretamente la concentración inicial de contaminantes.

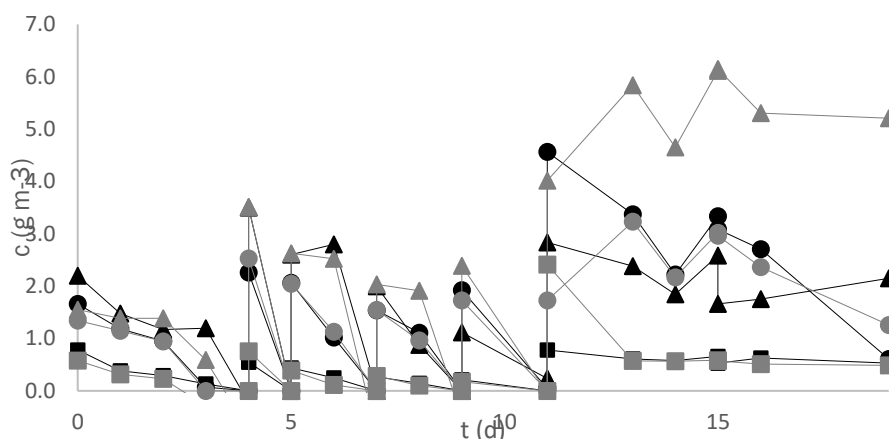


Figura 18: Evolución de consumo de tolueno (■), etilbenceno (▲) y estireno (●) (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

4.1.2. Productividad de PHB

Una vez se completaron 5 ciclos de consumo de contaminante se realizó de nuevo un seguimiento de consumo además del análisis del porcentaje de PHB producido en condiciones limitantes en nitrógeno.

- Tolueno

En el primer experimento con tolueno (concentración inicial de biomasa de $0,5 \text{ g L}^{-1}$) la capacidad de eliminación, una vez limitado el sistema en nitrógeno, se mantuvo constante hasta el día 18 en el que descendió hasta un valor de 4,3% en la botella 1 y de 6,7% en la botella 2. Este resultado pudo estar relacionado con la acumulación de algún metabolito tóxico, por lo que se concluyó el experimento.

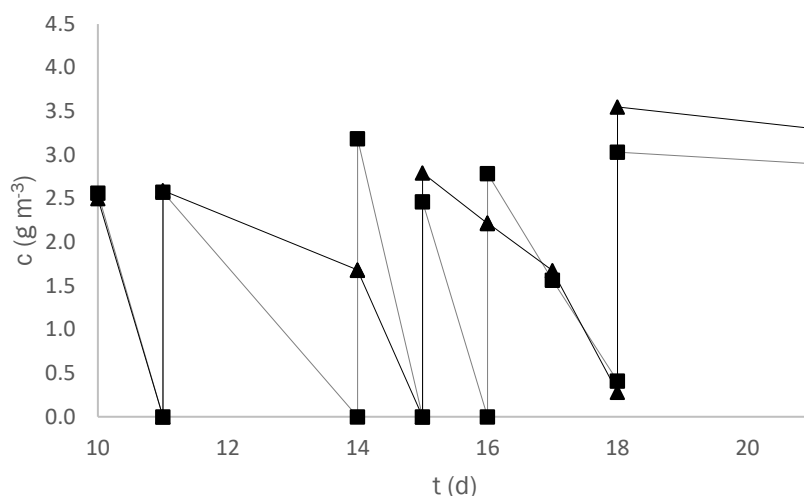


Figura 19: Evolución de consumo de tolueno en el experimento 1 inoculado con 0,5 gL⁻¹ de biomasa (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

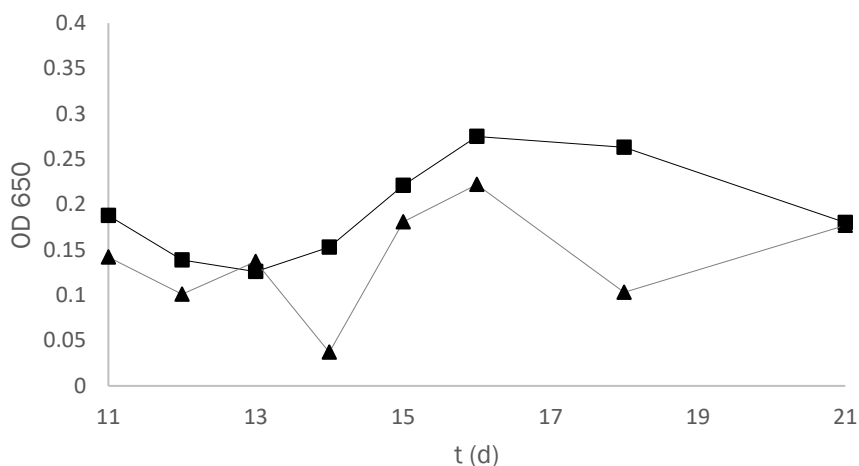


Figura 20: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

En el segundo experimento de tolueno se operó de forma idéntica, sin embargo, en este caso se pudieron completar todos los ciclos de consumo, sin observar inhibición de degradación. Una vez alcanzados los cinco ciclos de consumo de tolueno, se limitó el sistema en nitrógeno y de nuevo se realizó un seguimiento de consumo manteniéndose en condiciones limitantes durante 11 días. En ese periodo se tomaron muestras diariamente de las botellas para posteriormente analizar el porcentaje de PHB.

En la Figura 21 se puede observar un consumo prácticamente diario para ambas botellas. Por otro lado, la densidad óptica (Figura 22) fue decreciendo a

lo largo del tiempo y fue lo que marcó el final del experimento debido a la posible entrada en fase de muerte de la biomasa.

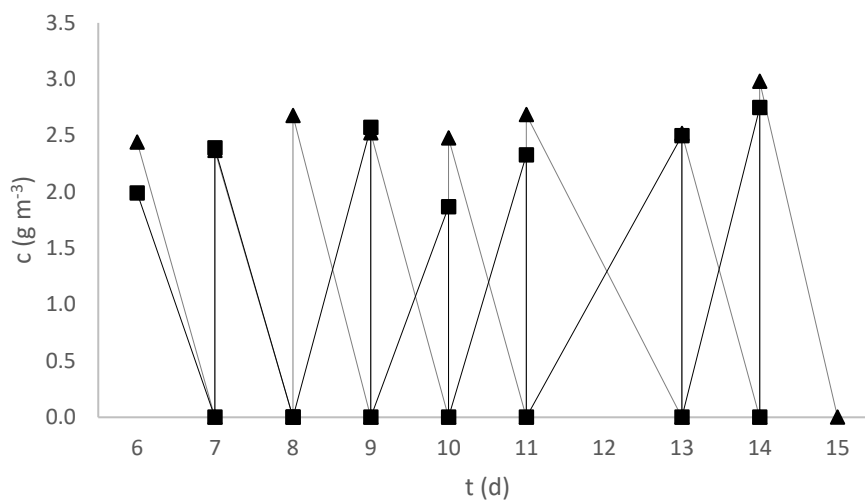


Figura 21: Evolución de consumo de tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

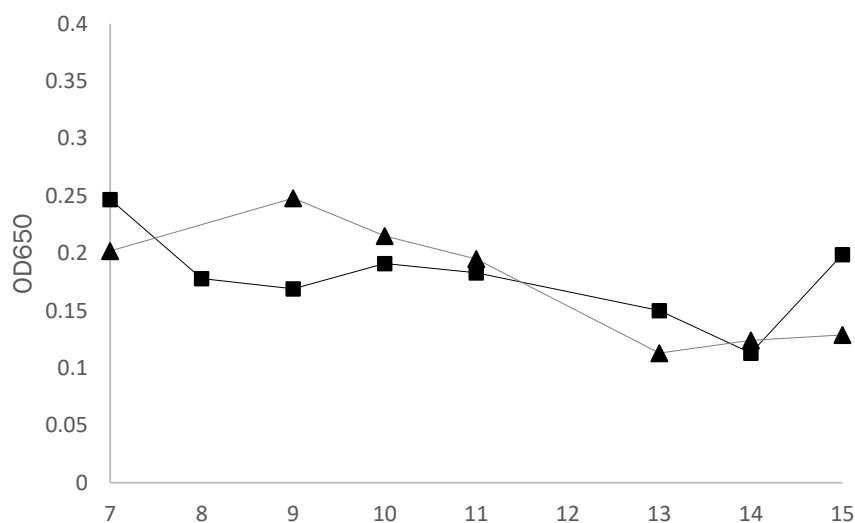


Figura 22: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con tolueno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

Se analizaron muestras de PHB obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 8)

Tabla 8: Evolución del %PHB producido en función de la concentración celular

Día	SST (g L ⁻¹)	%PHB
0	0,08	6,5
2	0,06	1,9
3	0,06	1,8
4	0,06	1,5
7	0,04	11,3

Las bajas producciones de PHB indican la necesidad de mayor tiempo de limitación en nitrógeno, además de un mayor suministro de fuente de carbono. Sin embargo, (Khanna & Srivastava, 2006) realizaron un estudio de producción de PHB con *Ralstonia eutropha* WSH3 en cultivos en dos etapas aportando ácido acético como fuente de carbono y limitados en nitrógeno, donde se logró acumular hasta 47,6 g L⁻¹ de PHB durante el periodo de cultivo en la segunda etapa del ensayo.

- Etilbenceno

Tras verificar la capacidad de degradación de etilbenceno en un medio rico en nitrógeno, el sistema se limitó en nitrógeno y se realizó un seguimiento tanto de la capacidad de degradación de etilbenceno en condiciones de limitación de N como la evolución de la densidad óptica y, con ello, la concentración celular presente en el sistema a lo largo del tiempo. Ambas botellas mantienen su rendimiento de eliminación constante, hasta los días 22 y 23 para la botella 1 y 2, respectivamente (Figura 23). A partir de los días mencionados, *R. opacus* consume de forma completa el etilbenceno en un menor periodo de tiempo, incremento que pudo corresponder al aumento del valor de la densidad óptica de cada botella y, con ello, la concentración celular presentes en las mismas. (Figura 24) (en la botella 2 se cometió un error experimental al medir la densidad óptica por lo que se desconocen sus valores los días 25 y 26). Además, aunque no se observó acumulación de PHB durante los primeros días de experimento, el día 25 se obtuvo un porcentaje de PHV de 12,6%.

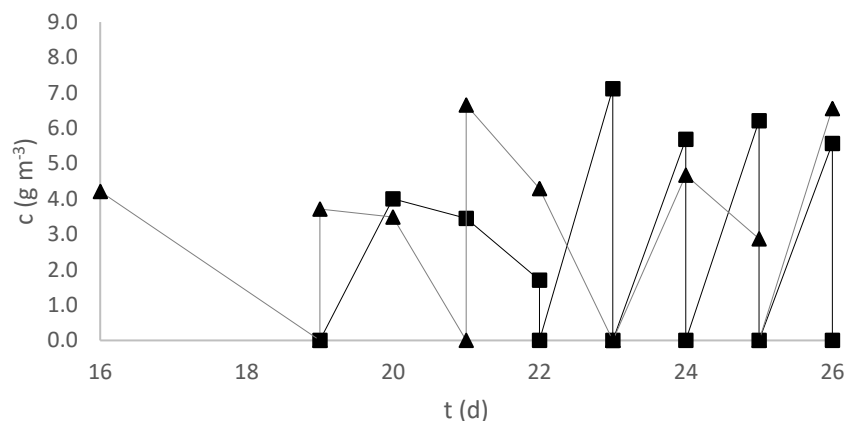


Figura 23: Evolución de consumo de etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

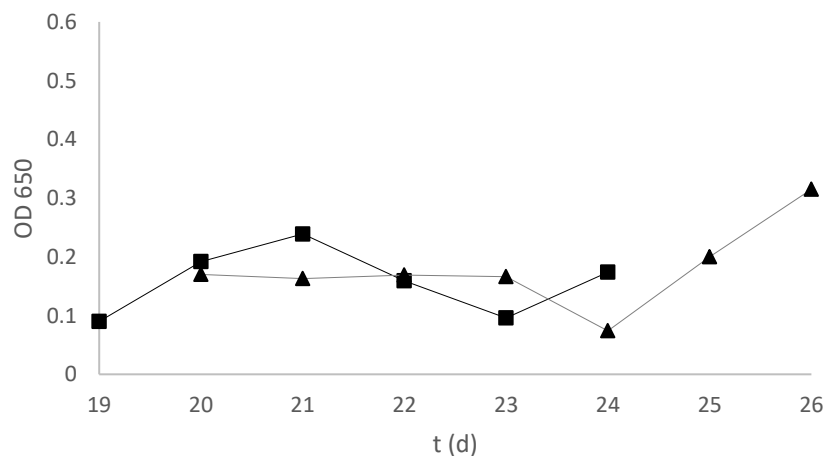


Figura 24: Evolución de la densidad óptica celular para experimento con etilbenceno (línea negra botella 1; línea gris botella 2)

- Estireno

El experimento comenzó con dos botellas en las que se añadió estireno empleando inóculo y medio de cultivo en idénticas proporciones a los experimentos anteriores. Tras completar 5 ciclos de consumo, se limitó el sistema en nitrógeno, no observándose acumulación de PHB a lo largo del experimento. Sin embargo, (Ward y col., 2005) realizó un experimento utilizando estireno como fuente de carbono con la cepa *Pseudomonas putida*CA-3 suministrando una concentración límite de nitrógeno donde se logró una degradación total y una alta acumulación de PHA. Esta discrepancia puede estar debida a las condiciones de operación establecidas en el experimento o la cepa utilizada.

4.2. Operación en continuo

Tras realizar el ensayo en batch se llegó a la conclusión que el tolueno es la fuente de carbono más óptima para operar en continuo debido a que fue el componente que mejor rendimiento de eliminación y producción de PHB obtuvo. Se muestran a continuación los resultados de operación del reactor de tanque agitado alimentado en continuo con tolueno durante 86 días de operación.

4.2.1. Eficacia de eliminación, concentración de sólidos y nitrógeno total

- Etapa 1: Aclimatación del sistema

Una vez se inoculó la cepa *R. opacus* en con una concentración en nitrógeno de 100 mg L^{-1} se llevó a cabo una etapa de aclimatación del sistema, operando con un volumen útil de 2 L, una temperatura de 25°C y un pH constante de 7. La etapa de aclimatación consistió en someter a la biomasa a consumo de tolueno, que actúa como fuente de carbono, realizando un seguimiento de la capacidad de eliminación de tolueno y el consumo de nitrógeno además de seguir la evolución de la concentración de biomasa en el sistema.

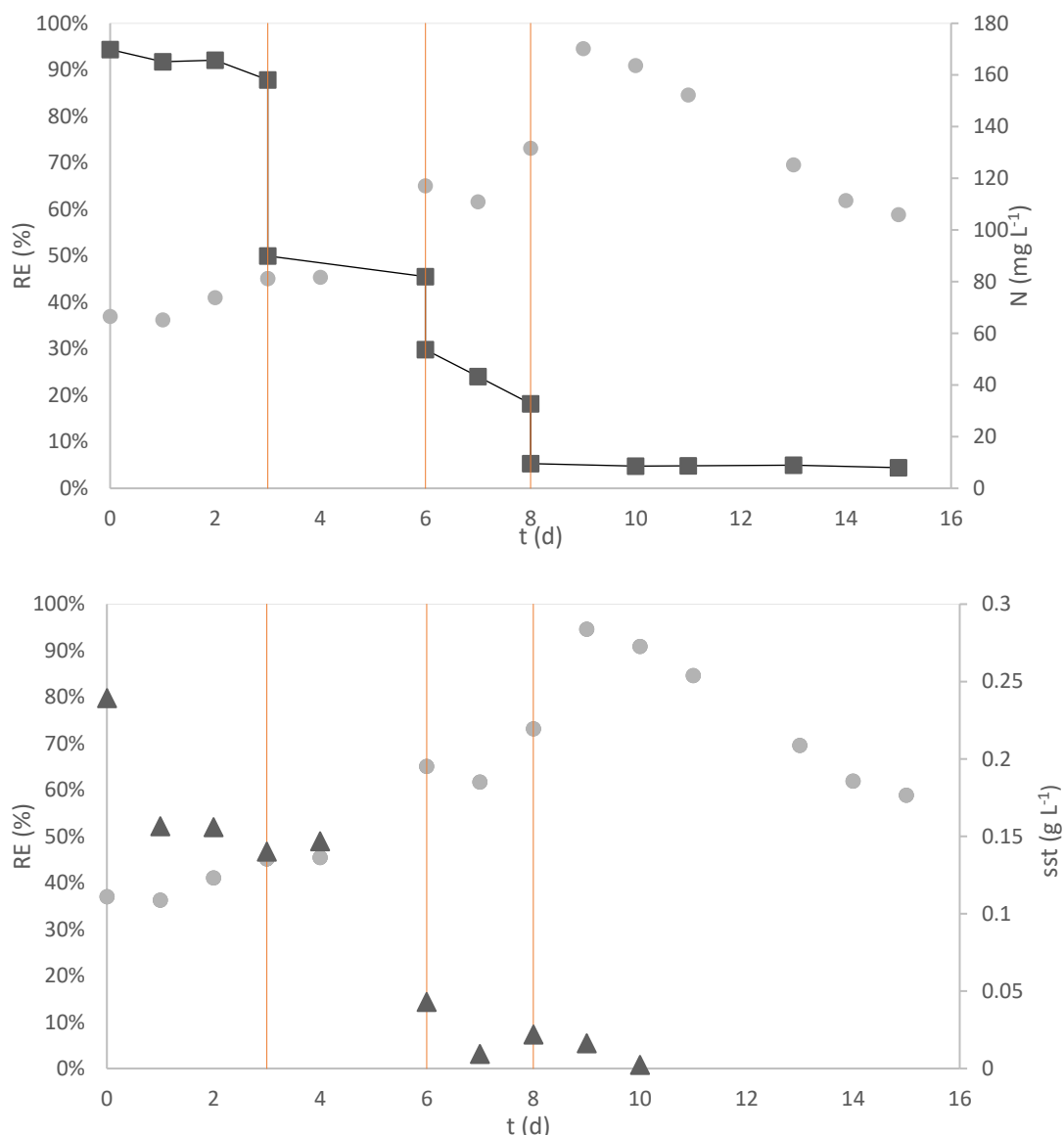


Figura 25: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 1. Las líneas verticales representan los intercambios de medio del reactor

La etapa dio comienzo con una concentración celular de $0,24 \text{ g L}^{-1}$ y 170 mg L^{-1} de nitrógeno, variable que, junto con la fuente de carbono suministrada a una concentración de 4 g m^{-3} , permitió el crecimiento celular. Durante los primeros días se observó un consumo de nitrógeno y una eficiencia de eliminación de 40% de tolueno. sin embargo, la concentración de SST fue disminuyendo de forma progresiva hasta un valor de $0,22 \text{ g L}^{-1}$ el día 10 (Figura 25). Para comprobar la acumulación de metabolitos secundarios y de materia celular muerta, se llevó a cabo un seguimiento del carbono orgánico presente en el

medio de cultivo. A lo largo de la etapa, la concentración de carbono orgánico aumentó desde $41,5 \text{ mg L}^{-1}$ hasta un valor de $70,2 \text{ mg L}^{-1}$ en los días 1 y 11, respectivamente, mientras que la concentración celular fue disminuyendo a lo largo del tiempo, por lo que, al no suministrar nitrógeno y no permitir crecimiento celular, no se realizaron más medidas durante esta primera etapa. Cabe destacar que el valor de la concentración celular en esta etapa se obtuvo mediante el análisis de densidad óptica del medio de cultivo, lo que conlleva un importante error experimental debido al crecimiento agregado de la biomasa. Para promover el crecimiento celular, en los días 3, 6 y 8 parte de la biomasa, fue decantada y resuspendida, en medio fresco sin aporte de nitrógeno, con la finalidad de no influir en el seguimiento de consumo de nitrógeno y así eliminar biomasa muerta y metabolitos secundarios presentes en el sistema.

La concentración de nitrógeno partió de un valor de $169,9 \text{ mg L}^{-1}$ descendiendo progresivamente hasta un valor de $9,6 \text{ mg L}^{-1}$ en el día 9, por lo que el sistema permaneció limitado en nitrógeno hasta la finalización de la etapa. La capacidad de eliminación media en esta etapa fue variable según la concentración celular presente en el sistema. La etapa comenzó con una capacidad de eliminación media de $1,6 \text{ g m}^{-3} \text{ día}^{-1}$ alcanzando su máximo en el día 8 con un valor de $3,8 \text{ g m}^{-3} \text{ día}^{-1}$ (correspondiente a una eficacia de eliminación de 73%) Sin embargo, la limitación de nitrógeno del sistema conllevó una interrupción en el crecimiento celular que, a su vez, se encontró directamente relacionado con el rendimiento de eliminación puesto que, el rendimiento de eliminación descendió hasta un valor de 56%, ($2,3 \text{ g m}^{-3} \text{ día}^{-1}$), el día 16 en el que se concluyó la etapa.

- Etapa 2: Suministro de nitrógeno a demanda

La segunda etapa comenzó el día 16 con un aporte de nitrógeno al sistema de 20 mg que se consumió de forma instantánea. A partir del día 17 hasta el día 24 se repitió el proceso de adición de N, observándose el mismo efecto

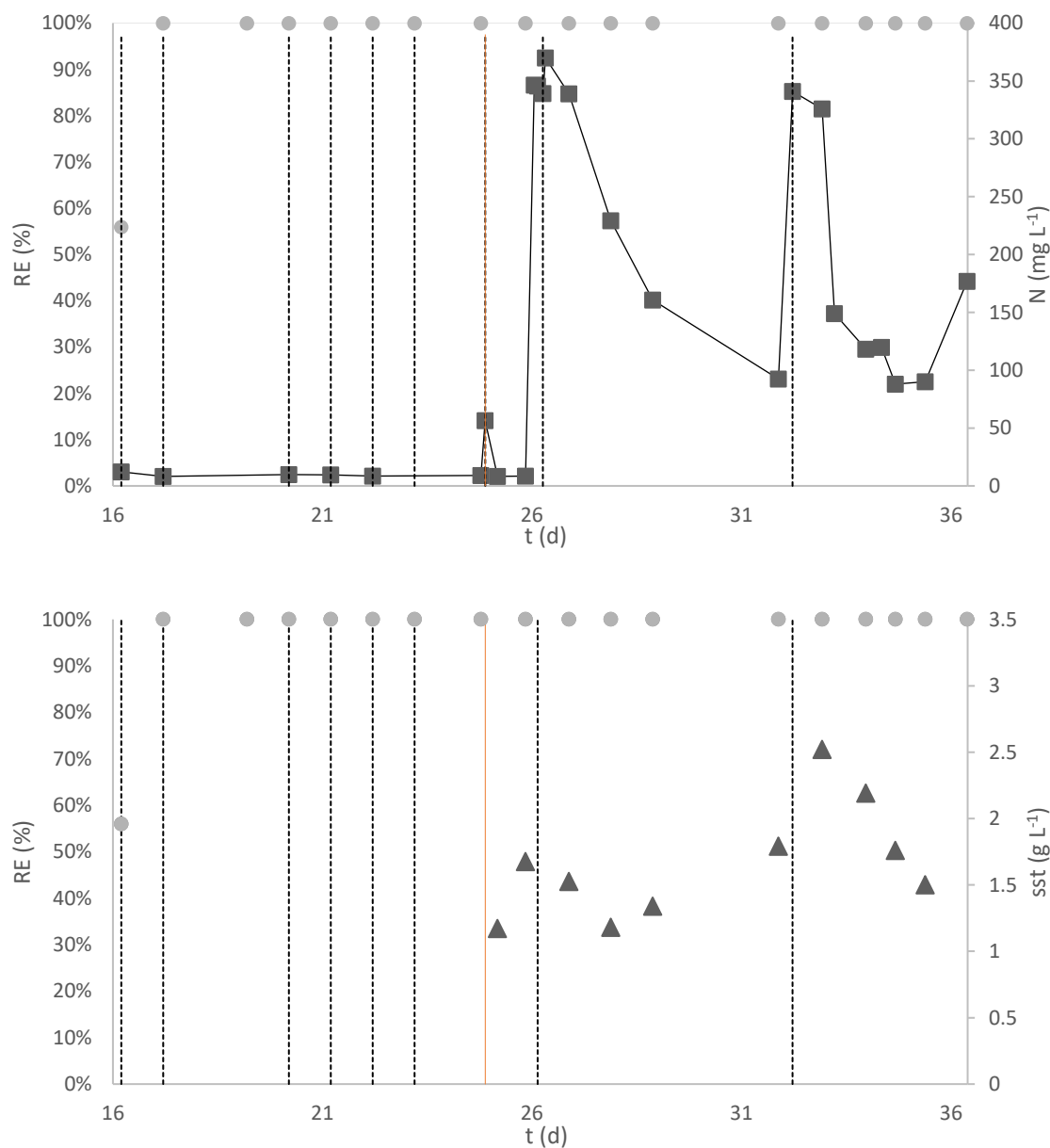


Figura 26: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 2. Las líneas naranjas verticales representan los intercambios de medio del reactor y las líneas verticales punteadas representa el aporte de N

La concentración de sólidos fue medida a partir del día 25, día en el que, debido a la elevada concentración que presentó el TOC de 128 mg L^{-1} , se intercambió medio con un aporte en nitrógeno de 2 g L^{-1} dejando que se consumiera de forma progresiva hasta el día 31, cuando se repitió el proceso de adición, buscando un crecimiento inicial de la biomasa.

La concentración celular se mantuvo estable durante los 10 primeros días de operación en torno a $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 26). Cabe destacar que los días que se adicionó nitrógeno al sistema con una concentración de 5 g L^{-1} , día 25 y 31, se pudo observar un notable incremento en la concentración de sólidos, alcanzando su valor máximo de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ el día 32, 24 horas después de adicionar nitrógeno al sistema.

El rendimiento de eliminación permaneció constante y en su valor máximo a lo largo de la etapa, lo que demuestra que el sistema no estaba limitado ni por transferencia ni por actividad biológica (Figura 26).

- Etapa 3: Limitación en nitrógeno del sistema. Ciclos de adición – limitación

Una vez estabilizado el rendimiento de eliminación del sistema, acumulada suficiente biomasa y optimizada la velocidad de consumo de nitrógeno se establecieron ciclos de adición y limitación de nitrógeno con el fin de maximizar la acumulación de PHB. La etapa comenzó en el día 39 con una concentración celular inicial de $1,65 \text{ g L}^{-1}$, $65,51 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrógeno y $435,2 \text{ mg L}^{-1}$ de carbono orgánico. La elevada concentración de carbono orgánico, que se encontró en un rango de $300\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$, indica una posible acumulación de metabolitos por lo que el día 41, con un valor de TOC de 382 mg L^{-1} , se extrajo 1 L de biomasa y tras ser decantada se adicionó en 1 L de medio fresco sin aporte de nitrógeno. El sistema permaneció sin aporte de N durante 4 días hasta que el día 44 se dio comienzo el ciclo de adición y limitación de nitrógeno, que consistió en el aporte continuo de 40 mg de nitrógeno al sistema durante 24 horas, tiempo estimado para su consumo completo, y una limitación en nitrógeno de 48 horas.

Se pudo observar cómo la concentración de biomasa aumentó en presencia de nitrógeno, condiciones necesarias para la formación de nuevas células. Hasta día 48 la concentración de sólidos se mantuvo en torno a $1,01\text{-}2,97 \text{ g L}^{-1}$ dependiendo en la fase de limitación en la que se encontraba el sistema, aumentando este valor hasta $4,7 \text{ g L}^{-1}$ el día 60 cuando se alimentaba con una fuente constante de carbono y mayor aporte de nitrógeno.

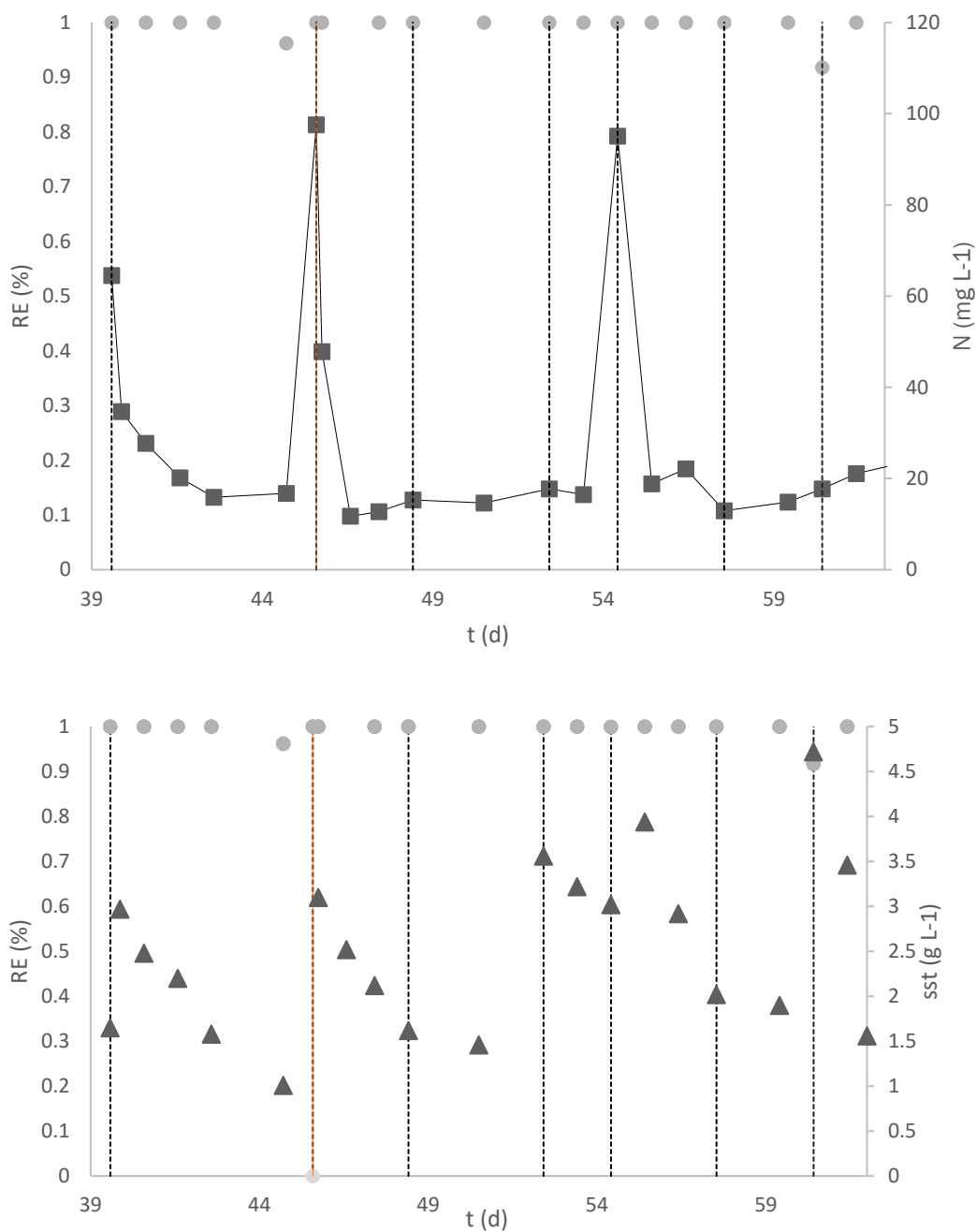


Figura 27: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 3. Las líneas naranjas verticales representan los intercambios de medio del reactor y las líneas verticales punteadas representa el aporte de N

El nuevo modo de operación establecido no afectó en el rendimiento de eliminación, que se mantuvo constante con un valor del 100%. (Figura 27). De la misma manera que en la etapa anterior, la elevada eficacia a la hora de degradar tolueno pudo estar determinada por la alta concentración celular presente en el sistema. Sin embargo, en el día 44 se produjo un ligero descenso



en el rendimiento de eliminación hasta el 96%, coincidiendo con una fase de limitación de N y una menor concentración celular.

- Etapa 4: Limitación en nitrógeno del sistema. Ciclos de adición – limitación con mayor aporte de N

Con el objetivo de promover el crecimiento de biomasa, se aumentó la concentración del N adicionado manteniendo los ciclos de limitación. La cuarta etapa siguió un método de operación similar a la etapa anterior, aunque se duplicó la concentración en nitrógeno adicionando hasta 2 g L^{-1} , (correspondiente a una cantidad de N añadido de 80 mg por ciclo) debido a la elevada demanda de nitrógeno por parte del sistema y se adicionó de forma instantánea, no durante 24 h como en la etapa anterior.

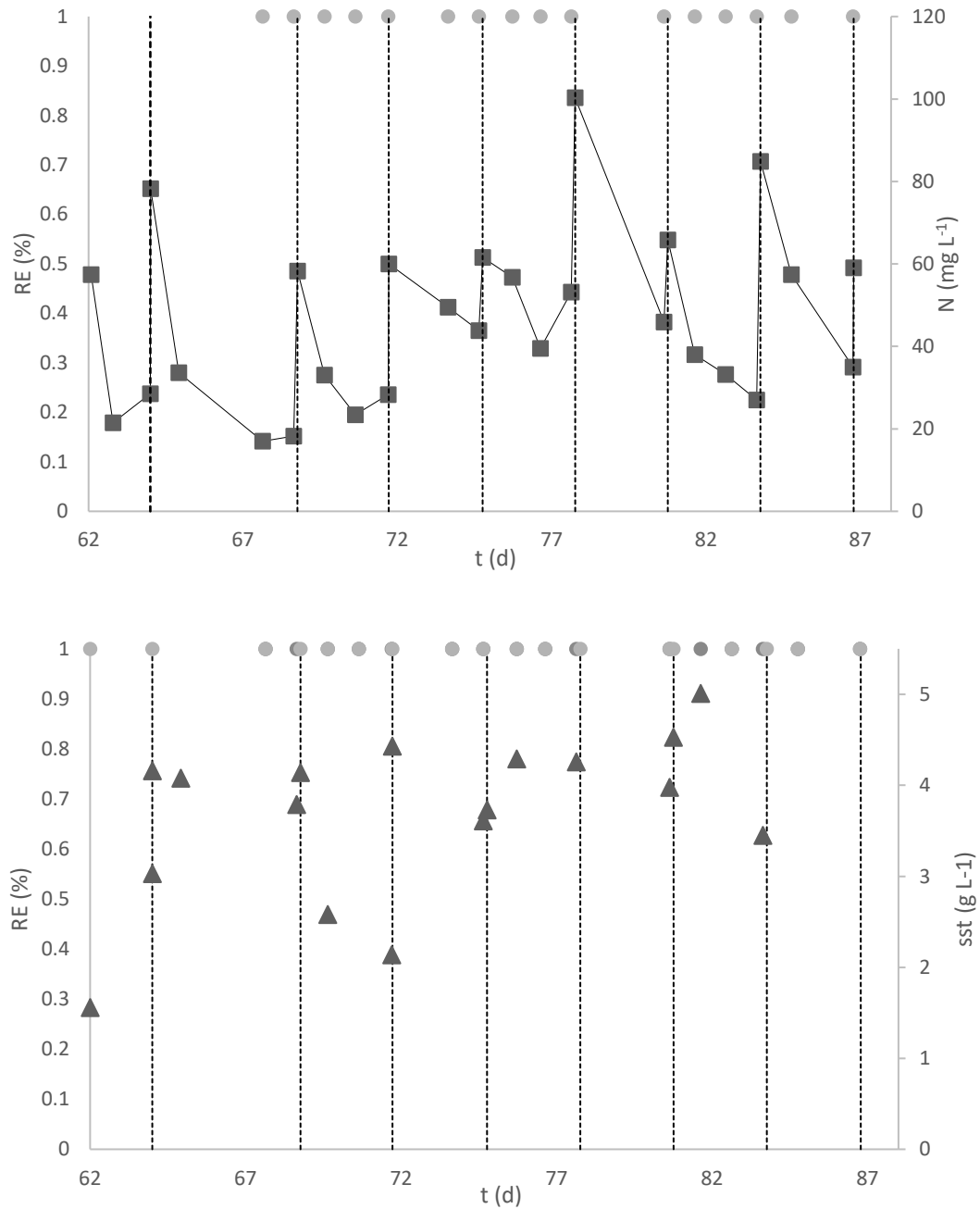


Figura 28: Evolución temporal de la eficacia de eliminación (RE, ●), la concentración de biomasa (▲) y la concentración de N (■) en la etapa 4. Las líneas verticales punteadas representan el aporte de N

La Figura 28 muestra la variación de concentración de nitrógeno a lo largo del tiempo. De la misma forma que en la etapa 3, la concentración celular aumentó una vez que el sistema no se encontró limitado y por ello, cabría esperar un aumento de concentración celular en cada ciclo de adición de nitrógeno.

Durante esta etapa se registraron concentraciones de SST que variaron entre 1,5 y 5 g L⁻¹. El rendimiento de eliminación permaneció constante y en su valor máximo durante la etapa independientemente de la concentración celular presente, lo que confirma la capacidad de *R. opacus* para degradar tolueno de forma continuada.

4.2.2. Productividad de PHB

- Etapa 1: Aclimatación del sistema

La productividad de PHB de la cepa *R. opacus*, estuvo directamente relacionada con la limitación en nitrógeno a la que se sometió el sistema. Durante los primeros días de operación, del 9 al 15, cabría esperar una concentración alta de PHB ya que el sistema se encontró limitado por N. Como se observa en la Tabla 9, las mayores acumulaciones se registraron los días 11 y 12, con 37 y 40% de PHB, respectivamente.

Tabla 9: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 1

Día	N (mg L ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	%PHB
11	8,734	0,1434	37%
12	8,934	0,037	40%
15	12,16	0,109	7%

Sin embargo, las concentraciones de biomasa difieren en un 75%. Este suceso, como se ha mencionado anteriormente, puede ser debido al posible error de medida de la absorbancia puesto que *R. opacus* tiende a la formación de agregados y a la adherencia a las paredes del reactor lo que dificultó tanto la cuantificación de sólidos suspendidos totales, como la homogeneidad en las muestras analizadas de PHB.

En el día 15, con una limitación en nitrógeno de 7 días, se debería haber obtenido una mayor concentración de PHB, sin embargo, el valor disminuyó hasta un 7%. Este resultado pudo deberse al ser el PHB una sustancia de en condiciones límite de crecimiento *R. opacus* lo degradó a causa de la continua falta de nitrógeno.

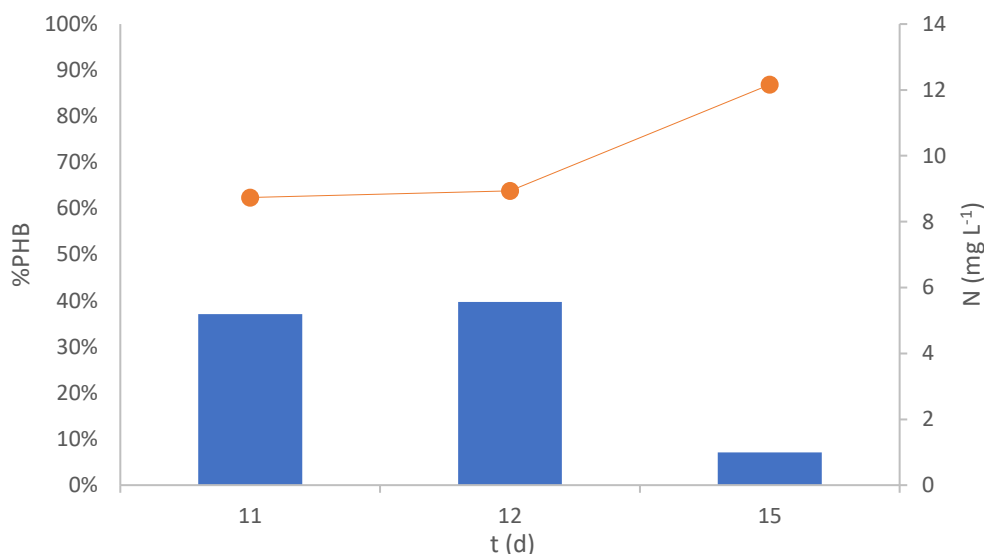


Figura 29: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en tres muestras de la etapa 1

- Etapa 2: Suministro de nitrógeno a demanda del sistema

En esta etapa se adicionó nitrógeno siempre que el sistema lo requirió con el objetivo de no limitar en N al sistema. Sin embargo, al añadir una concentración de nitrógeno inferior a la requerida, se dio una limitación desde el día 16 hasta el día 26.

Tabla 10: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 2

Día	N (mg L ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	%PHB
25	9,1	1,2	28,2%
26	8,5	1,7	7,8%
32	92,2	1,8	0,6%

El día 25 se obtuvo un porcentaje de PHB de 28,2%, resultado coherente puesto que el sistema se encontró limitado en nitrógeno desde el inicio de la etapa. Por el contrario, el porcentaje de PHB esperado el día 26 sería similar al día anterior, sin embargo, fue cuatro veces menor. Como se ha mencionado anteriormente, la formación de agregados y la adherencia de la biomasa a las paredes del reactor dificultan la correcta estimación de biomasa, además de la falta de homogeneidad a la hora de tomar muestra para el análisis de PHB. (Pieja y col., 2012) realizó un estudio de limitación cíclica alternante de metano y nitrógeno con bacterias metanotróficas y obtuvo resultados en los que el contenido de PHB aumentó una vez que el nitrógeno se consumió por completo,

demostrando además que disminuía la concentración de PHB debido al propio consumo por parte de la cepa tras una prolongada limitación de nitrógeno. Esto mismo pudo ocurrir en este estudio, puesto que, aunque se adicionó nitrógeno diariamente desde el día 18 hasta el día 25, el sistema siempre permaneció limitado.

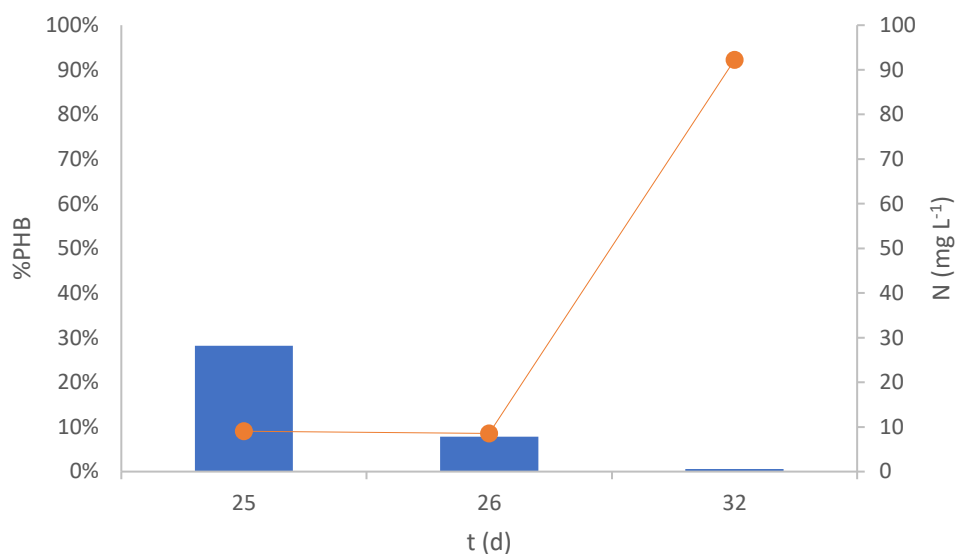


Figura 30: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en tres muestras de la etapa 2

- Etapa 3: Limitación en nitrógeno del sistema. Ciclos de adición – limitación

En la Tabla 11 se presenta el porcentaje medio de PHB obtenido en función del nitrógeno presente en el sistema.

Tabla 11: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 3

Día	N (mg L ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	%PHB	σ
39	34,7	1,7	0,2	
40	27,7	2,5	0,4	0,1
41	20,1	2,2	1,8	0,2
42	15,8	1,6	5,8	2,7
44	16,7	1	10,2	2,8
45	97,5	3,1	2,1	2,5
46	11,7	2,5	0,9	0,2
47	12,7	2,2	2,2	2,1
48	15,3	1,6	7,7	6,0

50	14,6	1,5	9,7	8,4
52	17,7	3,4	8,5	1,3
53	16,5	3,3	8,4	0,2
54	95,1	2,9	10,8	3,5
55	18,8	3,8	6,1	3,4
56	22,1	2,9	10,1	2
57	12,9	1,8	15,4	3,6
59	14,8	2,0	25,5	2,4
60	17,7	4,6	9,0	
61	21,1	3,5	29,5	
62	22,7	5,2	14,1	

Se puede observar cómo la limitación de nitrógeno afectó de forma directa en la producción de PHB. Los días 45 y 54 en los que existe una concentración de nitrógeno cercana a 100 mg L^{-1} , se correspondieron con una disminución notable de la producción de PHB debido a que el sistema presenta nitrógeno necesario para el crecimiento celular y no necesita producir PHB como sustancia de reserva. Por el contrario, cuando el sistema permaneció bajo limitación de N durante varios días, se registró una mayor síntesis de PHB, alcanzando 25,5 y 29,5% los días 59 y 61 de operación, respectivamente.

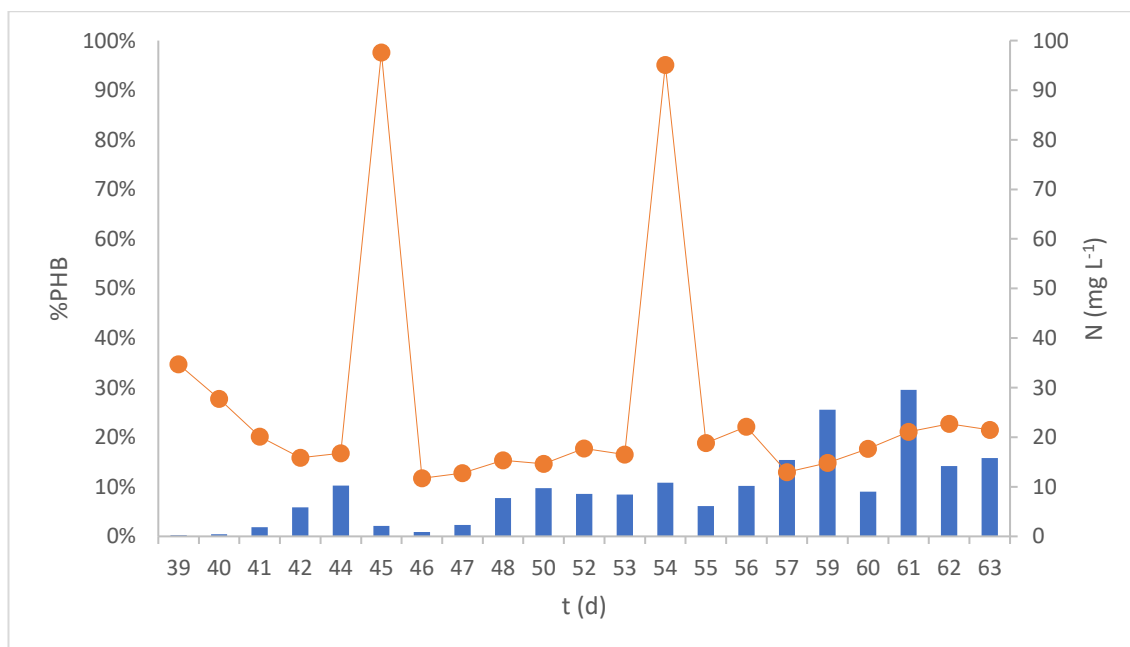


Figura 31: %PHB medio producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en la etapa 3

- Etapa 4: Limitación en nitrógeno del sistema. Ciclos de adición – limitación con mayor aporte de N

Tabla 12: %PHB producido en función del nitrógeno presente en el sistema en la etapa 4

Día	N (mg L ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	%PHB
66	17,0	3,1	11,8
67	58,3	4,1	10,9
68	33,1	3,8	6,1
69	23,4	4,2	5,4
70	28,3	2,5	39,7
72	27,7	2,1	18,3
73	20,0	4,4	4,7
74	56,74	3,6	0,7
75	39,5	3,7	1,3
76	53,2	4,3	4,7
79	45,8	4,2	2,8
80	38,0	3,9	0,4
81	33,2	4,5	0,4
82	26,98	5,01	1,27
83	57,4	3,45	0,0

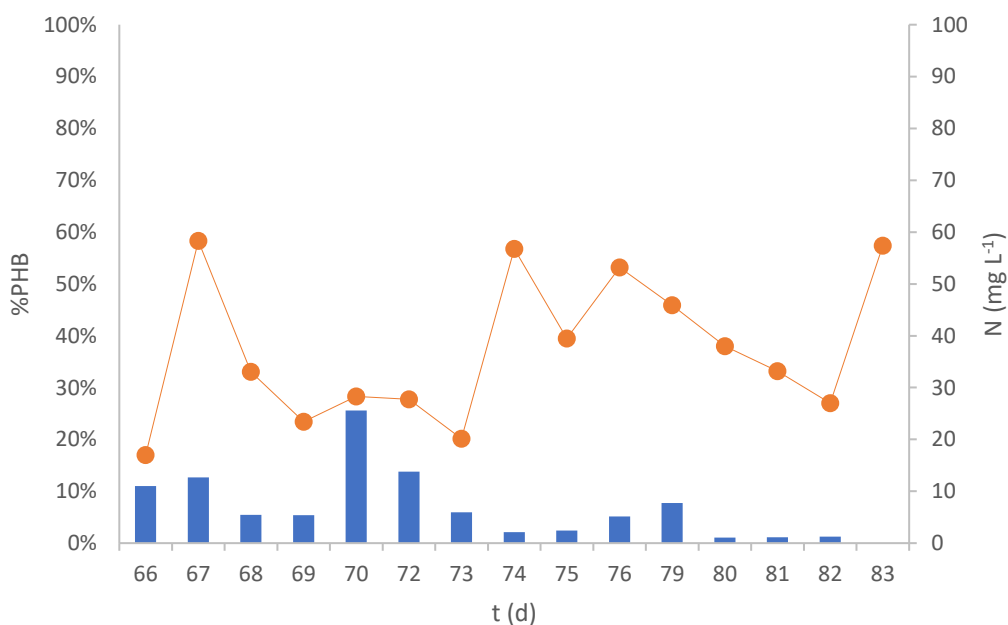


Figura 32: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) en la etapa 4

En la Tabla 12 se presenta el %PHB producido frente a la concentración de nitrógeno y biomasa del sistema en la etapa 4. Aunque al principio de la etapa

se acumularon concentraciones elevadas de PHB (hasta un 39,5% el día 70) se puede apreciar una caída progresiva de la producción a lo largo de la etapa. Se observó que el sistema no era capaz de asimilar todo el nitrógeno suministrado, por lo que desde el día 74 en adelante no se encontró limitado en N.

En la muestra analizada el día 70 por microscopía electrónica se pueden observar los gránulos de biopolímeros intracelulares acumulados por la cepa (Figura 33).

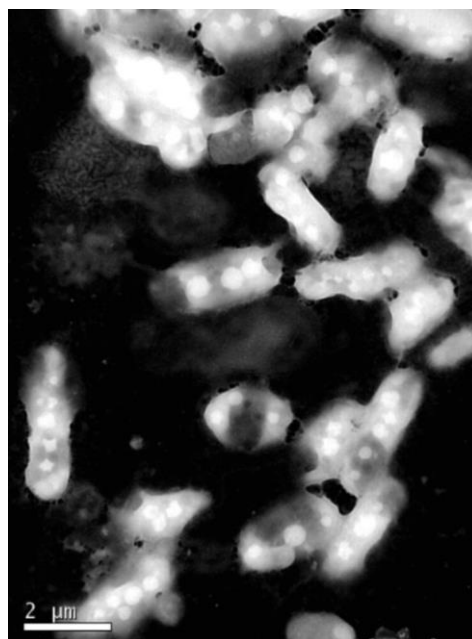


Figura 33: Imagen al microscopio electrónico del medio de cultivo. Se puede apreciar los gránulos de PHB acumulados intracelularmente

4.2.3. Discusión de los resultados obtenidos

El objetivo de este ensayo fue convertir hidrocarburos aromáticos en PHB. A partir de estudios previos han permitido identificar algunos microorganismos capaces llevar a cabo este proceso, (predominantemente del género *Pseudomonas*) (Zylstra y Gibson 1989). El presente estudio mostró que *R. opacus* también sintetiza PHB a partir de hidrocarburos aromáticos, en el caso de este ensayo fue tolueno. El ensayo en continuo constó de 4 etapas diferenciadas (Figura 34) con un método de operación diferente en cada una.

Una vez estabilizado el sistema, el rendimiento eliminación de tolueno se mantuvo constante en torno al 10% durante todo el ensayo, favoreciendo de esta manera tanto el crecimiento celular de la cepa como la biosíntesis de PHB. Otros autores (Malhautier y col., 2014) han demostrado también la capacidad

de cepas como *Rhodococcus erythropolis* para eliminar completamente tolueno a una concentración de 5 g m^{-3} .

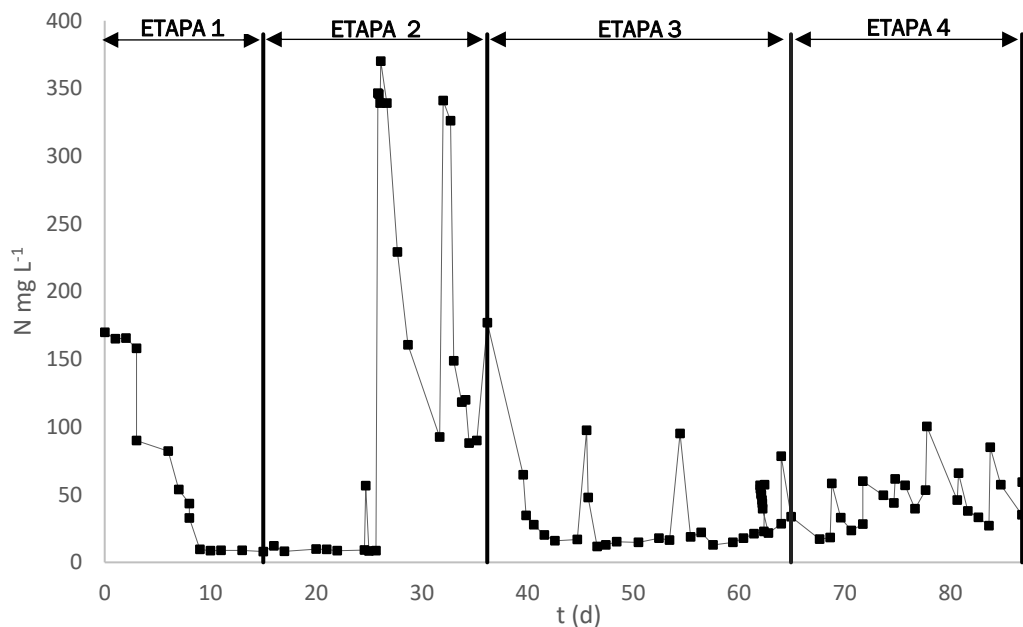


Figura 34: Evolución temporal de la concentración de N (●) a lo largo del ensayo en continuo

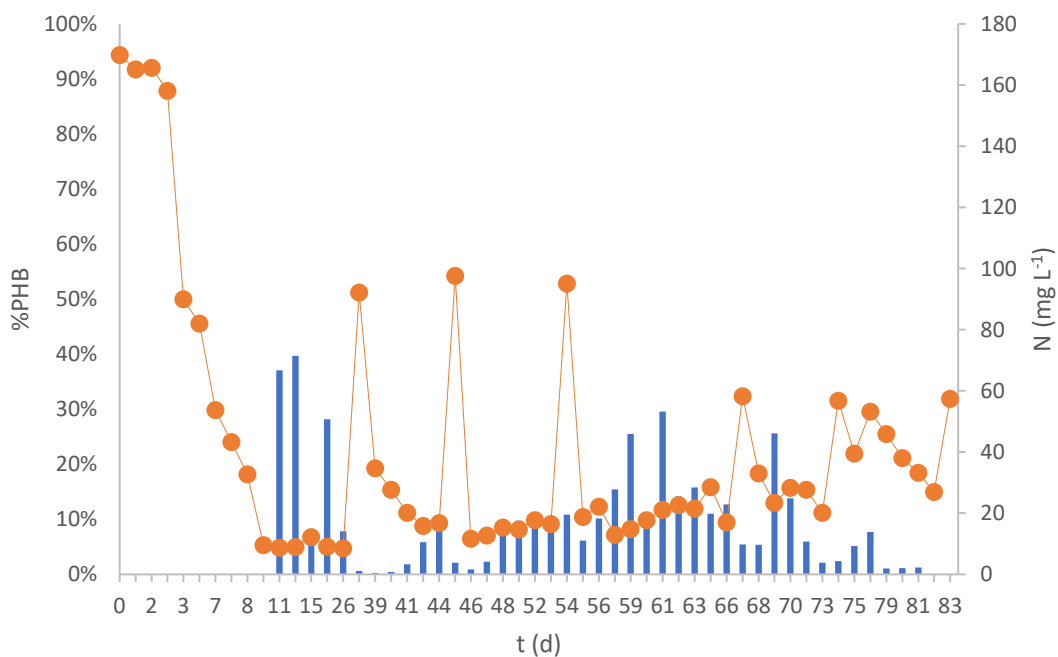


Figura 35: %PHB producido (barras azules) frente la concentración de N (●) a lo largo del ensayo en continuo



En los últimos días de la etapa 1 (9-15) se acumularon significativos porcentajes de PHB, al igual que en el inicio de la etapa 2 (16-26) y durante la mayor parte de las etapas 3 y 4 (Figura 35). Esto es debido a que, en los periodos de tiempo mencionados, el sistema permaneció limitado en N, favoreciendo su acumulación. Concentraciones menores fueron obtenidas por (Nikodinovic y col., 2008) utilizando *P. putida mt-2* en ensayos de degradación y producción de PHA con la fracción BTEXS, en condiciones limitantes en N, acumulando hasta el 22% de PHA en ensayos de degradación de tolueno. Por el contrario, (Ni y col., 2010) llevó a cabo la biosíntesis de PHA-mcl, alcanzando hasta 58,9%, con *Pseudomonas fulva TY16* utilizando como fuente de carbono hidrocarburos aromáticos volátiles, llegando a una conclusión similar: la producción de biopolímeros fue inducida después del agotamiento de nitrógeno en el medio. En este ensayo se alcanzaron alcanzando máximos de 37,1 y 39,7% para los días 11 y 12, respectivamente. Cabe destacar que todos los estudios existentes hasta la fecha han sido llevados a cabo en etapas en batch discontinuo y durante periodos cortos de tiempo, mientras que el realizado en este trabajo de fin de grado se realizó en continuo, siendo el primero en alcanzar una significativa concentración de PHB acumulada operando de esta manera.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del estudio de la degradación de determinados compuestos orgánicos volátiles a una concentración de 4 g m^{-3} en presencia de fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones, para diferentes estrategias de operación con la finalidad de producir PHB se pueden extraer las siguientes conclusiones.

- El compuesto orgánico volátil más adecuado para el proceso estudiado fue el tolueno, debido a que fue el que mayor rendimiento de eliminación obtuvo en los diferentes ensayos realizados en batch, además de ser el único componente en producir PHB.
- La capacidad de eliminación no se vio influenciada con la concentración de sólidos en el medio.
- La mayor producción de PHB intracelular a partir de tolueno se obtuvo en el ensayo en continuo, con 39,7% de PHB tras 4 días de limitación de nitrógeno (concentración $< 10 \text{ mg L}^{-1}$). Se observó que a medida que aumentaron los días de limitación en nitrógeno, la producción de PHB disminuyó con el tiempo, suceso que pudo darse debido a la degradación del polímero por parte de la cepa.
- Es necesario establecer un compromiso entre la adición y la limitación de nitrógeno en el medio con el fin de maximizar la producción de PHB. Un exceso de limitación en nitrógeno en el sistema provocó una disminución en la productividad de PHB debido al propio consumo del polímero por parte de la cepa además de impedir el crecimiento celular.

El estudio prueba la viabilidad del proceso de conversión de compuestos orgánicos volátiles en biopolímeros, así como la necesidad de optimizar las condiciones de operación, fundamentalmente en cuanto a la concentración de nitrógeno suministrada y, con ello, la limitación de nitrógeno establecida.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, L. (2016). Bioplásticos: Obtención y aplicaciones de polihidroxicarboxilatos.
- Anderson, A.J.; Dawes, E.A. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polihidroxicarboxilatos. *Microbiological Reviews*, v. 54, n4, p. 450-472.
- Bhatia, S. K., Otari, S. V., Jeon, J., Gurav, R., Choi, Y., Bhatia, R. K., Pugazhendhi, A., Kumar, V., Banu, J. R., Yoon, J., Choi, K. & Yang, Y. (2021). Biowaste-to-bioplastic (polyhydroxicarboxilatos): Conversion technologies, strategies, challenges, and perspective. *Bioresource Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124733>
- De Blas, M. (2009). Desarrollo y aplicación de técnicas avanzadas de medida de compuestos orgánicos volátiles en la atmósfera.
- Ben, M. (2015). Producción de polihidroxicarboxilatos a partir de agua residual de la industria de la cerveza.
- Briassoulis, D., Athanasoulia, I. & Tserotas, P. (2022). PHB/PLA plasticized by olive oil and carvacrol solvent-cast films with optimised ductility and physical ageing stability. *Polymer Degradation and Stability*.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109958>
- Byrom, D. 1990. Industrial production of polymers from *Alcaligenes eutrophus*. *Novel biodegradable microbial polymers*. Ed E.A. Dawes.
- Carvajal, A., Akmirza, I., Navia, D., Pérez, R., Muñoz, R. & Lebrero, R. (2018). Anoxic denitrification of BTEX: Biodegradation kinetics and pollutant interactions
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.023>
- Castillo, D. A. (2008). Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*.



- Castro, A. I. (2009). Degradación de BTEX en fase gaseosa por biofiltración: Aplicación en campo.
- Chen, X., Rodríguez, Y., López, J. C., Muñoz, R., Ni, B. & Sin, G. (2020). Modeling of Polyhydroxyalkanoate Synthesis from Biogas by *Methylocystis hirsuta*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.
[https://doi.org/ 10.1021/acssuschemeng.9b07414](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07414)
- Chen, Y., Awasthi, A. K., Wei, F., Tan, Q. & Li, W. (2021). Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Science of The Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141772>
- Duangsri, C., Mudtham, NA., Incharoensakdi, A. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation in heterotrophically grown *Arthrospira platensis* under nitrogen deprivation. *J Appl Phycol* 32, 3645–3654 (2020).
<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02272-4>
- Estrada, JM, Rodríguez, E., Quijano, G. et al. Influence of gaseous VOC concentration on the diversity and biodegradation performance of microbial communities. *Bioprocess Biosyst*.
<https://doi.org/10.1007/s00449-012-0737-x>
- EDGAR - La base de datos de emisiones para la investigación atmosférica global
https://edgar.jrc.ec.europa.eu/air_pollutants
Accesed:2022-07-11
- El-Naas, M. H., Acio, J. A. & El Telib, A. E. (2014). Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects, *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.04.009>
- Etilbenceno | PRTR España
<https://prtr-es.es/Etilbenceno,15652,11,2007.html>
Accesed: 2022-07-11



- De Eugenio, L. I. (2009). Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: aplicaciones biotecnológicas.
- Font X, Artola, A. & Sánchez A. (2011). Detection, composition and treatment of volatile organic compounds from waste treatment plants.
<https://doi.org/10.3390/s110404043>
- González, Y., Meza, J. C., González, O. & Córdova, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano.
- Hori, K., Kobayashi, A., Ikeda, H. & Unno, H. (2009). *Rhodococcus aetherivorans* IAR1, a new bacterial strain synthesizing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from toluene.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.005>.
- ICSC 0073-ESTIRENO
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=73&p_edit=&p_version=2&p_lang=es
Accesed:2022-07-11
- ICSC 0078-TOLUENO
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=78&p_edit=&p_version=2&p_lang=es
Accessed: 2022-07-11
- ICSC 0084 - o- xileno
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=84&p_edit=&p_version=2&p_lang=es
Accesed:2022-07-11
- ICSC 0085 - m - XILENO
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=85&p_edit=&p_version=2&p_lang=es
Accesed:2022-07-11
- ICSC 0086 - p - xileno
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=86&p_edit=&p_version=2&p_lang=es



Accesed:2022-07-11

- ICSC 0268- ETILBENCENO
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0268&p_version=2
Accesed:2022-07-11
- Jendrossek, D. and Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxy alkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403-432.
- Kaniuk, L. & Stachewicz, U. (2021). Development and Advantages of Biodegradable PHA Polymers Based on Electrospun PHBV Fibers for Tissue Engineering and Other Biomedical Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.
[https://doi.org/ 10.1021/acsbiomaterials.1c00757](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00757)
- Karen M. Tobin, Kevin E. O'Connor. (2005). Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.025>
- Khanna, S., Srivastava, A. K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Lacasaña, M. González, B. et al. (2008). Evaluación de la exposición a BTEX en la población del Campo de Gibraltar.
- Lai, C., Bhuyar, P., Shen, M.& Chu, C. (2022). A Two-stage strategy for polyhydroxybutyrate (PHB) production by continuous Biohydrogen fermenter and sequencing batch reactor from food industry wastewater. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*.
<https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102445>
- Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and polymerization of β -hydroxybutyric. *Bull, Soc. Chem. Biol.*, v.8, p 770-782.
- Lemos, A. C. & Mina, A. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial.



- Liu, Y., Han, F., Liu, W., Cui, X., Luan, X. & Cui, Z. (2020). Process-based volatile organic compound emission inventory establishment method for the petroleum refining industry, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121609>
- López-Aguirre, J. F., Pomaquero-Yuquilema, J. C. & López-Salazar, J. L. (2020). Análisis de la contaminación ambiental por plásticos en la ciudad de Riobamba.
- López, J. C., Arnáiz, E., Merchán, L., Lebrero, R. & Muñoz, R. (2018). Biogas-based polyhydroxyalkanoates production by *Methylocystis hirsuta*: A step further in anaerobic digestion biorefineries, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.185>.
- Luque, A. (2019). Implicaciones ambientales derivadas del petróleo: Caso del agua embotellada.
- Malán, A. K. (2011). Estudio de la producción de poli-3-hidroxibutirato en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa.
- Malhautier, L., Quijano, G., Avezac, M., Rocher, J. & Fanlo, J.L. (2014). Kinetic characterization of toluene biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*: Towards a rationale for microflora enhancement in bioreactors devoted to air treatment. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.099>
- Márquez, A. (2020). Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P...) en la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica.
- Martínez, A. (2012). Desarrollo de carbones activados a partir de residuos lignocelulósicos para la adsorción y recuperación de tolueno y n-hexano.
- Min Kim, Y., Harrad, S. & Harrison, R. M. (2001). Concentrations and Sources of VOCs in Urban Domestic and Public Microenvironments. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/es000192y>



- Mobasser, S., Wager, Y. & Dittrich, M. T. (2022). Indoor Air Purification of Volatile Organic Compounds (VOCs) Using Activated Carbon, Zeolite, and Organosilica Sorbents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*.
[https://doi.org/ 10.1021/acs.iecr.1c04732](https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c04732)
- Myung, J., Galega, W. M., Van Nostrand, J. D., Yuan, T., Zhou, J. & Criddle, C. S. (2015). Long-term cultivation of a stable Methylocystis-dominated methanotrophic enrichment enabling tailored production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate),
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.094>.
- Narancic, T., Kenny, S.T., Djokic, L., Vasiljevic, B., O'Connor, K.E. & Nikodinovic-Runic, J. (2012). Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by newly isolated *Pseudomonas* sp. TN301 from a wide range of polyaromatic and monoaromatic hydrocarbons.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05353.x>
- Nikodinovic, J., Kenny, ST, Babu, RP et al. (2008). The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1593-0>
- Ni, Y., Young Kim, D., Gyu Chung, M., Hee Lee, S., Park, H. & Rhee, Y. (2010). Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.033>
- Ortega-Arias, G. M. & Bell-García, A. (2014). Separación y caracterización de poli-hidroxibutirato.
- Ou, R., Chang, C., Zeng, Y., Zhang, X., Fu, M., Fan, L., Chen, P. & Ye, P. (2022). Emission characteristics and ozone formation potentials of VOCs from ultra-low-emission waterborne automotive painting.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135469>



- Pieja, A. J., R. Sundstrom, E. & S. Criddle, C. (2012). Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community. *Bioresource Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.044>
- Quijano, A. L. (2020). Análisis técnico-económico de la producción de aromáticos a partir de bioetanol.
- Ramos, A. F. (2019). Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*.
- Resumen de salud Pública: Xileno (Xylene) | PHS | ATSDR
https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs71.html
Accesed: 2022-07-12
- Rivera-Garibay, O. O., Álvarez-Filip, L., Rivas, M., Garelli-Ríos, O., Pérez-Cervantes, E. & Estrada-Saldívar, N. (2020). Impacto de la contaminación por plástico en áreas naturales protegidas mexicanas. Greenpeace México.
- Rodríguez, E. D. & López, H. M. (2018). Caracterización de compuestos orgánicos volátiles, provenientes de seis estaciones de servicio de combustibles de la ciudad de Barranquilla, Colombia.
- Serrano, Y. (2010). Polihidroxialcanoatos: Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente
- Stirchak, L., Abis, L., Kalalian, C., George, C., & Donaldson, D. J. (2021). Differences in Photosensitized Release of VOCs from Illuminated Seawater versus Freshwater Surfaces.
<https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.1c00063>
- Toda, J. (2018). Reconversión de compuestos aromáticos de 9 carbonos a xilenos usando métodos computacionales
- Tratamiento de COV, emisiones de compuestos orgánicos volátiles | Condorchem Envitech
<https://condorchem.com/es/blog/depuracion-de-emisiones-cov/>



Accessed: 2022-07-11

- Wang, Y., Ding, L., Shi, O., Liu, S., Qian, L., Yu, Z., Wang, H., Lei, J., Gao, Z., Long, H. & Xu, C. C. (2022). Volatile organic compounds (VOC) emissions control in iron ore sintering process: Recent progress and future development,
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137601>
- Yang, C., Qian, H., Li, X., Cheng, Y., He, H., Zeng, G. & Xi, J., (2018). Simultaneous Removal of Multicomponent VOCs in Biofilters,
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.004>.
- Yu, B., Yuan, Z., Yu, Z., Xue-song, Z. (2022). BTEX in the environment: An update on sources, fate, distribution, pretreatment, analysis, and removal techniques,
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134825>
- Zhang, Y., Wusiman, A., Liu, X., Wan, C., Lee, D. & Tay, J. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from phenol in an acclimated consortium: Batch study and impacts of operational conditions. *Journal of Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.001>
- Zylstra, G. and Gibson, D. (1989) Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1 Nucleotide Sequence of the *todC1C2BADE* Genes and Their Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

ANEXOS

ANEXO I: Curvas de calibrado

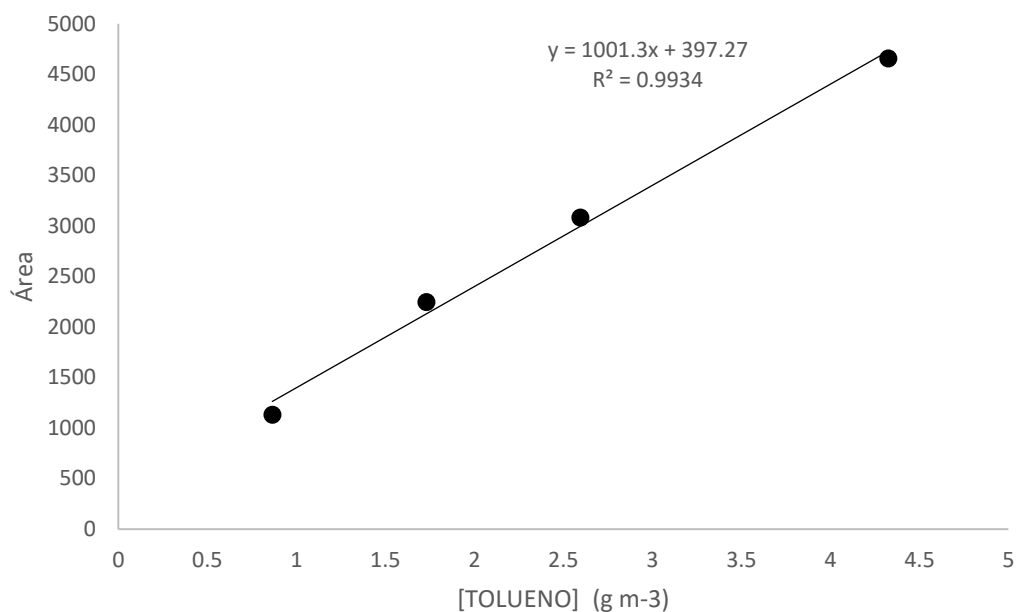


Figura 36: Curva de calibrado de tolueno

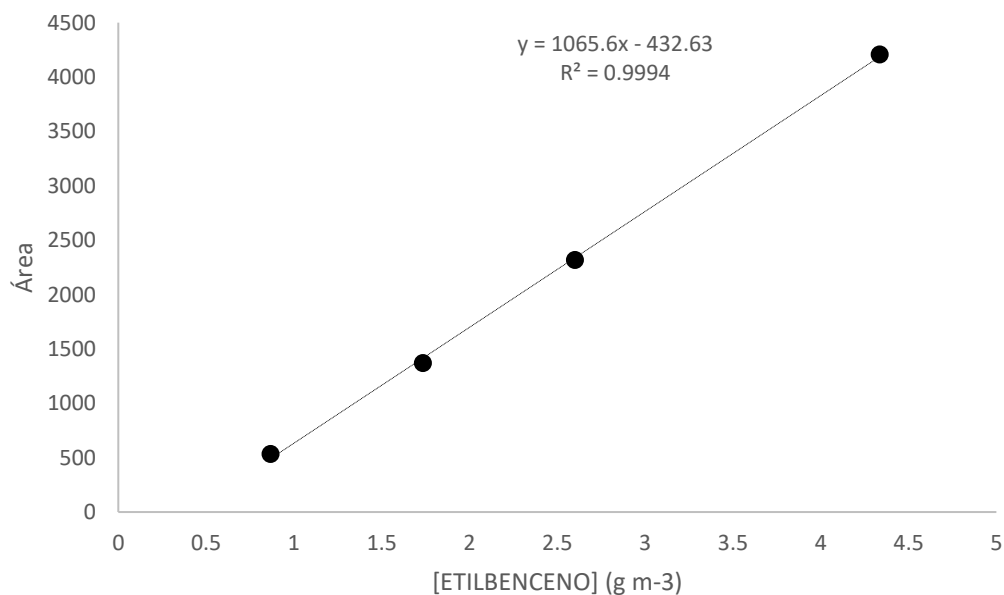


Figura 37: Curva de calibrado de etilbenceno

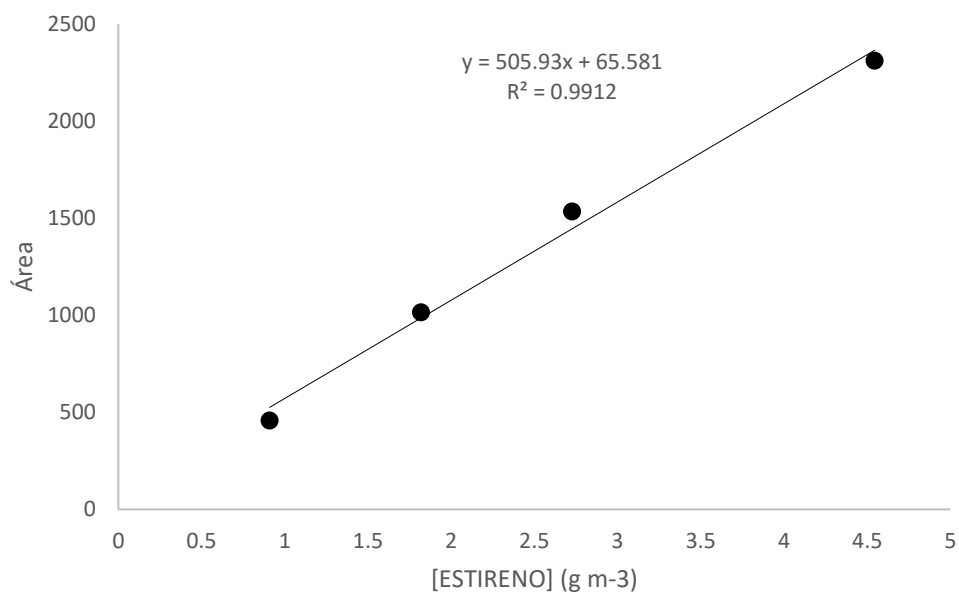


Figura 38: Curva de calibrado de estireno

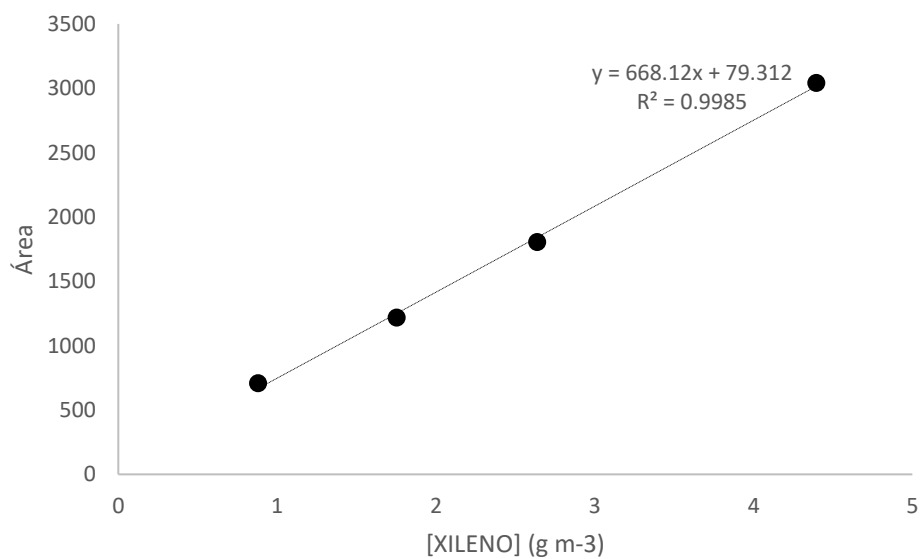


Figura 39: Curva de calibrado de xileno

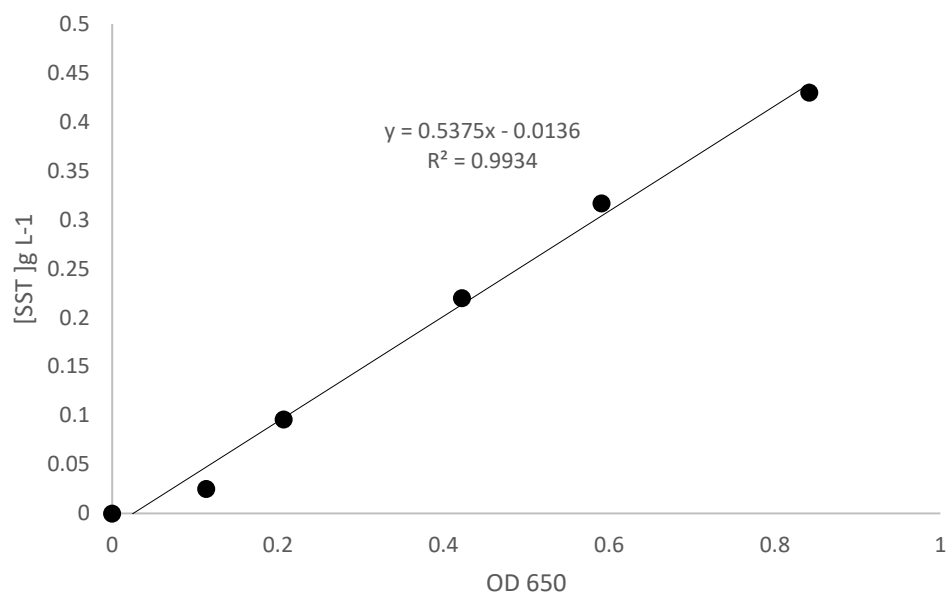


Figura 40; Curva de calibrado de la concentración de sólidos