



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOCONVERSIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES EN BIOPOLÍMEROS**

Autor: Dña. Silvia Rodríguez Francos
Tutor 1: Dña. Raquel Lebrero Fernández
Tutor 2: Dña. Rebeca Pérez Fernández

Valladolid, Julio, 2023



RESUMEN

La producción de biopolímeros para sustituir a los plásticos de origen fósil 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 PHAs de cadena media (mcl-PHA) empleando la cepa *Pseudomonas putida* (DSM 6125), tolueno y etilbenceno como única fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se operó en continuo con un reactor de tanque agitado destinado al crecimiento celular, a la degradación de tolueno y etilbenceno y a la producción de mcl-PHA. Se emplearon concentraciones variables de tolueno, etilbenceno y nitrógeno, limitando este último para optimizar la productividad de mcl-PHA. Se observó una eliminación completa de tolueno y etilbenceno durante todo el periodo experimental y se alcanzaron acumulaciones máximas de PHA de 20,64% (en peso) tras 4 días de limitación del sistema.

Palabras clave: Compuestos orgánicos volátiles, *Pseudomonas putida*, tolueno, etilbenceno, mcl-PHA, limitación en nitrógeno.

ABSTRACT

The production of biopolymers to replace fossil-based plastics from pollutants or waste substances is an interesting alternative to conventional processing methods. The present work focused on the production of medium chain PHAs (mcl-PHA) using *Pseudomonas putida* strain (DSM 6125), toluene and ethylbenzene as sole carbon source and NH_4Cl as nitrogen source. A stirred tank reactor was operated continuously for cell growth, toluene and ethylbenzene degradation and mcl-PHA production. Varying concentrations of toluene, ethylbenzene and nitrogen were used, limiting the latter to optimize mcl-PHA productivity. Complete toluene and ethylbenzene removal was observed throughout the experimental period and maximum PHA accumulations of 20.64 wt% were reached after 4 days of system limitation.

Key words: Volatile organic compounds, *Pseudomonas putida*, toluene, ethylbenzene, mcl-PHA, nitrogen limitation.



Universidad de Valladolid

Bioconversión de COVs en biopolímeros



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Compuestos orgánicos volátiles. Origen, situación actual y perspectivas globales. 1 | |
| 1.2. Tecnologías de eliminación de COVs | 3 |
| 1.2.1. Tratamientos fisicoquímicos | 3 |
| 1.2.2. Tratamientos biológicos..... | 4 |
| 1.2.3. Métodos fisicoquímicos frente a métodos biológicos | 5 |
| 1.3. Contaminación por plásticos derivados del petróleo y sus alternativas biológicas: Polihidroxialcanoatos (PHAs)..... | 6 |
| 1.3.1. Problemática ambiental..... | 6 |
| 1.3.2. Polihidroxialcanoatos (PHAs)..... | 7 |
| 1.3.3. Producción de PHA a partir de COVs..... | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 3.1. Materiales | 14 |
| 3.2. Métodos | 15 |
| 3.2.1. Preparación de inóculo | 15 |
| 3.2.2. Procedimiento experimental | 15 |
| 3.2.3. Métodos analíticos..... | 17 |
| 3.2.4. Cálculos..... | 19 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 4.1. Etapa 1: Crecimiento celular hasta la concentración objetivo..... | 21 |
| 4.1.1. Fase gas..... | 21 |
| 4.1.2. Fase líquida | 23 |
| 4.2. Etapa 2: Ciclos de adición y limitación..... | 26 |
| 4.2.1. Fase gas..... | 26 |
| 4.2.2. Fase líquida | 28 |
| 4.3. Comparación de los métodos de análisis de los PHAs sintetizados..... | 31 |
| 5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 32 |
| 6. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA | 36 |
| ANEXOS | 41 |
| ANEXO I. CURVAS DE CALIBRADO | 41 |



Universidad de Valladolid

Bioconversión de COVs en biopolímeros



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos orgánicos volátiles. Origen, situación actual y perspectivas globales.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) constituyen uno de los principales problemas medioambientales y su amplia distribución ha generado grandes preocupaciones. Los COVs son hidrocarburos que presentan estado gaseoso a la temperatura ambiente o que son muy volátiles a dicha temperatura. Suelen presentar una cadena con un número de carbonos inferior a doce y contienen otros elementos como el oxígeno, flúor, cloro, azufre, bromo o nitrógeno. Más específicamente, los COVs se definen como compuestos cuya presión de vapor es inferior a 13,3 Pa a 25 °C, según la *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Los principales subgrupos de COVs incluyen compuestos halogenados, hidrocarburos aromáticos monocíclicos, sulfuros y sulfóxidos orgánicos, trihalometanos (THM), acetonas y ésteres (Chary & Fernández-Alba, 2012)

Las principales emisiones antropogénicas de COVs en exteriores se deben al uso de combustibles como la gasolina, el carbón, la madera o el gas natural, con un factor de emisión estimado de 0,77 kg-COV por tonelada de petróleo crudo refinado (Y. Liu y col., 2020) Además, pueden ser liberados mediante procesos de tratamiento de residuos sólidos, con factores de emisión comprendidos 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 COV 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 Se estima que las fuentes antropogénicas emiten más de $1,42 \times 10^8$ toneladas de carbono como COV (Wang y col., 2022) (Figura 1).

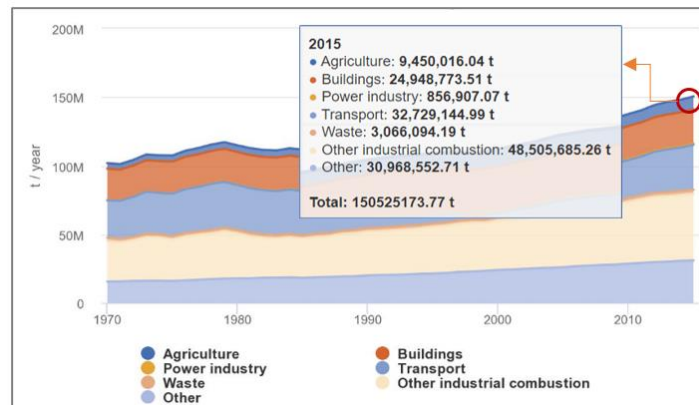


Figura 1: Evolución de las emisiones mundiales de COVDM por sector. Fuente: Emissions Database for Global Atmospheric Research.

Por otro lado, los COVs son uno de los contribuyentes más conocidos de la contaminación de aire interior, pudiendo alcanzar concentraciones hasta diez veces superiores a las encontradas en exteriores (Uragami, 2014). Se pueden encontrar en diferentes ambientes interiores como hogares, oficinas, tiendas, escuelas, bibliotecas, centros deportivos e incluso en el transporte público (González-Martín y col., 2023), y son emitidos desde múltiples fuentes como materiales de decoración (revestimientos, adhesivos, papeles pintados, alfombras, etc.), muebles (paneles a base de madera, cuero, plástico, etc.), o actividades humanas (como cocinar, fumar, productos de limpieza, etc.) (Pei y col., 2019).

Una vez en la atmósfera, reaccionan con otros compuestos a través de reacciones fotoquímicas que se dan en la fase vapor generando aerosoles secundarios y ocasionando contaminación atmosférica y efectos adversos para la población a corto y largo plazo (Wang y col., 2022). Además de acumularse y persistir en el medio ambiente, los COVs forman parte del crecimiento del efecto invernadero.

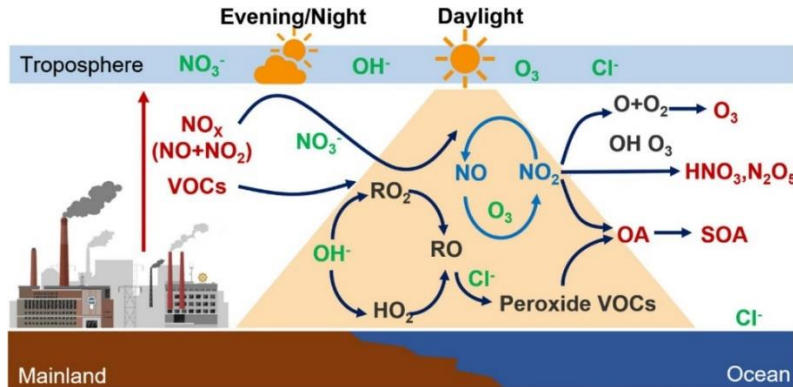


Figura 2: Reacciones de degradación atmosférica de los COVs. Fuente: Wang y col., 2022

Por otro lado, una exposición prolongada a estos compuestos puede ocasionar efectos adversos para la salud como alergias, asma e incluso leucemia (Gao y col., 2014). Según informes recientes, 1 de cada 10 muertes a escala mundial puede ser atribuida a la contaminación del aire por COVs (Banco Mundial e Instituto para la Métrica y Evaluación de la Salud, 2016) (S. Wang y col., 2010).



Figura 3: Datos clave del problema de la calidad del aire de interior. Fuente: Banco Mundial e Instituto para la Métrica y Evaluación de la Salud, 2016

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado 834 COVs en cinco grupos para definir su riesgo carcinogénico para los humanos: 1 (agentes cancerígenos para el hombre y los animales), 2A (agentes probablemente cancerígenos para el hombre, prueba de carcinogénesis para los animales), 2B (agentes que podrían ser cancerígenos para el hombre, suficiente carcinogénesis para los animales), 3 (agentes no clasificables en cuanto a su carcinogenicidad para el hombre) y 4 (agentes probablemente no cancerígenos para el hombre). Los COVs estudiados en el presente trabajo de fin de máster fueron el etilbenceno y el tolueno, clasificados como 2A y 3, respectivamente.

Por todo ello, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica ha catalogado a los COVs estudiados en el presente trabajo (tolueno y etilbenceno) como

contaminantes peligrosos a escala nacional por sus propiedades cancerígenas, aunque continúan existiendo dudas de si se producen efectos dañinos a exposiciones prolongadas a bajas concentraciones de dichos compuestos. Dicho organismo ha establecido una concentración máxima de tolueno y etilbenceno permisibles en el agua potable en 1000 $\mu\text{g/L}$ y 700 $\mu\text{g/L}$, respectivamente y en el aire, con una concentración máxima de tolueno para exposiciones prolongadas de 1 mg/m^3 y puntuales de 260 $\mu\text{g/m}^3$ y etilbenceno 434 $\mu\text{g/m}^3$, para exposiciones puntuales respectivamente (S. Wang y col., 2010).

1.2. Tecnologías de eliminación de COVs

En los últimos años, la contaminación del aire por emisiones de COVs se ha convertido en una de las principales preocupaciones a escala global, por lo que es necesario implementar tecnologías de eliminación eficaces. Las configuraciones existentes se pueden dividir en dos grupos en función de su estrategia de operación, basándose en procesos fisicoquímicos o en tecnologías de bioconversión. A continuación, se muestran algunas de las principales alternativas de eliminación de COVs.

1.2.1. Tratamientos fisicoquímicos

Combustión térmica regenerativa

Se trata de un proceso llevado a cabo en el interior torres rellenas de material cerámico en las que se produce la oxidación de los contaminantes y durante el proceso, los COVs se oxidan transformándose en CO_2 y H_2O .

El proceso opera con temperaturas entre los 750 y 1250°C y caudales comprendidos entre 1.000-100.000 Nm^3/h ofreciendo una gran versatilidad. Además, presenta una elevada capacidad de eliminación de diferentes compuestos orgánicos volátiles, no generando residuos. Sus costes de operación son bajos y presenta una elevada eficiencia térmica ya que es posible recuperar la energía generada para procesos externos como se ha mencionado anteriormente (Condorchem envitech, 2023).

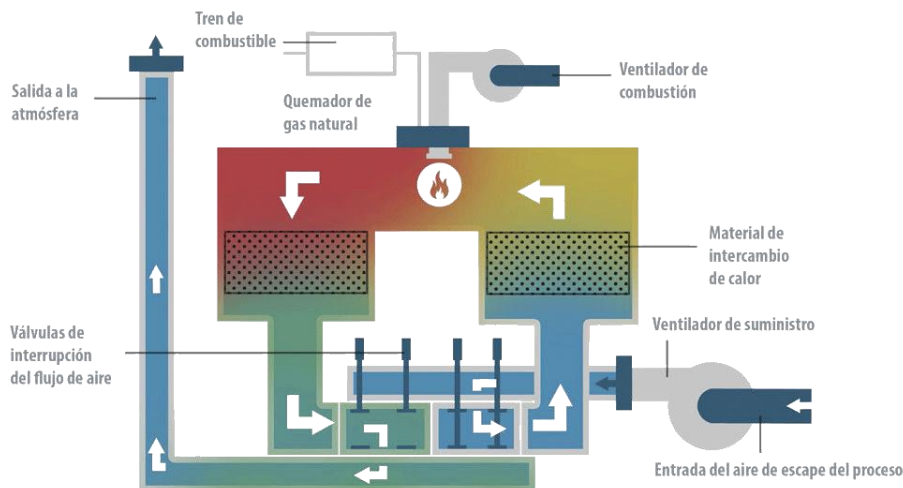


Figura 4: Combustión térmica regenerativa

Combustión Catalítica Regenerativa

Se trata de una tecnología similar a la combustión térmica regenerativa descrita anteriormente con la diferencia de que, en este caso, se consigue la combustión a temperaturas inferiores (200-400°C) en vista de la presencia de un catalizador. Si bien es cierto que se trata de un proceso que ofrece numerosas ventajas, es necesario tener bien caracterizados todos los compuestos a tratar debido a que puede disminuir la actividad

del catalizador por envenenamiento del mismo. El sistema presenta una eficacia superior al 98%, sin embargo, solo es aplicable para caudales de aire medios o bajos (1.000-30.000 Nm³/h) y para concentraciones de COVs medias o bajas (Condorchem envitech, 2023).

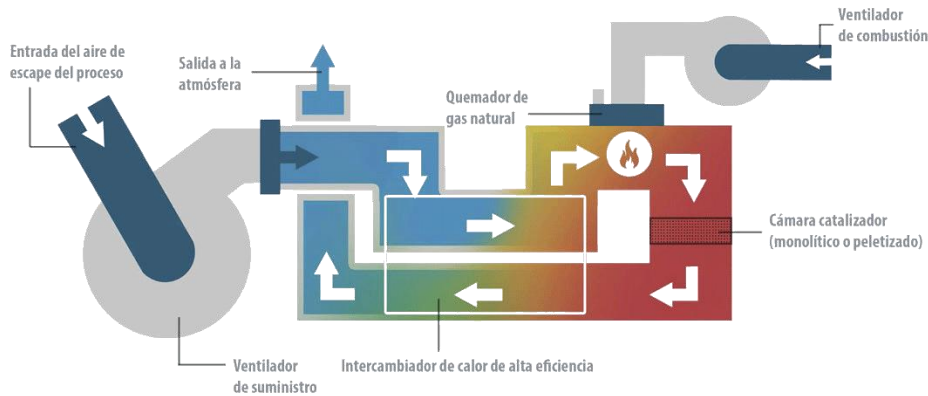


Figura 5: Combustión catalítica regenerativa

Adsorción en carbón activo

Se trata de la tecnología más habitual dentro del grupo de tratamientos fisicoquímicos que consiste en el paso del aire por un lecho de carbón activo o un material similar que retiene los COVs. El carbón activo adsorbe los COVs hasta su saturación y se pierde la capacidad adsorbente. En este punto se puede desechar el carbón y gestionarlo como residuo, sustituyéndolo por uno nuevo o bien regenerar el carbón con vapor o con un gas inerte, como puede ser el nitrógeno (Condorchem envitech, 2023).

1.2.2. Tratamientos biológicos

La eliminación de COVs mediante procesos biológicos se ha convertido en los últimos años en una alternativa rentable y medioambientalmente sostenible para el tratamiento de gases con concentraciones bajas o moderadas de contaminantes, al operar a temperatura y presión ambiente y no requerir productos químicos ni generar residuos peligrosos. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como la necesidad de condiciones estables de humedad, temperatura y alimentación de los microorganismos, por lo que es necesario diseñar y operar los sistemas biológicos de forma adecuada para asegurar la actividad de la microbiología. Se ha demostrado ampliamente que existe una gran variedad de microorganismos capaces de degradar COVs presentes en emisiones gaseosas. Estos procesos se implementan en diferentes configuraciones de biorreactores:

Biofiltración

La biofiltración se ha convertido en una técnica líder para la eliminación de compuestos orgánicos volátiles en emisiones atmosféricas, tanto para caudales elevados como para caudales bajos. Este tipo de tratamiento se fundamenta en la capacidad que presentan los microorganismos para transformar compuestos como COVs a presión y temperatura ambiente en CO₂, agua y biomasa (Marycz y col, 2023)

Un biofiltro es un biorreactor empacado donde los microorganismos crecen adheridos al mismo. Los contaminantes no son tratados en la fase gaseosa debiendo transferirse

primero a la fase líquida. Es por ello que la biofiltración de COVs es un proceso complejo que incluye múltiples interacciones fisicoquímicas y biológicas. La Figura 6 describe los procesos de eliminación de COVs en un biofiltro donde los compuestos gaseosos a eliminar y el oxígeno se disuelven primero en la fase acuosa que contiene microorganismos (Marycz y col, 2023).

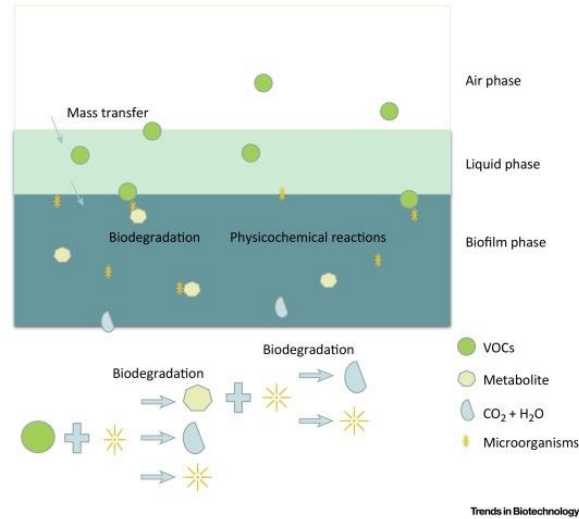


Figura 6: Eliminación de COVs en un biofiltro. Fuente: Marycz y col, 2023

Dentro de los biofiltros se pueden encontrar los biofiltros percoladores, siendo la tecnología más rentable dentro de todas las técnicas de biofiltración conocidas. Son tecnologías similares a los biofiltros convencionales descritos anteriormente, sin embargo, la principal diferencia es que un biofiltro percolador se alimenta una fase acuosa de forma continua al reactor. Por lo tanto, esta tecnología será menos eficiente para la eliminación de compuestos hidrófobos.

Biolavadores

Los biolavadores son tratamientos biológicos que consisten en la eliminación de los contaminantes de la corriente gaseosa en dos etapas. En una primera etapa, el gas contaminado pasa por una torre de absorción, donde son eliminados los compuestos orgánicos volátiles además de olores. Estos contaminantes pasan de la fase gas a la fase líquida mediante absorción. El agua con que sale de la torre de absorción se trata, en una segunda etapa, en un biorreactor. Al igual que en el caso de biofiltros percoladores, en el biolavado la biodegradación tiene lugar en fase acuosa. Sin embargo, la aplicación de este tipo de procesos se reduce a la eliminación de compuestos relativamente hidrófilos y solubles en fase acuosa (Fuente: Bioprocesos para la eliminación de contaminantes volátiles: estado actual de conocimientos y futuras tendencias, Olores.org).

1.2.3. Métodos fisicoquímicos frente a métodos biológicos

Los métodos biológicos, como los descritos en el apartado 1.2.2. presentan múltiples ventajas sobre las técnicas físico-químicas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento del aire. Requieren un menor aporte energético y son más respetuosos con el medioambiente, ya que las biotecnologías no requieren el uso de reactivos peligrosos ni condiciones operativas extremas. Sin embargo, la eficiencia de los procesos de biofiltración para la eliminación de COVs hidrofóbicos en mezclas de gases es baja. Por otro lado, los métodos físico-químicos como la oxidación térmica o la adsorción con carbón activo, aunque les caracteriza su eficiencia superior al 95%, poseen elevados costes de operación y ocasionan impacto ambiental debido a las condiciones extremas de operación,

los elevados requerimientos energéticos o los altos costes de materias primas (Marycz y col, 2023).

Si bien es cierto que los métodos biológicos ofrecen mayores ventajas frente a las tecnologías físico-químicas, actualmente es necesario seguir trabajando en optimizar los procesos de bioconversión con el fin de alcanzar rendimientos de operación similares a los métodos fisicoquímicos pero siendo medioambientalmente sostenibles y reduciendo los costes operativos.

1.3. Contaminación por plásticos derivados del petróleo y sus alternativas biológicas: Polihidroxialcanoatos (PHAs)

1.3.1. Problemática ambiental

Los plásticos son polímeros orgánicos sintéticos que se acumulan rápidamente en múltiples entornos naturales debido a las pérdidas de productos plásticos, fragmentos originados durante la producción, el uso y el final de la vida útil de los plásticos. Se han observado plásticos en casi todos los sistemas fluviales e incluso en áreas naturales como las regiones polares y los glaciares de montaña. Asimismo, se ha observado un aumento exponencial en la contaminación por plásticos en los océanos y sedimentos (Schwarz y col., 2023).

En el año 2019 la producción de plásticos alcanzó la cifra de 368 millones de toneladas y se estima que en el año 2050 dicha cifra se cuadruplique. El 90% de dicha producción proviene de plásticos derivados del petróleo (Rivera-Garibay y col., 2020).

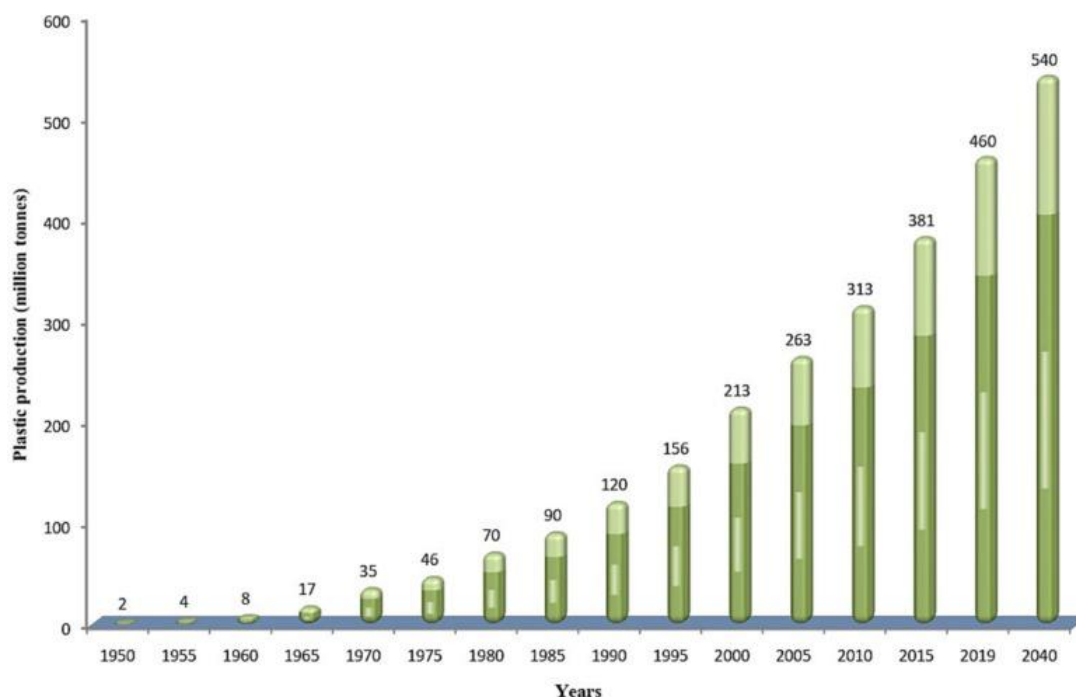


Figura 7: Perfil de la producción mundial anual de plástico. Fuente: Sharma y col. 2023

Los productos plásticos actualmente son elegidos como alternativa a materiales como el vidrio o el metal en varios sectores debido a su durabilidad y versatilidad, además de ser materiales muy livianos. Sin embargo, estas mismas características imponen efectos negativos al medioambiente, generando 25 millones de toneladas de residuos de los cuales cientos de miles son arrojados a ambientes marinos (G. García y col., 2013) . A lo largo del extenso proceso de degradación, los plásticos originan microplásticos (<5 mm) y nanoplásticos (<1 μ m), materiales que pueden tardar hasta 2500 años en mineralizarse por completo. Esto genera una alta persistencia ambiental, que es un factor importante en

los indicadores de toxicidad para el ecosistema y la salud humana. En segundo lugar, los plásticos tienen gran facilidad para transportarse por el medioambiente, lo que incrementa su exposición al ser humano. Un ejemplo de ello es la reciente detección de microplásticos en el torrente sanguíneo (Chamas y col., 2020).

El problema de la acumulación y, como consecuencia, de la contaminación por desechos plásticos se ha intentado resolver de diferentes maneras, ya sea con procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reúso. La mejor solución para abordar la contaminación de plásticos y microplásticos es la búsqueda de un material que posea sus mismas características, 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 polihidroxicanoatos (PHA), si bien su elevado coste de producción comparado con el de los plásticos de origen fósil hace que aún no sean competitivos en el mercado.

1.3.2. Polihidroxicanoatos (PHAs)

Los PHAs son biopolímeros de ácidos hidroxicanoicos que son sintetizados por microorganismos como inclusiones lipídicas intracelulares en forma de gránulos para el almacenamiento de energía. Sus propiedades mecánicas los convierten en los sustitutos de plásticos derivados del petróleo más prometedores, presentando la gran ventaja de ser biodegradables.

El científico francés Lemoigne en 1925 identificó por primera vez un PHA, el poli (3-hidroxi-butilato) (PHB) en la cepa *Bacillus megaterium* (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-hidroxi-valérico (3HV), 3-hidroxi-hexanoico (3HHx) y 3-hidroxi-heptanoico (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 PHA debido a su elevado consumo de plásticos (Chen, 2008). Hasta la fecha, se han logrado identificar 90 géneros de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas capaces de producir PHA en condiciones aerobias y anaerobias ((Kim y col., 2007), (Zinn y col., 2001)).

La acumulación de PHAs se da en el citoplasma celular como gránulos, que varían en tamaño de 0,2 a 0,5 μm , y puede surgir como respuesta a distintos factores de estrés, como la falta de nutrientes de su medio. Atendiendo a esa necesidad de limitación de nutrientes, los microorganismos se pueden clasificar en dos grupos. En el primer grupo se encuentran las bacterias que requieren limitación de un nutriente como oxígeno, nitrógeno, fósforo o magnesio para acumular PHA, y no lo acumulan durante la fase de crecimiento, por ejemplo, *Pseudomonas oleovorans* o *Pseudomonas putida*. El segundo grupo acumula PHA durante la fase de crecimiento y no requiere ninguna limitación de nutrientes, como *Escherichia coli* recombinante ((Muhammadi y col., 2015), (Nitschke y col., 2011)).

Clasificación de los PHAs

Atendiendo a su estructura, se han identificado alrededor de 150 cogéneros diferentes de PHA. En la Figura 8 se muestra la estructura general de los PHA (Raza y col., 2018).

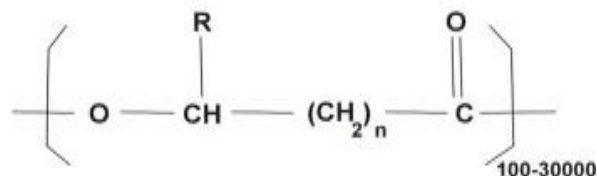


Figura 8: Estructura general de los polihidroxiálcanoatos con algunas modificaciones. Fuente: Ojumu y col., 2004.

Dependiendo del número de átomos de carbono de las unidades monoméricas se pueden clasificar, de acuerdo con su estructura química en: PHA de cadena corta (scl-PHA) compuestos de 4 o 5 átomos de carbono, PHA de cadena media (mcl-PHA) procedentes de monómeros de 6 a 14 átomos de carbono (Figura 9) y PHA de cadena larga (lcl-PHA) con monómeros de más de 14 átomos de carbono. Los mcl-PHA se observaron por primera vez en *P. oleovorans* en 1983 (Rai y col., 2011).

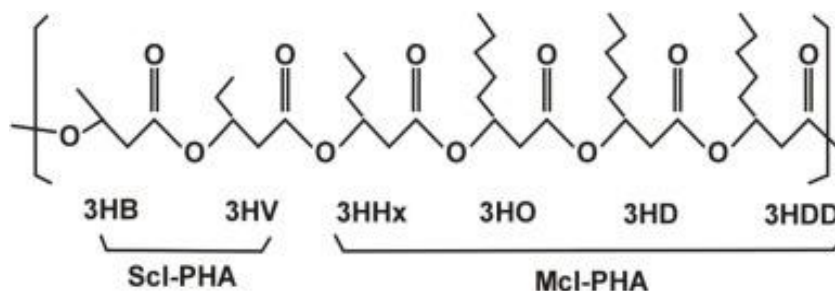


Figura 9: Estructura de los PHA con respecto a la clasificación, donde 3HB = 3-hidroxibutirato, 3HV = 3-hidroxivalerato, 3HHx = 3-hidroxihexanoato, 3HO = 3-hidroxiocetanoato, 3HD = 3-hidroxidecanoato y 3HDD = 3-hidroxidodecanoato. Fuente: Raza y col., 2018.

Asimismo, 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 que contienen ambos tipos (M. Ben-García, 2015).

Propiedades físicas y químicas

Las propiedades de los PHA difieren en función de las variaciones estructurales en los monómeros que constituyen los PHA y su composición química como homo o copolímeros. En general, son solubles en cloroformo y otros solventes clorados, son insolubles en agua y muestran propiedades elastoméricas y/o termoplásticas. El largo de la cadena influye en la hidrofobicidad del polímero, y en sus temperaturas de fusión y de transición vítrea (T_g), abarcando rangos entre 40 y 180 °C y -50 y 4 °C, respectivamente (Padermshoke y col., 2005).

En la Tabla 1 se recoge la comparación de las propiedades físicas de PHA y el polipropileno, un plástico derivado del petróleo.

Tabla 1: Comparación de las propiedades físicas del polipropileno (PP) y PHB

| 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 |

Aplicaciones

Debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, los PHAs se utilizan en diversos campos como la biomedicina ya que son componentes no tóxicos ni alergénicos y disponen de un grado de degradación controlado. El PHB y el polihidroxivalerato (PHV) son utilizados en ingeniería de tejidos como matrices para la proliferación *in vitro* de diferentes células humanas) (Sevastianov y col., 2003), y las microesferas de PHBV soportan neuronas primarias cuando se usan en la ingeniería de tejidos de neuronas (Chen y Tong, 2012). Además, debido a su baja respuesta inflamatoria los PHA, en concreto el PHB, pueden utilizarse como parches de bioimplantes en el cuerpo humano (Chen y Wu, 2005). Se han logrado sintetizar micro y nanoesferas de PHA pueden ser utilizadas en la liberación de fármacos cuando el recubrimiento empieza a degradarse. Por otro lado, los PHA han encontrado aplicaciones en los campos de la nanotecnología debido a su compatibilidad y quiralidad y su uso como productos químicos iniciales para muchos otros finales (Chen, 2010).

Propiedades como la baja difusividad del oxígeno y la resistencia al agua los hacen apropiados en aplicaciones de la industria del envasado y en la industria alimentaria, así como en la fabricación de botellas para bebidas o aditivos. Además, forman parte de diversos materiales de pesca o construcción y, debido a su alta resistencia al agua, pueden ser utilizados como látex acuoso. En la industria agrícola se utilizan para la fabricación de macetas biodegradables (con una degradación en torno a 120 días), tubos de irrigación y matrices para la liberación controlada de pesticidas y plaguicidas. También forman parte de la industria de los cosméticos y del cuidado de la piel ya que son capaces de absorber y retener aceites. Además, se pueden utilizar como sensores piezoeléctricos que midan ensayos de materiales, detectores ultrasónicos o en medidas de presión de teclados, auriculares o micrófonos (Álvarez, 2016).

Si bien los bioplásticos presentan una clara ventaja ambiental sobre los plásticos derivados del petróleo, el principal inconveniente es su elevado coste asociado a la producción fermentativa (Chaudhry y col., 2011) que varía entre 4-20 € kg⁻¹ PHA (Pérez y col., 2020), lo que dificulta su competitividad frente a la industria de los plásticos convencionales. Los factores principales que influyen en el coste de producción son: el tipo de fuente de carbono, el coste de funcionamiento del proceso de fermentación, la productividad del proceso, los rendimientos de las fuentes de carbono seleccionadas y el tratamiento posterior del bioplástico (Lee y Na, 2013). Puesto que entre un 40-50% de dicho coste viene dado por la fuente de carbono empleada, generalmente glucosa o ácidos grasos volátiles, es fundamental buscar alternativas que abaraten el proceso.

1.3.3. 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 PHA. Esta alternativa ofrece la doble ventaja de utilizar un residuo para producir materiales de valor añadido, abaratando al mismo tiempo 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.

Posteriormente, otros investigadores han realizado ensayos con otros microorganismos para la acumulación de PHAs a partir de distintos COVs. Por ejemplo, ensayos con la cepa *Rhodococcus aetherivorans* IAR1 aportaron la primera evidencia de síntesis de PHBV a partir de tolueno como única fuente de carbono, alcanzando productividades de 35% en moles de 3HB y 65% en moles de 3HV (Hori y col., 2009). Asimismo, Ni y col., 2010 evaluaron la producción por lotes de mcl-PHA a partir de *Pseudomonas fulva* TY16 utilizando benceno, tolueno y etilbenceno, obteniendo unas productividades de 6,7, 6,1 y 7,6%, respectivamente. Además, realizaron ensayos utilizando un sistema de alimentación de sustrato en fase gas en continuo en el que alcanzaron mayores productividades de PHA que en el ensayo anterior, obteniendo para benceno, tolueno y etilbenceno productividades de PHA de 19,1, 58,9 y 28,6%, respectivamente. Nikodinovic y col., 2008 evaluaron 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 los 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.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos en los procesos de degradación de COV y acumulación simultánea de PHA mencionados anteriormente, es necesario todavía optimizar el proceso de producción en continuo a partir de los COVs en fase gaseosa, y buscar nuevas cepas que alcancen altos rendimientos. El presente trabajo de fin de máster se centró en el estudio de degradación de tolueno y etilbenceno con la cepa *Pseudomonas putida*, con la finalidad de producir mcl-PHA sometiéndose a un proceso en una sola etapa en continuo donde se llevó a cabo la degradación de la mezcla de tolueno y etilbenceno (50/50 v/v) y la producción de PHA de forma simultánea.





2. OBJETIVOS

El objetivo general que se plantea en este trabajo fin de máster es el estudio de la producción de mcl-PHA en la cepa *Pseudomonas Putida mt-2* empleando COVs (tolueno y etilbenceno) como fuente de carbono, operando en un tanque agitado bajo condiciones limitantes de nitrógeno.

El objetivo general se abordó mediante los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar la capacidad de degradación de tolueno y etilbenceno por la cepa *P. putida*.
- Evaluar la capacidad de producción de mcl-PHA 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.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para llevar a cabo el ensayo se ha empleado la cepa *Pseudomonas putida* mt-2 (DSM 6125) adquirida en la colección de cultivo Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Para el cultivo de *P. putida*, 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 2.

Tabla 2: Composición del medio mineral

Solución I: Macronutrientes 10×

| | |
|----------------------------------|------------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 75,2 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 30 g L ⁻¹ |
| NaCl | 5 g L ⁻¹ |
| NH ₄ Cl | 5 g L ⁻¹ |

Solución II (20 mL L⁻¹)

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

Solución III (1 mL L⁻¹)

| | |
|---|-------------------------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O (1M) | 246,5 g L ⁻¹ |
|---|-------------------------|

Solución IV (0,3 mL L⁻¹)

| | |
|---|-------------------------|
| CaCl ₂ ·2H ₂ O (1M) | 147,7 g L ⁻¹ |
|---|-------------------------|

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

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| EDTA | 5 g L ⁻¹ |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,83 g L ⁻¹ |
| ZnCl ₂ | 0,168 g L ⁻¹ |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,13 g L ⁻¹ |
| CoCl ₂ ·2H ₂ O | 0,01 g L ⁻¹ |
| HBO ₃ | 0,01 g L ⁻¹ |
| MnCl ₂ ·4H ₂ 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 que resulta de la adición de las 7 soluciones recogidas en la Tabla 2, mientras que el medio mineral incompleto no llevaba solución II. En función de la cantidad de N a añadir, se prepararon distintos MSM incompletos añadiendo al volumen final cantidades variables de la solución I: MSM sin N (sin solución I); MSM-N 1 \times (con 5 g L⁻¹ de NH₄Cl en la solución I), MSM-N 2 \times (con 10 g L⁻¹ de NH₄Cl en la solución I) y MSM-N 10 \times (con 50 g L⁻¹ de NH₄Cl en la solución I).

Los contaminantes modelo fueron tolueno (C₇H₈, $\geq 99,5\%$) y etilbenceno (C₈H₁₀, $\geq 99,8\%$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU).

Para el análisis de PHA-mcl se utilizaron 1-propanol (C₃H₈O, 99,7%), ácido benzoico (C₇H₆O₂, $\geq 99,5\%$), ácido clorhídrico (HCl, 37% w/v), metanol (CH₃OH), ácido sulfúrico (H₂SO₄) y cloroformo (CHCl₃, $\geq 99\%$) adquiridos en PanReac AppliChem (Barcelona).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de inóculo

Dado que se trabajó con una cepa pura, tanto la preparación del inóculo como el crecimiento posterior se realizó en condiciones estériles. Se preparó el inóculo a partir de un cultivo crecido de *P. putida* almacenado a 4°C y se adicionan 20 mL, con una concentración de 1,06 g L⁻¹, a 200 mL de medio mineral completo (Tabla 2) 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 250 rpm (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) a una temperatura de 25 °C.

3.2.2. Procedimiento experimental

Para el crecimiento de la biomasa a partir de los compuestos orgánicos volátiles seleccionados y la acumulación de PHA-mcl se empleó un quimiostato Biostat ® A (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania) (Figura 12). 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, y sensores 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 consistió en una corriente de aire comprimido, con un caudal de 200 mL min⁻¹ regulado mediante un rotámetro, en la que se inyecta la mezcla de tolueno y etilbenceno (50:50 v/v) en fase líquida suministrado mediante una bomba de jeringa a una velocidad de 0,04 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 al reactor 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 del gas de 10 minutos.

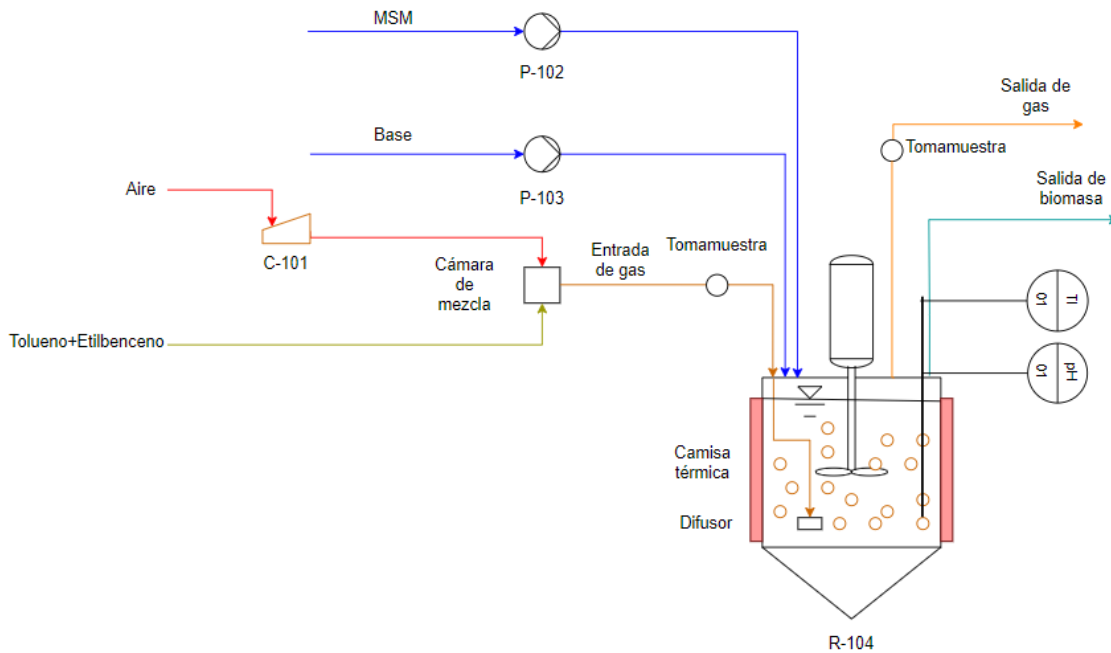


Figura 10: Diagrama de flujo sistema experimental

En la Figura 10 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 (NaOH) cuya función es ajustar el pH del medio, y un reactor de tanque agitado (R-104).

El 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 *P. putida* en una concentración de 0,01 g L⁻¹ bajo condiciones estériles con un medio MSM-N (1x) (Tabla 2), alcanzando un volumen final de 2 L.

- Etapa 1 (días 0-39)

El ensayo comenzó con una etapa de crecimiento de la biomasa en la que se partió de las condiciones de operación mencionadas anteriormente y tuvo una duración de 39 días. El objetivo fue alcanzar un rendimiento estable de eliminación de COVs para una concentración de biomasa de 1,5 g L⁻¹. Para ello, se suministró medio rico en nitrógeno de acuerdo con los requerimientos del sistema intercambiando 200 mL de medio de cultivo por 200 mL de medio MSM-N (1x) (Tabla 2) los primeros 15 días y, en vista del elevado consumo de nitrógeno, se incrementó la dosis de nitrógeno adicionada añadiendo 250 mL de medio MSM-N (2x) (Tabla 2) hasta finalizar la etapa. Asimismo, con el objetivo de reducir la concentración de posibles metabolitos secundarios generados en el proceso de degradación de COVs, además de favorecer el crecimiento de la biomasa, el día 26 se realizó un lavado intermedio del sistema intercambiando 1 L de MSM-N (2x) (Tabla 2), por 1 L de biomasa decantándola previamente y devolviéndola al reactor con el objetivo de no modificar la concentración presente en el reactor.

- Etapa 2 (días 40-73)

En la segunda etapa se iniciaron los ciclos de adición y limitación de nitrógeno. Durante los primeros 14 días de etapa se operó adicionando N al medio con el objetivo de

incrementar la concentración de biomasa hasta 2 g L^{-1} y así comenzar los ciclos de limitación. Para ello, se adicionó 500 mL de MSM-N (2x) (Tabla 2) el día 52 y 300 mL de MSM-N (10x) (Tabla 2) el día 54.

Una vez alcanzada la concentración de biomasa deseada el día 54, el sistema permaneció sin intercambio de medio hasta el día 59 en el que se consumió el nitrógeno en su totalidad y se estableció un ciclo de limitación de 10 días con el objetivo de generar acumulación de PHA. Al igual que en la etapa anterior, con la finalidad de evitar la acumulación de biomasa muerta y de metabolitos secundarios se realizó un intercambio diario de 50 mL de medio MSM-sin N (Tabla 2).

Para todas las etapas del ensayo, se determinaron las concentraciones de tolueno y etilbenceno tanto en la entrada como en la salida y el CO_2 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 a partir del día 51 y sólidos suspendidos totales, junto con el análisis de la concentración de carbono orgánico total y nitrógeno total disuelto y de aniones (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-}).

3.2.3. Métodos analíticos

La evolución de la concentración de contaminantes se llevó a cabo mediante cromatografía de gases en 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 $250 \mu\text{L}$. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Por otro lado, el análisis de CO_2 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 $13,7 \text{ mL min}^{-1}$. La inyección de las muestras gaseosas se realizó con una jeringa de gases de $100 \mu\text{L}$.

La medida de caudal se llevó a cabo mediante el desplazamiento de volumen de líquido, empleando una probeta de 250 mL cronometrando durante 60 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 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 $0,22 \mu\text{m}$. 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 $0,45 \mu\text{m}$.

Para realizar la extracción y análisis de mcl-PHA se siguieron dos protocolos de extracción y, debido a la ausencia de patrones para la detección y cuantificación del biopolímero, se

realizó un protocolo de cuantificación gravimétrico con la finalidad de cuantificar la presencia de PHA en las muestras.

Protocolos de extracción de mcl-PHA

- Pérez y col, 2019

Se siguió el protocolo descrito en (Pérez y col., 2019) y adaptado en el laboratorio, que consistió en una propanólisis ácida con HCl con análisis posterior 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. Para la toma de muestra, se centrifugaron 2 mL del caldo de cultivo durante 5 min a 10000 rpm. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Para realizar el análisis, las muestras se sometieron a digestión con la solución 1- propanol y HCl (80:20 v/v), utilizando ácido benzoico (preparado en 1-propanol) como patrón interno. Se describe a continuación el protocolo de forma detallada:

Se resuspendió el pellet de las muestras en 1 mL de 1-propanol – HC y se traspasó a tubos HATCH. Tras ello, se añadieron 2 mL de CH_3Cl y 50 μL de patrón interno en cada tubo. La digestión de las muestras se llevó a cabo en un termo-reactor a 100°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de agua tipo I en cada tubo y se vortearon. Transcurridos 5-10 min se observa la formación de dos fases, extrayéndose entonces la fase orgánica y filtrando la fase orgánica con filtros de $0,22\ \mu\text{m}$. 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 5 min para después iniciarse la rampa de temperatura a una velocidad de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 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 $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

- Pacheco y col., 2019

De forma análoga, se siguió el protocolo descrito en (Pacheco y col., 2019) que consistió en la metanólisis de la biomasa liofilizada 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.

Para la toma de muestra, se centrifugaron 2 mL del caldo de cultivo durante 5 min a 10000 rpm. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Para realizar el análisis, las muestras se sometieron a digestión con las soluciones metanol-ácido sulfúrico (15:85 v/v) y cloroformo-ácido benzoico, este último utilizado como patrón interno. El protocolo detallado es el siguiente:

La biomasa liofilizada se traspasó a tubos HATCH y se adicionaron 2 mL de la solución metanol-ácido sulfúrico y 2 mL de cloroformo-ácido benzoico. La digestión de las muestras fue llevada a cabo en un termo-reactor a 100°C durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de agua tipo I y se vortearon. Transcurridos 5-10 min se observa la formación de dos fases, extrayéndose la fase orgánica y filtrando la fase orgánica con filtros de $0,22\ \mu\text{m}$. 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 5 min para después iniciarse la rampa de temperatura a una velocidad de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 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 $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Protocolo de cuantificación de mcl-PHA

Para cuantificar y verificar la producción de PHA, se siguió un método gravimétrico basado en la formación y determinación de la masa de una biopelícula de PHA formada a partir de muestras del reactor.

En tubos Falcon se centrifugaron 25 mL del caldo de cultivo durante 8 min a 7800 rpm. Tras retirar el sobrenadante se adicionaron 4 mL de solución de NaCl (0,9% en peso), se resuspendió la muestra y se centrifugó de nuevo. Tras ello, se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso hasta que el sobrenadante no presentó turbidez. La muestra se trasvasó a un recipiente previamente secado en estufa y se introdujo de nuevo en estufa a 60°C durante 24 horas. Una vez secada la muestra se procedió a la molienda de la misma y se trasvasó a los tubos HATCH junto con 4 mL de cloroformo. La solución se sometió a digestión en un termo-reactor a 100 °C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo y enfriadas las muestras a temperatura ambiente, se procedió a filtrar las muestras y se dejaron evaporar, quedando únicamente la biopelícula de PHA en el vial.

3.2.4. Cálculos

La capacidad de eliminación del sistema se determinó a través del cociente de la diferencia de concentración de tolueno y etilbenceno a la entrada $[C_i]_{in}$ y a la salida $[C_i]_{out}$ del sistema entre el volumen del reactor ($V_{reactor}$, m³), todo ello multiplicado por el caudal de operación del gas (Q_{gas} , m³ h⁻¹).

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

$$EC \left(\frac{g C_{ET}}{m^3 \cdot h} \right) = \frac{[C_{ET}]_{in} - [C_{ET}]_{out}}{V_{reactor}} \cdot Q_{gas} \quad \text{Ec. 2}$$

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

$$RE(\%) = \frac{[C_T]_{in} - [C_T]_{out}}{[C_T]_{in}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3}$$

$$RE(\%) = \frac{[C_{ET}]_{in} - [C_{ET}]_{out}}{[C_{ET}]_{in}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4}$$



4. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados del reactor de tanque agitado alimentado en continuo con tolueno y etilbenceno (50:50 v/v) durante 73 días de operación.

4.1. Etapa 1: Crecimiento celular hasta la concentración objetivo

Una vez inoculada la cepa *P. putida* con una concentración en nitrógeno de 150 mg L^{-1} , se llevó a cabo una etapa de aclimatación del sistema y crecimiento de la biomasa hasta una concentración de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, operando a un volumen útil de 2 L, una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y un pH constante de 7. La presente etapa tuvo una duración de 39 días y consistió en someter a la biomasa a consumo de tolueno y etilbenceno que actuaron como fuente de carbono y realizar un seguimiento de la capacidad de eliminación de los COVs mencionados y el consumo de nitrógeno, además del seguimiento de la evolución de la concentración de biomasa en el sistema.

La etapa comenzó con una concentración de biomasa de $0,09 \text{ g L}^{-1}$ y 150 mg L^{-1} de nitrógeno, variable que, junto con la fuente de carbono suministrada a una concentración variable de $5\text{-}3 \text{ g m}^{-3}$ permitió el crecimiento celular.

A continuación, se analizarán los resultados obtenidos distinguiendo entre los parámetros determinados en fase líquida y fase gaseosa.

4.1.1. Fase gas

Eficacia de eliminación de COVs

Durante los primeros 5 días, la concentración promedio de tolueno alimentada al sistema fue de $2,6 \pm 0,19 \text{ g m}^{-3}$, mientras que la de etilbenceno fue de $3,2 \pm 0,21 \text{ g m}^{-3}$. Durante estos primeros días, las eliminaciones de tolueno y etilbenceno fueron de 59% y 43%, respectivamente. Para prevenir la inhibición del sistema y promover un aumento de las eficacias de degradación, desde el día 8 al 25 se redujeron las concentraciones de entrada de ambos contaminantes a valores de $\approx 3 \text{ g m}^{-3}$. Esto, permitió aumentar la eliminación de los COVs hasta estabilizarse en 100% a partir del día 23 para el tolueno y a partir del día 37 para el etilbenceno.

Finalmente, en vista del buen rendimiento de eliminación presentado y de la ausencia de indicios de toxicidad en el sistema, el día 26 se incrementó la concentración de tolueno y etilbenceno a $3,47 \pm 0,375 \text{ g m}^{-3}$ que, junto con el intercambio de medio con previa decantación de biomasa realizado ese mismo día, permitió mantener eficacias de eliminación de 100% hasta el final del experimento.

La siguiente gráfica muestra la variación de la concentración a la entrada y a la salida del sistema en función del tiempo.

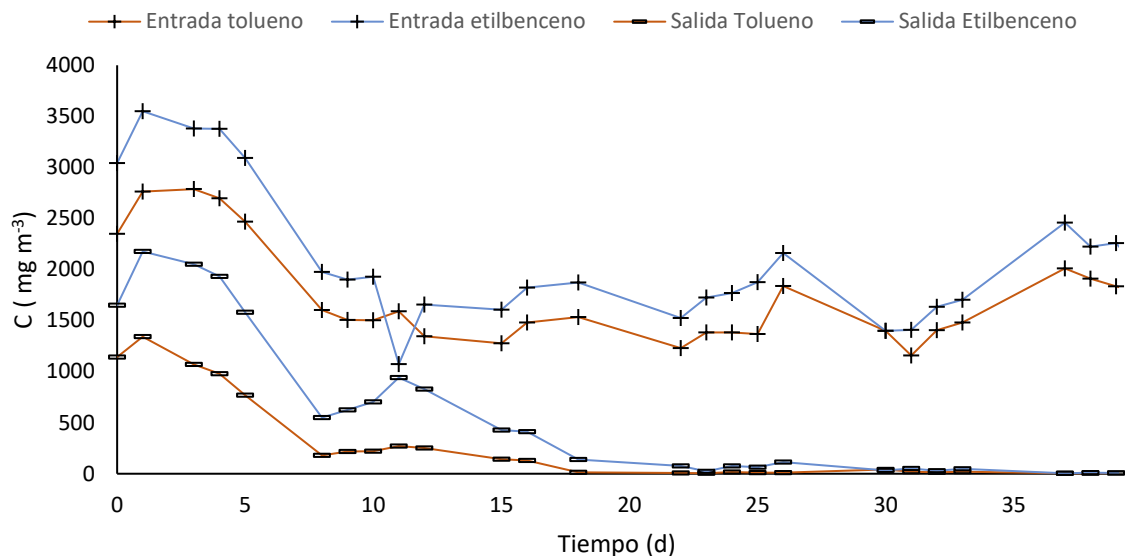


Figura 11: Evolución temporal de las concentraciones de entrada (+) y salida (-) de tolueno (naranja) y etilbenceno (azul)

Asimismo, se representa la eficacia de eliminación para cada componente:

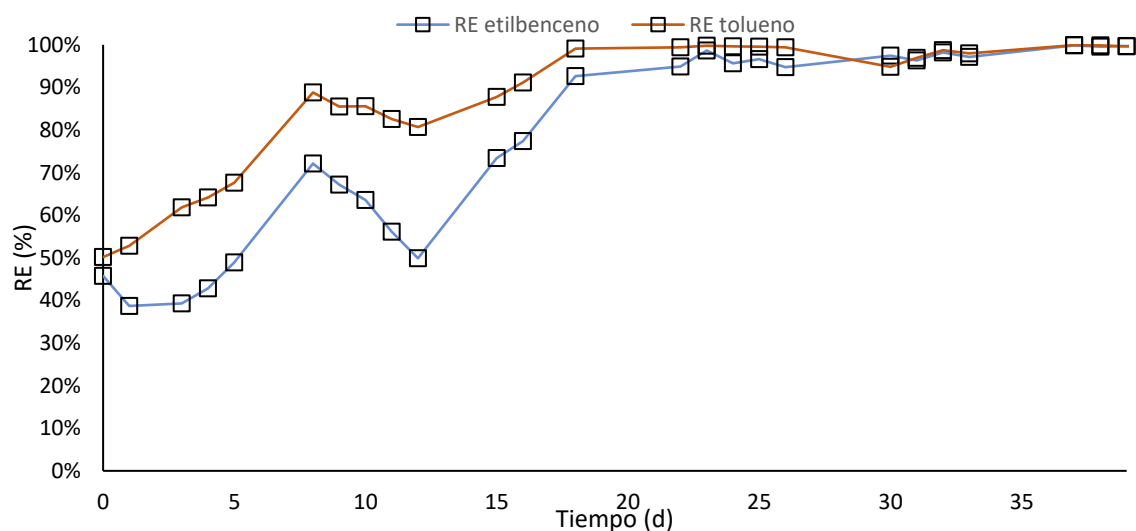


Figura 12: Evolución temporal de la eficacia de eliminación de tolueno (RE, □ naranja) y la eficacia de eliminación de etilbenceno (RE, □ azul) en la etapa 1.

CO₂ producido

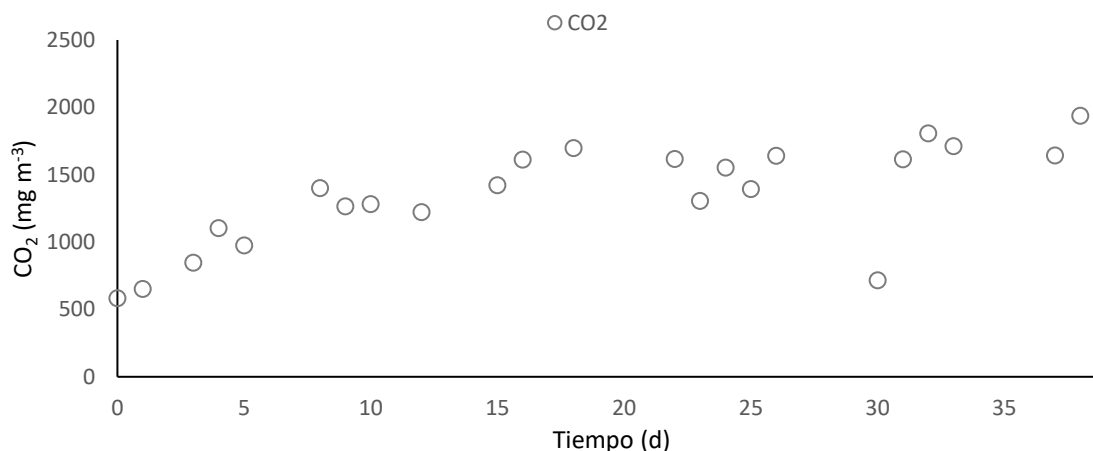
La determinación del CO₂ producido por el sistema proporciona información sobre la capacidad del sistema de mineralizar la fuente de carbono suministrada. Dicho parámetro se ha determinado en base a la producción teórica de CO₂ frente a la registrada a lo largo del ensayo.

La tasa de mineralización a CO₂ aumentó de forma progresiva a lo largo de la etapa, estabilizándose al final de la misma. Los 5 primeros días de etapa, en los que la concentración de biomasa se encontraba entre 0,1 y 0,23 g L⁻¹, se registró una tasa de mineralización media del carbono procedente del tolueno de 8,8±3,5% y del etilbenceno de 7,07±2,9%. Los valores obtenidos corresponden con los valores esperados debido a que, mientras el microorganismo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento,

invertirá un mayor porcentaje de carbono en el crecimiento. Es por ello que, a medida que la concentración de biomasa crece, también lo hace la tasa de mineralización debido a que, una vez que se alcanza la fase estacionaria, se destina un menor porcentaje de carbono a su crecimiento.

Los días 6-24, en los que la concentración de biomasa se encontró comprendida entre 0,26 y 1,09 g L⁻¹, la tasa media de mineralización registrada para el tolueno fue 30,39±4,7% y para el etilbenceno de 24,36±3,9% y los días 25-39, en los que la concentración de biomasa aumenta hasta un valor de 1,55 g L⁻¹, la tasa de mineralización se estabiliza registrando una media para el tolueno de 30,56±7,9% y para el etilbenceno de 25,84±6,3%, donde se puede observar una clara estabilización.

Figura 13:



Evolución temporal de la concentración de CO₂ en la etapa 1

4.1.2. Fase líquida

Nitrógeno total

La concentración de nitrógeno partió de un valor de 142,14 mg L⁻¹ descendiendo progresivamente hasta un valor de 12,87 mg L⁻¹ el día 22. En vista del elevado consumo de nitrógeno, se duplicó la dosis adicionada en el medio fresco el día 22, evitando de esta manera la limitación del sistema. Sin embargo, debido a la alta demanda de nitrógeno a causa del alto crecimiento de la biomasa el día 26 se realizó un aporte adicional de nitrógeno hasta restaurar la concentración inicial en el sistema de 140 mg L⁻¹. A partir del día 27, se realizaron intercambios de medio cuando el sistema así lo requirió hasta el día 39 en que se alcanzó la completa eliminación de COVs para la concentración celular deseada.

Uno de los objetivos de esta primera etapa fue determinar la tasa de consumo específica de nitrógeno para determinar el consumo de nitrógeno por *P. putida* y posteriormente poder establecer los ciclos de limitación.

Durante los 12 primeros días de operación, la tasa media específica de consumo de nitrógeno fue de 8,8±1,6 mg d⁻¹, resultado coherente en vista de la reducida concentración de biomasa que presentó el sistema. Sin embargo, una vez la concentración de biomasa fue aumentando, la tasa de consumo también lo hizo, obteniendo un valor medio de 13,1±7,6 mg d⁻¹ para los días 18-26, en los que la concentración de biomasa fue 0,7-0,9 g L⁻¹. Asimismo, desde el día 27 hasta el día 39, en los que la concentración de biomasa fue creciendo hasta alcanzar un valor máximo el día 39 de 1,56 g L⁻¹, se obtuvo una tasa

media de consumo específico de nitrógeno de $33,43 \pm 8,5 \text{ mg d}^{-1}$, valor superior a los obtenidos en días anteriores debido al crecimiento de la biomasa.

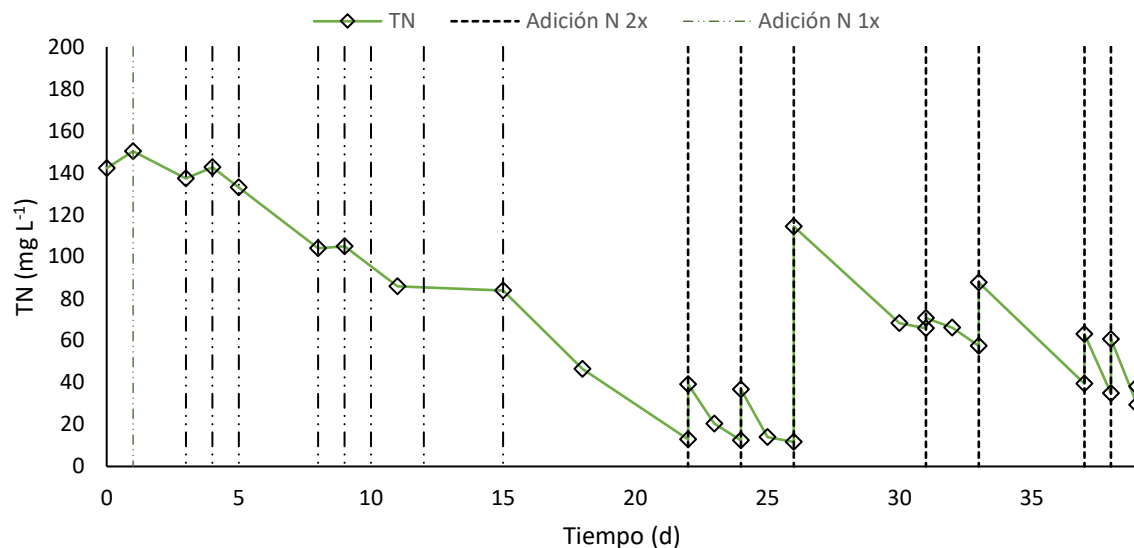


Figura 14: Evolución temporal de la concentración de N (\diamond) en la etapa 1. Las líneas verticales punteadas representan los intercambios de medio del reactor

Concentración de biomasa

La concentración de biomasa partió de un valor de $0,09 \text{ g L}^{-1}$, aumentando progresivamente hasta $1,55 \text{ g L}^{-1}$ el día 39 que se dio por finalizada la etapa.

La medida de la concentración celular los doce primeros días se obtuvo mediante el análisis de densidad óptica del medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento agregado de la biomasa puede conllevar error en el valor obtenido para dicho parámetro, por lo que una vez alcanzada una mayor concentración de biomasa se determinó la misma mediante el análisis de SST en el medio de cultivo.

Para promover el crecimiento celular, el día 26 parte de la biomasa fue decantada y resuspendida con medio fresco (representado en la Figura 14 mediante una línea vertical) y así eliminar la biomasa muerta y metabolitos secundarios presentes en el sistema. Se puede observar un crecimiento constante a lo largo de la etapa, con una tasa media los doce primeros días de $13,6 \pm 2,3 \text{ mg d}^{-1}$. Si bien es cierto que el crecimiento medio es el indicado anteriormente, existen días al inicio de la etapa en los que no se ha registrado crecimiento de la biomasa, suceso que pudo deberse a la determinación del valor de biomasa mediante densidad óptica, que conlleva un elevado error de medida debido a los agregados que forma esta bacteria. Sin embargo, una vez que se comenzó a medir mediante el análisis de SST se registró un crecimiento más constante de $87,9 \pm 19,4 \text{ mg d}^{-1}$ por lo que se puede afirmar que el análisis de SST es un método más preciso.

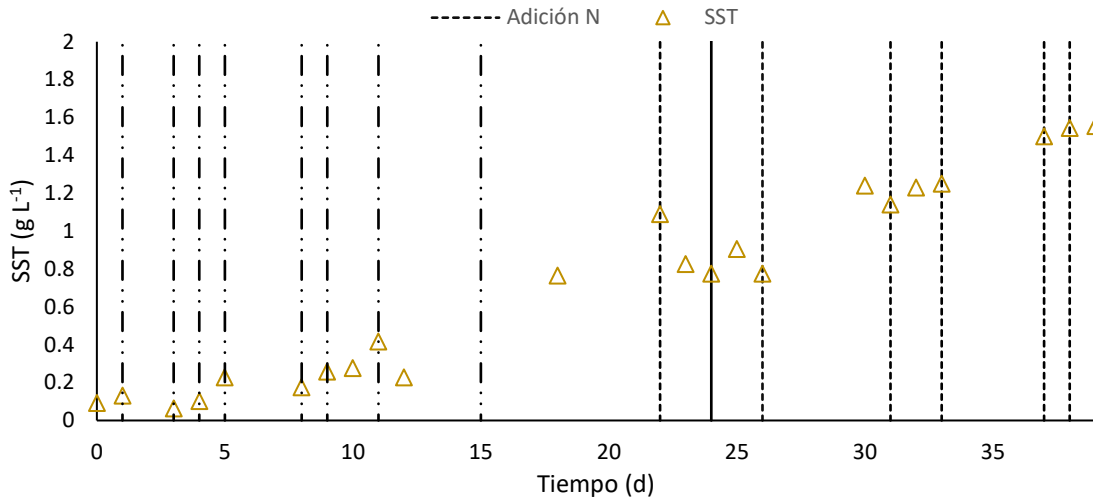


Figura 15: Evolución temporal de la biomasa presente en el reactor en la etapa 1 (Δ). Las líneas verticales representan los intercambios de medio del reactor.

Carbono orgánico total

Para comprobar la acumulación de metabolitos secundarios, se llevó a cabo un seguimiento de carbono orgánico disuelto presente en el medio de cultivo. A lo largo de la etapa, la concentración de carbono orgánico aumentó desde 51,24 mg L⁻¹ el día 1 hasta 77,61 mg L⁻¹, valor máximo que se alcanzó el día 24. Es por ello por lo que el día 26, en vista de la elevada concentración de TOC registrada y de no resultar suficientes los intercambios de medio anteriores, se realizó un intercambio de un volumen mayor de medio a fin de reducir la concentración de carbono orgánico y, con ello, los posibles metabolitos secundarios formados.

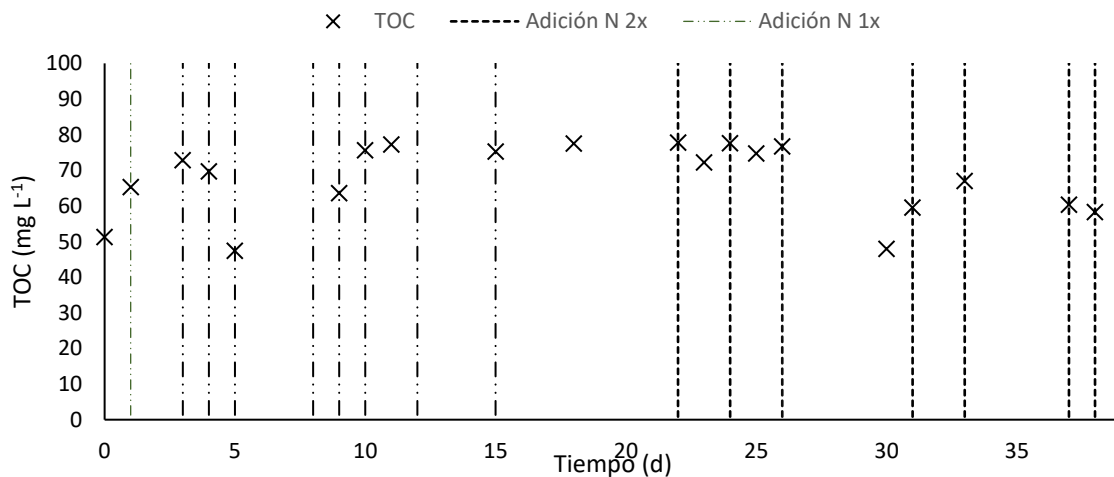


Figura 16: Evolución temporal del carbono orgánico total (x) en la etapa 1

Si se analizan los datos de forma conjunta se puede afirmar que el nitrógeno es un factor necesario para el crecimiento de la biomasa. A lo largo de la etapa los requerimientos de nitrógeno del sistema fueron mayores debido a la mayor concentración de biomasa registrada, por lo que los días 23-26 no se adicionó suficiente nitrógeno registrando unas tasas de consumo específicas de nitrógeno de 18,8 y 2,06 mg d⁻¹, respectivamente, lo que generó una disminución de la concentración celular. Sin embargo, el rendimiento de eliminación de tolueno y etilbenceno no se vio afectado por la concentración de nitrógeno ya que, como se puede observar, una vez que se alcanza el rendimiento de eliminación del

100% para ambos compuestos no vuelve a disminuir. Si bien es cierto que tanto el tolueno como el etilbenceno se logran eliminar por completo al final de la etapa y, como se verá más adelante, a lo largo del ensayo, se puede afirmar una clara preferencia por el tolueno ya que la eliminación completa del etilbenceno se alcanza el día 23 y la de tolueno el día 18.

4.2. Etapa 2: Ciclos de adición y limitación

Una vez estabilizado el rendimiento de eliminación del sistema y optimizado la tasa de dilución y adición de nitrógeno en función de las tasas de consumo obtenidas en la etapa anterior, se establecieron ciclos de adición y limitación de nitrógeno con el fin de maximizar la acumulación de mcl-PHA. La etapa tuvo una duración de 33 días que finalizó a causa de una posible contaminación del sistema, como se detallará más adelante, que generó un decrecimiento celular y redujo la eficacia de eliminación.

La etapa comenzó el día 40 con una concentración de biomasa inicial de $1,52 \text{ g L}^{-1}$, $29,43 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrógeno y $60,98 \text{ mg L}^{-1}$ de carbono orgánico.

4.2.1. Fase gas

Eficacia de eliminación de COVs

El nuevo modo de operación establecido no afectó al rendimiento de eliminación, que se mantuvo constante con un valor de 100% para ambos COVs (Figura 17). De la misma manera que en la etapa anterior, la elevada eficacia a la hora de degradar tolueno y etilbenceno pudo estar determinada por la concentración de nitrógeno presente en el sistema y es por ello, que los últimos días de etapa, en los que el sistema se encuentra limitado en nitrógeno como se detallará más adelante, el rendimiento de eliminación disminuyó.

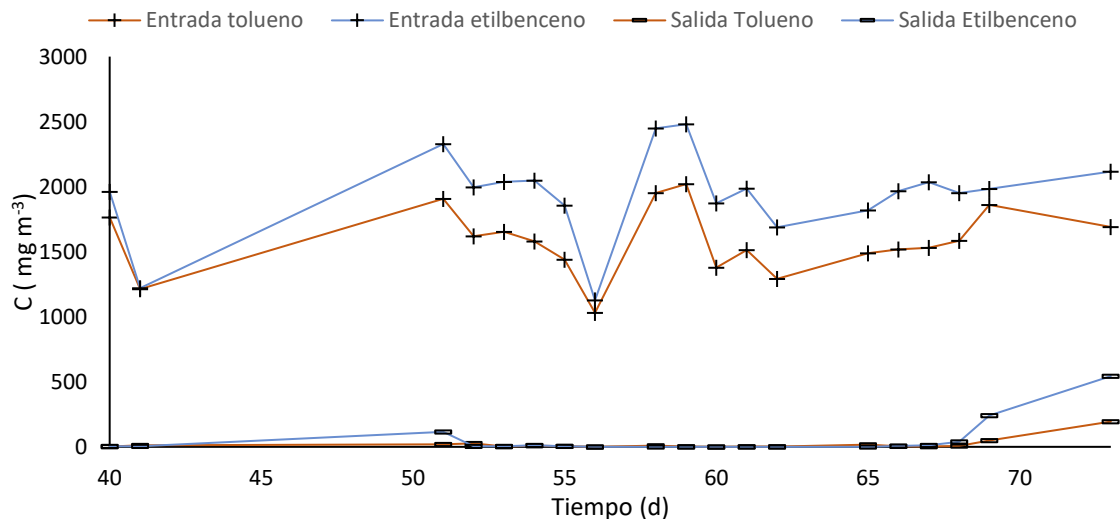


Figura 17: Evolución temporal de las concentraciones de entrada (+) y salida (-) de tolueno (línea naranja) y etilbenceno (línea azul) en la etapa 2.

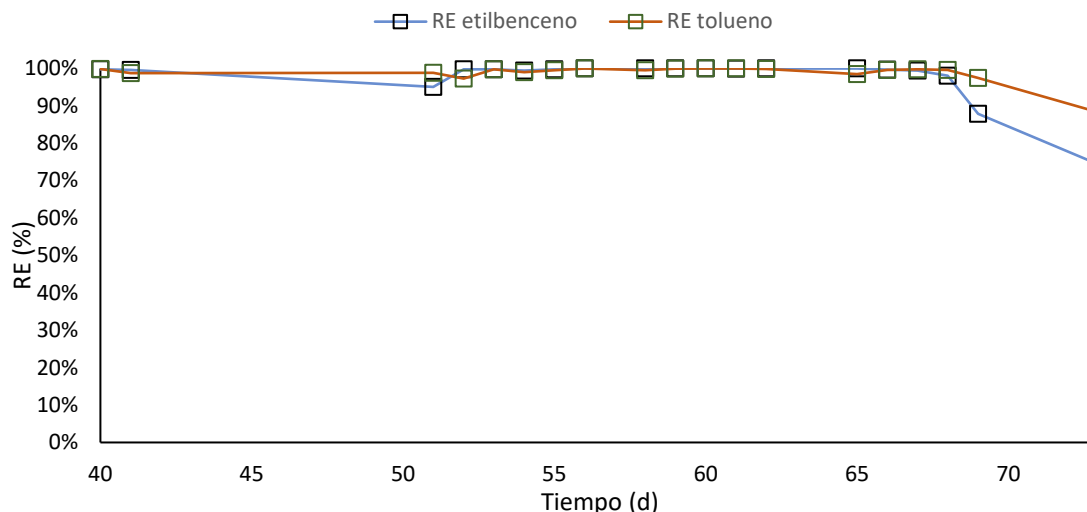


Figura 18: Evolución temporal de la eficacia de eliminación de tolueno (RE, □ naranja), la eficacia de eliminación de etilbenceno (RE, □ azul) en la etapa 2

CO₂ producido

Al igual que en la etapa anterior, se monitoreó la producción de CO₂ a lo largo de la etapa. De forma análoga, se determinó la tasa de mineralización de CO₂.

Los días 40 y 41, con una concentración de biomasa de $3,2 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$, se registró una tasa de mineralización de $48,3 \pm 5,5\%$ para el tolueno y $44,5 \pm 11,1\%$ para el etilbenceno, valores coherentes en vista de lo descrito en la producción de CO₂ de la etapa anterior (apartado 4.1.1) donde la biomasa se encontró en fase estacionaria. Sin embargo, como se describirá detalladamente en apartados posteriores, se diluyó parte del caldo de cultivo, lo que supuso la disminución de la concentración de biomasa. Es por ello, que los días 51-66, la tasa de mineralización descendió de nuevo registrando un valor medio de $37,7 \pm 5,4\%$ para el tolueno y $29,9,7 \pm 4,5\%$ para el etilbenceno. A partir del día 67, la tasa descendió progresivamente hasta la finalización del experimento.

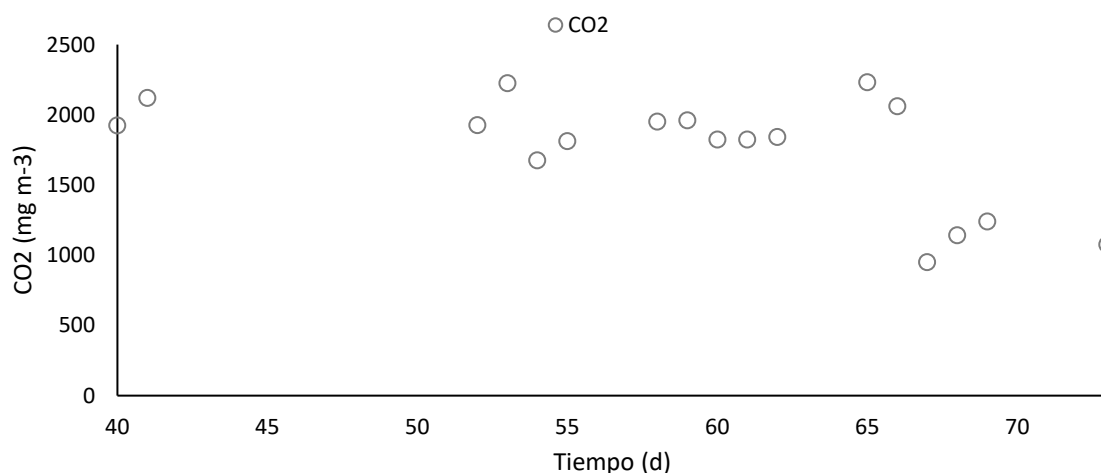


Figura 19: Evolución temporal del CO₂ producido en la etapa 2

4.2.2. Fase líquida

Nitrógeno total

Durante la presente etapa se realizaron dos aportes intermedios de nitrógeno con la finalidad de aumentar la concentración celular. El día 52 se alcanzó una concentración de biomasa de $3,42 \text{ g L}^{-1}$, siendo adecuada para comenzar ciclos de limitación.

Se realizó un ciclo de adición-limitación en nitrógeno a partir del 59 para una concentración de biomasa de 2 g L^{-1} cuya duración fue de 10 días. Si bien es cierto que la presente etapa comenzó con una concentración de biomasa de $3,42 \text{ g L}^{-1}$, adecuada para establecer un ciclo de limitación de nitrógeno, el día 52 se intercambiaron 500 mL de medio sin decantación previa, lo que supuso una retirada de $0,45 \text{ g}$ de biomasa y una concentración final de $1,8 \text{ g L}^{-1}$. Es por ello, que se realizó un nuevo aporte de nitrógeno intercambiando 300 mL de MSM-N ($10\times$) con el objetivo de incrementar la concentración de biomasa. El día 59 el sistema ya se encontraba limitado en nitrógeno y dio comienzo el ciclo de limitación.

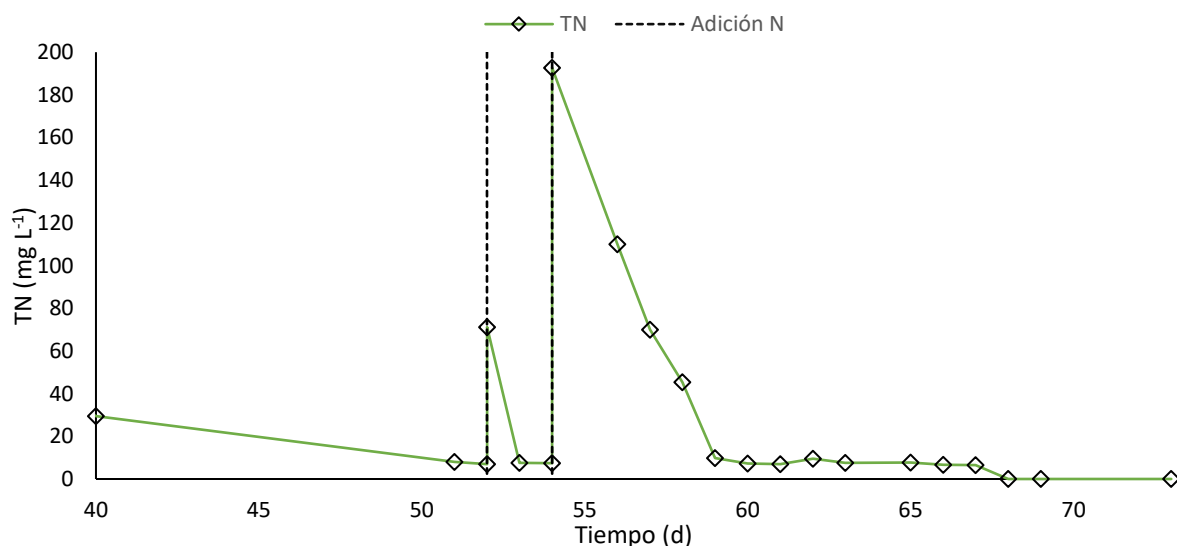


Figura 20: Evolución temporal de la concentración de N (\diamond) en la etapa 2. Las líneas verticales punteadas representan los intercambios de medio del reactor

Concentración de biomasa

La segunda etapa comenzó con una concentración de biomasa de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, alcanzando un valor máximo de $3,4 \text{ g L}^{-1}$ el día 51, concentración adecuada para comenzar a limitar en N. Sin embargo, el día 52 se cometió un error experimental en el que se intercambiaron 500 mL de biomasa sin ser decantada previamente por medio fresco, lo que supuso una retirada aproximada de $0,45 \text{ g}$ de biomasa alcanzando una concentración en el sistema de $1,8 \text{ g L}^{-1}$. El error cometido supuso el retraso de la limitación del sistema hasta el día 59, en el que se registró una concentración de 2 g L^{-1} , tras un nuevo aporte de nitrógeno.

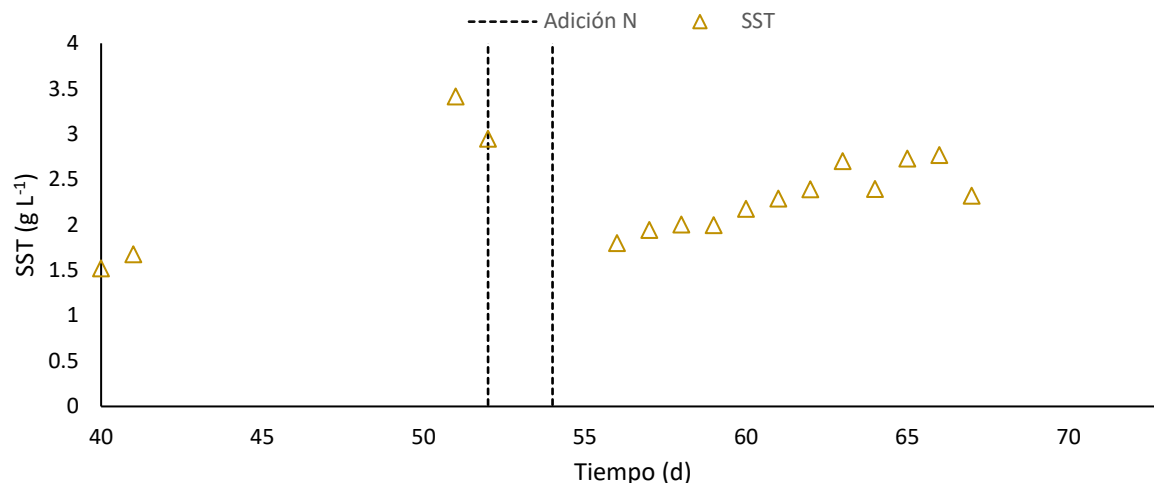


Figura 21: Evolución temporal de la biomasa presente en el reactor en la etapa 2 (Δ). Las líneas verticales representan los intercambios de medio del reactor.

Carbono orgánico total

La etapa comenzó con una concentración de carbono orgánico total de 61 mg L⁻¹, valor que fue decreciendo a medida que se comenzó a limitar en nitrógeno el sistema, manteniéndose entre 40 y 50 mg L⁻¹ durante los días 52-62 de operación.

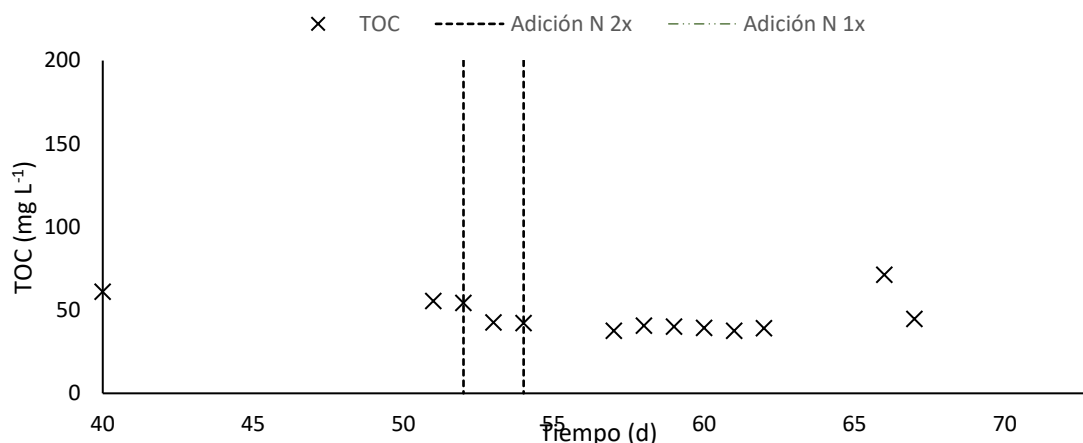


Figura 22: Evolución temporal del carbono orgánico total (x) en la etapa 2. Las líneas verticales punteadas representan intercambios de medio en el reactor.

Producción de PHAs

Se realizaron limitaciones en nitrógeno en la segunda etapa del ensayo que comenzó con mínimas acumulaciones de 1,3±0,7% de PHB los días 52 y 53 para concentraciones celulares de 3,4 g L⁻¹, mientras el sistema no se encontraba limitado en nitrógeno. Por otro lado, debido a un error experimental, ya mencionado en apartados anteriores, en el que se diluyó parte del reactor disminuyendo la concentración celular hasta 1,8 g L⁻¹, se registraron acumulaciones inferiores al 1% por lo que se considera que no ha existido acumulación.

Es por ello que, con el objetivo de aumentar la concentración de biomasa y maximizar la producción de PHA, se realizó un nuevo aporte de nitrógeno el día 54. La concentración de biomasa aumentó y el día 60, en el que el sistema ya se encontraba limitado de nuevo, se registró una acumulación de PHB de 20,64% para una limitación de 4 días y una concentración de biomasa de 2,18 g L⁻¹. Los días 62 y 63, con una concentración de

sólidos de $2,4 \text{ g L}^{-1}$, se registró una acumulación de PHB en 7 días de limitación de 15,1 % y 8,1%, respectivamente. Los días posteriores se registró una disminución progresiva de la concentración de biomasa y de la acumulación de PHB; el día 66 descendió hasta 3,4% y los días 67 y 69 hasta 2,5% y 3,3%, respectivamente.

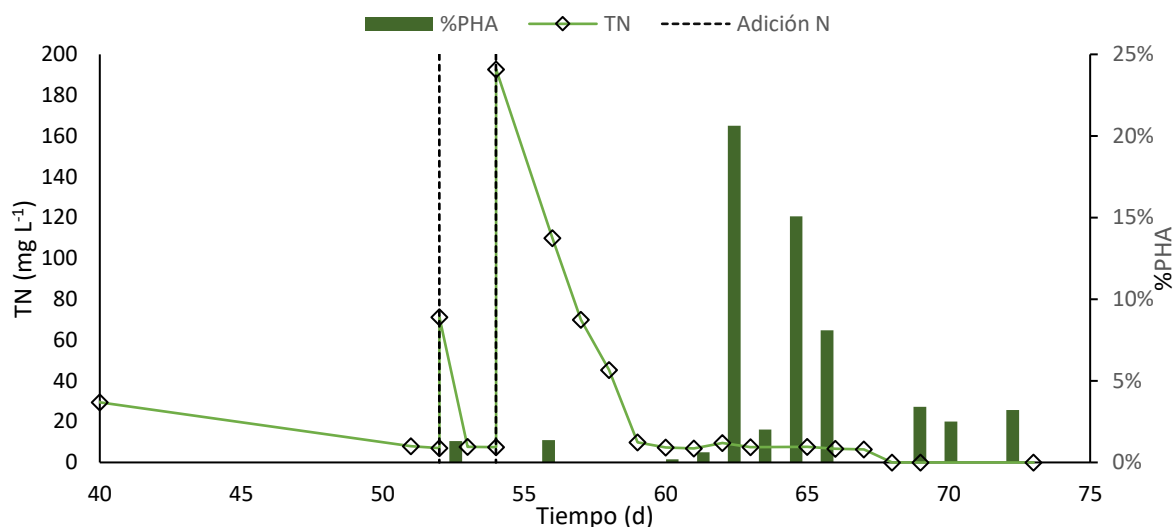


Figura 23: Evolución temporal de la concentración de N (\diamond) y porcentaje de PHA acumulado (barras verticales). Las líneas verticales representan los intercambios de medio del reactor

La disminución inicial en la concentración de PHB pudo estar asociada a que el propio microorganismo haya podido consumir el PHB generado tras la prolongada limitación de N a la que se ha sometido al sistema, lo que además correspondería con la disminución de la eficacia de eliminación de COVs al final de los 8 días de limitación. Por otro lado, tras observar un cambio en el aspecto del caldo de cultivo de reactor, que coincidió también con la disminución del rendimiento de eliminación al final del ensayo y una caída de concentración de biomasa, se tomaron muestras para observar al microscopio. Esto mostró la presencia de numerosas bacterias filamentosas (Figura 24) contaminando la cepa de *P. putida* inicialmente inoculada.



Figura 24: Imagen al microscopio del caldo de cultivo tras la contaminación del sistema

4.3. Comparación de los métodos de análisis de los PHAs sintetizados

Como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, se han comparado tres métodos analíticos para determinar y cuantificar los PHAs sintetizados por *P. putida*, con los siguientes resultados (Tabla 3):

Tabla 3: Comparación de los diferentes métodos analíticos llevados a cabo

| Muestra PHA (día) | Propanólisis – GC-MS | Metanólisis - GC-MS | Análisis gravimétrico |
|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| 51 | 1,31% | 0.18% | - |
| 54 | 1,38% | 0.21% | - |
| 55 | 0,02% | 0.02% | 1,44% |
| 58 | 0,19% | 0.19% | 1,40% |
| 59 | 0,63% | 0.53% | 1,40% |
| 60 | 20,64% | 0.21% | 1,84% |
| 61 | 2,03% | 0.02% | 1,40% |
| 62 | 15,07% | 1.34% | 4,52% |
| 63 | 8,1% | 1.09% | 0,30% |
| 66 | 3,4% | 1.62% | 2,34% |
| 67 | 2,51% | 0.98% | - |
| 69 | 3,21% | 2.02% | - |

Con el objetivo de determinar con mayor exactitud la acumulación de PHA, se realizaron análisis de cada muestra mediante tres protocolos diferentes, tal y como ha sido descrito en el apartado 3.2.3. Como se ha mencionado anteriormente, *P. putida* ha acumulado PHA de cadena corta, concretamente PHB y, en vista de los resultados obtenidos (Tabla 3), se puede afirmar que el protocolo que más se ajusta a la extracción del biopolímero es la propanólisis ácida con HCl. Esto se puede deber a que dicho protocolo permite la incorporación de patrones PHB-PHV, facilitando de esta manera su detección y cuantificación. Por el contrario, el protocolo llevado a cabo mediante una metanólisis con H₂SO₄, no ha resultado adecuado para la detección de PHA debido a la generación de numerosos compuestos derivados del azufre presente en el H₂SO₄, además de la imposibilidad de incorporar un patrón.

Finalmente, la formación de una biopelícula de PHA no ha resultado un método adecuado, al menos para pequeñas acumulaciones del biopolímero debido a que, al tratarse de un análisis gravimétrico, supone un elevado error de medida.

El día 60 se registró una acumulación máxima del 20,64% aplicando el protocolo de extracción por propanólisis ácida. Sin embargo, la acumulación por gravimetría fue del 1,84% y por metanólisis, del 0,21%. Asimismo, los días 62 y 63 se obtuvo un 15,1% y 8,1% de PHB mediante propanólisis, un 4,5% y 0,3% por gravimetría y un 1,34% y 1,09% mediante metanólisis. Las producciones registradas el resto de días siguen una tendencia similar.

Si bien es cierto que existe una clara diferencia de porcentajes de acumulación para los tres protocolos y el mayor porcentaje no indicaría que dicha acumulación fuera la real, en este caso los resultados más fiables coinciden con los mayores porcentajes registrados mediante la propanólisis debido a la incorporación de los patrones que facilitan su cuantificación.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo de fin de máster fue sintetizar mcl-PHA a partir de hidrocarburos aromáticos como única fuente de C. Mediante estudios previos se ha podido identificar algunos microorganismos capaces de llevar a cabo este proceso de eliminación de COVs, en mayor parte el género *Pseudomonas* (Zylstra y Gibson 1989).

Una vez estabilizado el sistema, el rendimiento de eliminación de tolueno y etilbenceno se mantuvo constante en torno al 100% durante todo el ensayo. Autores como (Bordel y col., 2007) han demostrado también la capacidad de cepas como *Pseudomonas putida F1* para eliminar completamente tolueno a una concentración de 6 g m^{-3} , corroborando además la relación directa entre la concentración de COVs suministrada con la producción de biomasa y CO_2 . Por otro lado, (Shim & Yang, 1999) mostraron la degradación efectiva de la fracción BTEX en biofiltros para un co-cultivo de *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens*, con concentraciones de tolueno y etilbenceno de 1 g m^{-3} y $0,6 \text{ g m}^{-3}$ respectivamente, demostrando de esta manera la capacidad de *Pseudomonas* de degradar una mezcla de COVs. En nuestro caso, tampoco se observaron efectos negativos en la degradación de los COVs derivados de la presencia de ambos contaminantes sean la fase gas.

El reactor comenzó operando con una concentración de hidrocarburos de 5 g m^{-3} . Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente se disminuyó la carga suministrada de tolueno y etilbenceno debido a que el sistema presentó indicios de toxicidad a dichos compuestos al observar un ligero oscurecimiento en el caldo de cultivo, que pudo deberse a la formación de metabolitos secundarios que, en elevadas cantidades, resulte tóxico para el microorganismo. Trabajos previos (Mathur y col, 2010) enfocados en la biodegradación de benceno, tolueno y fenol con *Pseudomonas putida* han demostrado que a altas concentraciones iniciales de los hidrocarburos aromáticos se podría llegar a inhibir la actividad celular.

Por otro lado, diversos estudios han concluido con que el género *Pseudomonas* acumula polihidroxialcanoatos de cadena media. Nikodinovic y col., 2008 realizaron un estudio de degradación en batch de BTEX y producción de PHA con diferentes especies de la cepa *Pseudomonas putida* utilizando benceno, tolueno, etilbenceno y p-xileno como única fuente de carbono y energía. Demostraron que *P. putida F1* fue capaz de acumular PHA de cadena media al suministrar tolueno, benceno o etilbenceno. Asimismo, *P. putida mt-2* consiguió acumular hasta un 26% de PHA de cadena media suministrando p-xileno aunque también logró acumular porcentajes menores utilizando tolueno como fuente de carbono.

En el caso del presente estudio, los resultados de acumulación de PHA obtenidos difieren a los estudios previos realizados con la cepa *P. putida* debido a la acumulación de PHA de cadena corta en los análisis realizados, concretamente poli (3-hidroxibutirato). Una posibilidad es que el sistema pudiera encontrarse contaminado por un microorganismo diferente capaz de acumular PHB, como puede ser el género *Rhodococcus* debido a que existen estudios que lo afirman, como el realizado por (Hori, Abe, y col., 2009) en el que se demostró la capacidad de la cepa *Rhodococcus aetherivorans IAR1* para producir PHB a partir de tolueno como única fuente de carbono. Si bien no existen estudios previos demostrando la síntesis de scl-PHA por *P. putida* a partir de COVs, otros autores (Agrawal y col., 2015) han verificado la capacidad de *Pseudomonas putida* para acumular PHB utilizando glucosa como fuente de carbono. Es necesario por lo tanto continuar con el estudio para determinar la capacidad de esta cepa de sintetizar PHA de cadena corta.



6. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

De los resultados obtenidos del estudio de la degradación en continuo de determinados compuestos orgánicos volátiles a concentraciones variables en presencia de fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones, con la finalidad de producir PHA de cadena media se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los compuestos orgánicos volátiles utilizados en el proceso estudiado fueron adecuados, sin embargo, la adaptación del sistema al tolueno fue mejor alcanzando el rendimiento de eliminación completo en menor tiempo.
- Elevadas cargas de COVs resultaron tóxicas para el microorganismo, siendo necesario operar con concentraciones inferiores a 5 g m^{-3} .
- Tras mantener el sistema limitado en N durante 10 días, se observó una contaminación por bacterias filamentosas, que además coincidió con una disminución de la eficacia de eliminación de COVs.
- No se registró acumulación de PHA-mcl de las muestras analizadas. Sin embargo, se ha detectado acumulaciones de PHB lo que puede implicar la contaminación del sistema por un organismo capaz de acumular PHB o que *P. putida* es capaz de acumular PHAs de cadena corta empleando COVs como fuente de carbono. Esto último no ha sido reportado hasta el momento en estudios anteriores.
- El protocolo más adecuado para la extracción y cuantificación de PHAs fue la propanólisis ácida.

El estudio prueba la importancia de las condiciones de operación, tanto la carga aportada de compuestos orgánicos volátiles a eliminar, como la concentración de nitrógeno suministrada, ya que un aporte excesivo de ellos puede conllevar la contaminación del sistema y/o muerte celular. En definitiva, el estudio realizado no ha probado la conversión de compuestos orgánicos volátiles en PHA de cadena media, aunque sí de cadena corta, por lo que es necesario realizar estudios posteriores.

De cara a futuros ensayos, para determinar la capacidad de *P. putida* de eliminar COVs y producir mcl-PHA, resultaría interesante buscar optimizar las condiciones de operación. Es por ello que sería idóneo realizar estudios previos en discontinuo a fin de optimizar las cargas de nitrógeno y COVs suministradas. En cuanto a la etapa de degradación, aunque se han obtenido resultados positivos en el presente experimento, resultaría interesante realizar ensayos en batch a diferentes concentraciones de COVs a fin de maximizar y optimizar la dosis suministrada sin que resulte tóxico al microorganismo, estudiando previamente la ruta metabólica de *P. putida*, a fin de evitar la muerte celular por metabolitos secundarios; una vez optimizada la etapa en batch, se operaría en continuo.

La acumulación de PHAs en continuo podría realizarse en dos etapas el lugar de una única etapa como el presente estudio. Sería interesante diferenciar la etapa de crecimiento celular (en la que se requiere suministro de nitrógeno) de la etapa de acumulación de PHA, operando con dos reactores diferenciados, ambos alimentados con los COVs a degradar, y uno de ellos con suministro continuo de nitrógeno en función del consumo de nitrógeno que presente el sistema y otro de ellos sin aporte de nitrógeno y utilizado expresamente para la acumulación de bioplásticos. Este planteamiento podría solucionar uno de los mayores problemas del presente ensayo: la contaminación, debido a que la contaminación de un reactor podría no implicar la contaminación del segundo.

Por otro lado, para la detección y cuantificación de los PHA acumulados sería necesario desarrollar un protocolo que, mediante patrones de referencia, se pueda cuantificar la masa de PHA producida sin necesidad de formar una biopelícula.



BIBLIOGRAFÍA

- A. Chamas , H. Moon , J. Zheng , Y. Qiu , T. Tabassum , JH Jang , M. Abu-Omar , SL Scott , S. Suh (2020). Tasas de degradación de los plásticos en el medio ambiente ACS sostener. química Ing. , 8.
<https://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635?ref=pdf>
- A.E. Schwarz, S.M.C. Lensen, E. Langeveld, L.A. Parker, J.H. Urbanus (2023) Plastics in the global environment assessed through material flow analysis, degradation and environmental transportation, Science of The Total Environment, Volume 875.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162644>
- Agrawal, T., Kotasthane, A.S. & Kushwah, R. Genotypic and phenotypic diversity of polyhydroxybutyrate (PHB) producing Pseudomonas putida isolates of Chhattisgarh region and assessment of its phosphate solubilizing ability. 3 Biotech 5, 45–60 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0198-9>
- Alvarez, L. (2016). Bioplásticos: Obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos.
- Anderson, A.J.; Dawes, E.A. 1990. Ocurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polihidroxyalkanoates. Microbiological Reviews, v. 54, n4, p. 450-472.
- A. Padermshoke, Y. Katsumoto, H. Sato, S. Ekgasit, I. Noda, Y. Ozaki (2005) Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc., 61.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.05.004>
- Bioprocesos para la eliminación de contaminantes volátiles: estado actual de conocimientos y futuras tendencias.
https://olores.org/index.php?option=com_content&view=article&id=254:bioprocesos-para-la-eliminacion-de-contaminantes-volatiles-estado-actual-de-conocimientos-y-futuras-tendencias&catid=90&Itemid=608&lang=es
Accessed: 12/07/2023
- Bordel, S., Muñoz, R., Díaz, L.F. et al. New insights on toluene biodegradation by Pseudomonas putida F1: influence of pollutant concentration and excreted metabolites. Appl Microbiol Biotechnol 74, 857–866 (2007).
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0724-8>
- Byrom, D. 1990. Industrial production of polymers from Alcaligenes eutrophus. Novel biodegradable microbial polymers. Ed E.A. Dawes.
- 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>

- DY Kim , HW Kim , MG Chung , YH Rhee.(2007). Biosíntesis, modificación y biodegradación de polihidroxialcanoatos bacterianos de cadena media. *J. Microbiol.*, 45.
- G.Q. Chen (2010). *Plastics from bacteria*, Microbiology Monographs. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- G.N. Lee, J. Na (2013). Future of microbial polyesters. *Microb. Cell Fact.*, 12.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-54>
- 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>
- Javier González-Martín, Sara Cantera, Raquel Lebrero, Raúl Muñoz. Biofiltration based on bioactive coatings for the abatement of indoor air VOCs, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, Volume 31, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100960>
- 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>
- Katsutoshi Hori, Michiharu Abe, Hajime Unno (2009). Production of triacylglycerol and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by the toluene-degrading bacterium *Rhodococcus aetherivorans* IAR1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 108.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.020>
- Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and polymerization of β hydroxybutyric. *Bull, Soc. Chem. Biol.*, v.8, p 770-782.
- 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, J. C., Rodríguez, Y., Pérez, V., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2019). CH₄-based polyhydroxyalkanoate production: A step further towards a sustainable bioeconomy. *En Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_11
- Mathur, A.K., Majumder, C.B (2010). Kinetics modelling of the biodegradation of benzene, toluene and phenol as single substrate and mixed substrate by using *Pseudomonas putida* *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. Volume 24, Issue 1, March 2010, Pages 101-109.
- M. Nitschke, S.G.V.A.O. Costa, J. Contiero (2011). Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochem.*, 46.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.012>

- M. Zinn, B. Witholt, T. Egli (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6)

- Nallanthigal Sridhara Chary, Amadeo R. Fernandez-Alba. Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental Waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 32 (2012).

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.011>

- Nikodinovic, J., Kenny, ST, Babu, RP et al. (2008). The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chainlength 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.

- R. Rai, T. Keshavarz, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Roy (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R. Rep.*, 72.

<https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>

- Rivera-Garibay, O. O., Álvarez-Filip, L., Rivas, M., Garelli-Ríos, O., PérezCervantes, E. & Estrada-Saldívar, N. (2020). Impacto de la contaminación por plástico en áreas naturales protegidas mexicanas. *Greenpeace México*.

- Shabina Muhammadi, M. Afzal, S. Hameed (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem. Lett. Rev.*, 8.

<https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>

- Shivika Sharma, Vikas Sharma, Subhankar Chatterjee (2023). Contribution of plastic and microplastic to global climate change and their conjoining impacts on the environment - A review, *Science of The Total Environment*, Volume 875.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162627>

- Tom Huybrechts, Jo Dewulf, Herman Van Langenhove. State-of-the-art of gas chromatography-based methods for analysis of anthropogenic volatile organic compounds in estuarine waters, illustrated with the river Scheldt as an example, *Journal of Chromatography A*, Volume 1000, Issues 1–2 (2003).

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00585-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00585-5)

- Uragami, T. (2014). Compuestos orgánicos volátiles. En: Drioli, E., Giorno, L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. Springer, Berlín, Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_596-1

- V.I. Sevastianov, N.V. Perova, E.I. Shishatskaya, G.S. Kalacheva, T.G. Volova (2003). Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 14.

<https://doi.org/10.1163/156856203769231547>

- W. Chen, Y.W. Tong (2012). PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization. *Acta Biomater.*, 8.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.026>

- W.N. Chaudhry, N. Jamil, I. Ali, M.H. Ayaz, S. Hasnain (2011). Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Ann. Microbiol.*, 61.

<https://doi.org/10.1007/s13213-010-0181-6>

- 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>

- Y. Gao , Y. Zhang , M. Kamijima , K. Sakai , M. Khalequzzaman , T. Nakajima , R. Shi , X. Wang , D. Chen , X. Ji , K. Han , Y. Tian

Evaluaciones cuantitativas de la contaminación del aire interior y el riesgo de leucemia aguda infantil en shanghai. *Reinar. contaminar* , 187 (2014).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.029>

- Yifan Wang, Long Ding, Qi Shi, Shuang Liu, Lixin Qian, Zhengwei Yu, Hongtao Wang, Jie Lei, Zhifang Gao, Hongming Long, Chunbao Charles Xu,

Volatile organic compounds (VOC) emissions control in iron ore sintering process: Recent progress and future development, *Chemical Engineering Journal*, Volume 448, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137601>.

- Yu-Yang Ni, Do Young Kim, Moon Gyu Chung, Sun Hee Lee, Ho-Yong Park, Young Ha Rhee (2010). Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technology*,. Volume 101, Issue 21.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.033>

- Zulfiqar Ali Raza, Sharjeel Abid, Ibrahim M. Banat (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 126.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

- 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*.



ANEXOS

ANEXO I. CURVAS DE CALIBRADO

