



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Transformación de emisiones gaseosas residuales en nuevas biomoléculas  
de interés farmacéutico y médico**

Autor: D. David Antolín Alonso

Tutor: Dra. Raquel Lebrero Fernández  
Dra. Sara Cantera Ruiz de Pellón

Valladolid, Julio 2023



## RESUMEN

Los procesos biológicos de degradación de compuestos contaminantes constituyen una alternativa económica y de bajo impacto ambiental comparada con las técnicas convencionales. La bioconversión de estos contaminantes en productos valiosos genera un interés aún mayor en el empleo de las biotecnologías. El presente trabajo se centró en el estudio de la biodegradación de compuestos orgánicos volátiles y su bioconversión en sustancias de alto valor farmacéutico y médico empleando las bacterias *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus*. Los estudios en batch demostraron la capacidad de dichas especies de degradar tolueno, alcanzando rendimientos del 100% y dando lugar a la síntesis de ectoína e hidroxiectoína, evaluada a diferentes concentraciones salinas. Posteriormente se operó un reactor de tanque agitado destinado al mismo objetivo, alcanzando rendimientos de eliminación de tolueno del 42% con *Rhodococcus opacus* con una salinidad del 3% NaCl y producciones de ectoína e hidroxiectoína de 9,4 mg/L y 2,8 mg/L respectivamente.

**Palabras clave:** Compuestos orgánicos volátiles, bioconversión de tolueno, ectoína, hidroxiectoína, microorganismos extremófilos.

## ABSTRACT

Biological processes for the degradation of pollutants are an economical alternative with low environmental impact compared to conventional techniques. The bioconversion of pollutants into valuable products generates greater interest in the use of biotechnologies. The present work focused on the study of biodegradation of volatile organic compounds and their bioconversion into substances of high pharmaceutical and medical value using *Halomonas stevensii* and *Rhodococcus opacus*. Batch studies demonstrated the capacity of these species to degrade toluene, reaching 100% removal performance and resulting in the synthesis of ectoine and hydroxyectoine, evaluated at different salt concentrations. Subsequently, a stirred tank reactor was operated for the same purpose, achieving toluene removals of 42% with *Rhodococcus opacus* at 3% NaCl salinity and ectoine and hydroxyectoine concentrations of 9.4 mg/L and 2.8 mg/L, respectively.

**Keywords:** Volatile organic compounds, toluene bioconversion, ectoine, hydroxyectoine, extremophilic microorganisms.



Universidad de Valladolid

## Bioconversión de emisiones gaseosas residuales



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminación atmosférica. Estado actual .....	1
1.2. Compuestos orgánicos volátiles (COVs) .....	1
1.2.1. Aspectos generales y características.....	1
1.2.2. Tolueno .....	4
1.3. Técnicas actuales para el tratamiento de COVs.....	4
1.3.1. Tecnologías físico-químicas de tratamiento de COVs.....	4
1.3.2. Tecnologías biológicas para el tratamiento de COVs.....	6
1.4. Bioconversión de COVs en productos valiosos.....	9
1.4.1. Bioplásticos.....	9
1.5. Biomoléculas de interés farmacéutico y médico.....	11
1.5.1. Ectoína e hidroxiectoína .....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. Inóculo y medio mineral empleado .....	15
3.2. Descripción del sistema experimental en continuo. Diagrama de flujo.....	17
3.3. Procedimiento experimental .....	18
3.4. Métodos analíticos .....	20
3.5. Cálculos realizados.....	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
4.1. Ensayos en discontinuo.....	23
4.2. Ensayos en continuo .....	30
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>47</b>
ANEXO I: Recta de calibrado del compuesto a estudio .....	47
ANEXO II: Rectas de calibrado de la concentración de sólidos .....	48
ANEXO III: Rectas de calibrado de la concentración de osmolitos .....	49

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Smog fotoquímico (Terrasa, 2022) .....	2
Figura 2: Evolución histórica de emisiones mundiales de COVs por sector económico (EEA, 2018) .....	3
Figura 3: Estructura molecular de los BTEX (Yu et al., 2022) .....	3
Figura 4: Etapas metabólicas iniciales en la biodegradación de tolueno (Yoshikawa et al., 2017)	7
Figura 5: Principales configuraciones de biotecnologías orientadas al tratamiento de COVs: a) Biorreactor de tanque agitado, b) Biorreactor Airlift, c) Biofiltro percolador, d) Biofiltro (Cantera et al., 2017a) .....	9
Figura 6: Acumulación de PHAs en <i>P.aeruginosa</i> (Yadira & Riaño, 2010).....	10
Figura 7: Estructura molecular de la ectoína (a) y de la hidroxiectoína (b) .....	12
Figura 8: <i>Rhodococcus opacus</i> (izqda.) y <i>Halomonas</i> sp. (drcha.) (Wolfe-Simon et al., 2011).....	13
Figura 9: Diagrama de flujo del sistema experimental empleado.....	17
Figura 10: Ensayos biodegradación tolueno <i>R.opacus</i> y <i>H.stevensii</i> .....	19
Figura 11: Imagen del sistema experimental propuesto.....	20
Figura 12: Evolución del consumo de tolueno en los ensayos por lotes con <i>H. stevensii</i> a una concentración salina del: a) 3% NaCl, b) 5% NaCl y c) 6% NaCl.....	24
Figura 13: Evolución del consumo de tolueno en los ensayos por lotes con <i>R. opacus</i> a una concentración salina del: a) 3% NaCl, b) 4% NaCl, c) 5% NaCl y d) 6% NaCl.....	26
Figura 14: Producción de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) a diferentes salinidades en los ensayos batch con <i>H.stevensii</i> .....	28
Figura 15: Producción de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) a diferentes salinidades en los ensayos batch con <i>R.opacus</i> .....	28
Figura 16: Comparación de la producción de ectoína entre las dos especies estudiadas: <i>H.stevensii</i> (azul) y <i>R.opacus</i> (rojo) .....	29
Figura 17: Comparación de la producción de hidroxiectoína entre las dos especies estudiadas: <i>H.stevensii</i> (azul) y <i>R.opacus</i> (rojo).....	29
Figura 18: Eficacia (RE) y capacidad (EC) de eliminación de tolueno durante Ensayo 1 R1 .....	30
Figura 19: Evolución del pH y de la concentración de biomasa durante Ensayo 1 R1 .....	31
Figura 20: Evolución de la concentración de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) durante Ensayo 1 R1 .....	31
Figura 21: Evolución de la concentración de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) durante el Ensayo 1 R2 .....	32
Figura 22: Evolución de la concentración de tolueno durante el periodo experimental a la entrada (azul) y salida (rojo) del reactor del Ensayo 1 R3 .....	32
Figura 23: Evolución de la RE (amarillo) y EC (verde) del tolueno en el reactor durante el periodo experimental del Ensayo 1 R3.....	33
Figura 24: Evolución de la concentración de CO <sub>2</sub> durante el periodo experimental a la entrada (rojo) y a la salida (azul) .....	34
Figura 25: Producción de CO <sub>2</sub> (g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> ) durante el estudio experimental .....	34
Figura 26: Evolución del pH (izqda.) y de la concentración de biomasa (dcha.) durante el Ensayo 1 R3 .....	35
Figura 27: Evolución de las concentraciones de ectoína (izqda.) e hidroxiectoína (dcha.) durante el estudio experimental del Ensayo 1 R3.....	35
Figura 28: Evolución de la concentración de tolueno durante el periodo experimental a la entrada (azul) y salida (rojo) del reactor <i>H.stevensii</i> .....	36
Figura 29: Evolución de la RE (amarillo) y EC (verde) del tolueno en el reactor durante el periodo experimental del Ensayo 2 .....	37



Figura 30: Evolución de la concentración de CO <sub>2</sub> en la entrada (rojo) y salida (azul) durante el ensayo 2 .....	37
Figura 31: Producción de CO <sub>2</sub> durante el segundo ensayo en continuo .....	38
Figura 32: Evolución del pH (izqda.) y de la concentración de biomasa (dcha.) durante el segundo ensayo en continuo.....	38
Figura 33: Evolución de las concentraciones de ectoína (izqda.) e hidroxiectoína (dcha.) durante el segundo ensayo en continuo.....	39
Figura 34: Recta de calibrado del tolueno .....	47
Figura 35: Recta de calibrado de la concentración de sólidos H.stevensii.....	48
Figura 36: Recta de calibrado de la concentración de sólidos R.opacus.....	48
Figura 37: Recta de calibrado de la concentración de ectoína .....	49
Figura 38: Recta de calibrado de la concentración de hidroxiectoína .....	49

## ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Propiedades físicas y termodinámicas del tolueno (PRTR, 2023) .....	4
Tabla 2: Características de las tecnologías físico-químicas de tratamiento de COVs.....	5
Tabla 3: Microorganismos degradadores de COVs.....	6
Tabla 4: Acumulación de PHA en cultivos bacterianos de BTEXS .....	10
Tabla 5: Composición medio mineral M9 .....	15
Tabla 6: Composición medio mineral salino de amonio (AMS) .....	16
Tabla 7: Composición solución 3B y solución de vitaminas .....	17

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Contaminación atmosférica. Estado actual

La contaminación ambiental derivada principalmente de la actividad antropogénica (empleo de combustibles fósiles, uso de productos químicos y pesticidas, deforestación, etc.) ha generado un serio problema que se extiende al aire, agua y suelo (Rothon, 2022). Las emisiones gaseosas resultantes del transporte, procesos industriales, o el tratamiento de residuos sólidos y líquidos constituyen un gran riesgo para la salud de los seres vivos, el medio ambiente y los bienes materiales que los rodean según la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA, 2023).

La contaminación del aire presenta efectos muy negativos, estimándose una mortalidad anual de 4,2 millones de personas por exposición a contaminación del aire exterior; 3,8 millones de muertes por contaminación de aire de interior, y se estima que casi toda la población (99%) habita en zonas donde la calidad del aire supera los límites de contaminación recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además repercute a nivel económico, estimándose un coste de 1,3 billones de euros en el tratamiento de la contaminación de aire de interior y exterior (OMS, 2023). El estudio y control de la contaminación de aire de interior es muy importante debido a que la mayor parte del tiempo (cercano al 90%) se tiende a permanecer en espacios cerrados, cuya ventilación es escasa. La contaminación del aire de interior provoca serios problemas para la salud provocando irritaciones en las vías respiratorias, alergias, enfermedades neurodegenerativas e incluso cáncer (Tan et al., 2022).

Esta situación ha provocado el desarrollo de una legislación estricta para controlar la reducción de las emisiones contaminantes y una mejora de la calidad del aire. Entre la normativa más reciente destaca la Ley 34/2007, cuyo fin es establecer las bases en cuanto a prevención, vigilancia y reducción de la contaminación atmosférica mediante la aprobación de planes y programas relativos a la mejora de la calidad del aire y el diseño de indicadores ambientales; y el RD 39/2017, que establece objetivos de calidad del aire para los diferentes contaminantes, regula los métodos y criterios de evaluación y determina la información a intercambiar a las administraciones públicas y a la población en relación a la calidad del aire (Miteco, 2023).

Los principales contaminantes atmosféricos incluyen compuestos químicos, como los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>), hidrocarburos (HC) o compuestos orgánicos volátiles (COVs); partículas; contaminantes biológicos como virus, bacterias, alérgenos u hongos; y agentes físicos (temperatura, campos electromagnéticos, etc.) (González-Martín et al., 2021). Debido a la creciente exposición a estos contaminantes en el aire y su gran impacto económico y social, se han implantado tecnologías cada vez más eficientes para el tratamiento de contaminantes biológicos del aire, así como la eliminación de compuestos de alto riesgo para la salud, como partículas, CO, NO<sub>x</sub>, O<sub>3</sub> o COVs (Cantera et al., 2022a).

## 1.2. Compuestos orgánicos volátiles (COVs)

### 1.2.1. Aspectos generales y características

Los compuestos orgánicos volátiles son un grupo de contaminantes orgánicos que a temperatura ambiente se encuentran en estado gaseoso o son muy volátiles a dicha temperatura. Concretamente, son aquellos compuestos que a una temperatura de 20°C presentan una presión de vapor igual o superior a 0,01 kPa según el RD 117/2003.

Los COVs están constituidos generalmente por una cadena de carbonos inferior a doce y contienen diferentes elementos tales como oxígeno, cloro, flúor, nitrógeno, azufre o bromo. Dentro de este grupo se encuentran varios tipos de compuestos con diferentes características, como los hidrocarburos alifáticos (p.ej. n-hexano), hidrocarburos aromáticos (p.ej. benceno, tolueno), derivados halógenos (p.ej. diclorometano), aldehídos (p.ej. formaldehído), cetonas (p.ej. acetona), alcoholes (p.ej. etanol), ésteres (p.ej. acetato de etilo) y otros como el ácido acético, la acrilamida o el acetonitrilo (*Brofind, 2020*).

Además de generar daños ambientales, como la destrucción de la capa de ozono estratosférico (derivados halogenados), los COVs también son perjudiciales para la salud. La exposición a estos contaminantes a corto plazo provoca irritación de ojos y vías respiratorias, mareos, náuseas, o trastornos visuales, mientras que a largo plazo genera daños en el sistema nervioso, hígado, corazón o los riñones, y riesgo carcinogénico (Yu et al., 2022). Además, los COVs son responsables del smog fotoquímico (Figura 1), afectando negativamente tanto al medio ambiente como a la salud humana (*Miteco, 2023*).

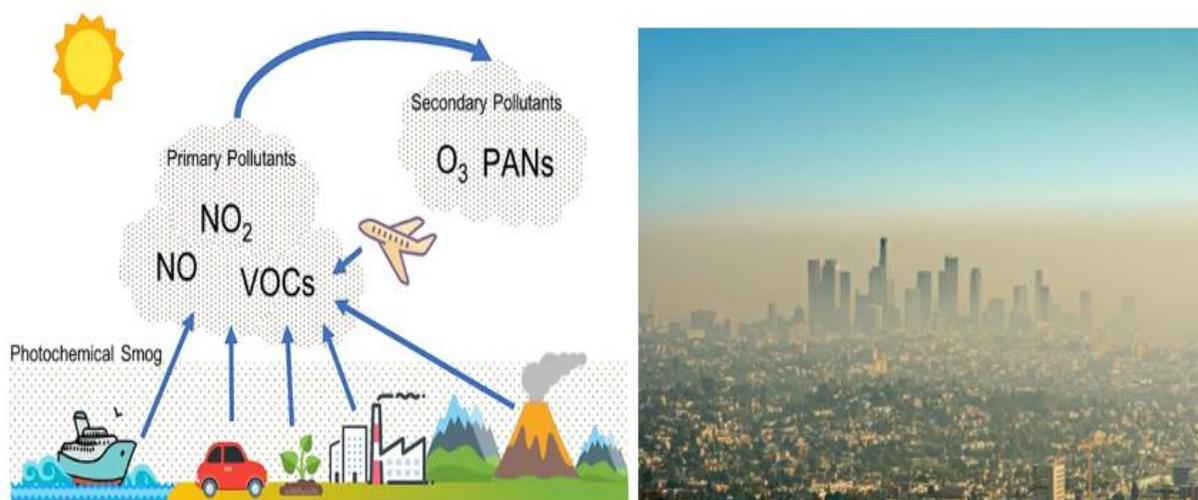


Figura 1: Smog fotoquímico (Terrasa, 2022)

Sus fuentes de emisión, a pesar de que una pequeña parte se pueden generar mediante procesos naturales, resultan principalmente de actividades antropogénicas (Crowcon, 2023). En el caso de la acumulación de COVs atmosféricos, la mayor parte de las emisiones proceden de gases de escape de vehículos, emisiones fugitivas en la carga y descarga de combustibles, emisiones en procesos industriales y emisiones derivadas de la construcción, de la agricultura o del tratamiento de residuos (Figura 2). En el caso de las emisiones de COVs en el aire de interior son hasta 10 veces mayores que las que se encuentran en la atmósfera según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (EPA, 2023). Dichas emisiones proceden de compuestos de uso diario como son el empleo de productos de limpieza, cosméticos, materiales de construcción, desodorantes, insecticidas, pinturas, adhesivos o disolventes entre otros (*Brofind, 2020*). Por dichas razones, la Directiva Europea 2004/42/CE y el Real Decreto 117/2003 han definido los límites máximos de emisiones de COVs de dichos productos (BOE, 2023).

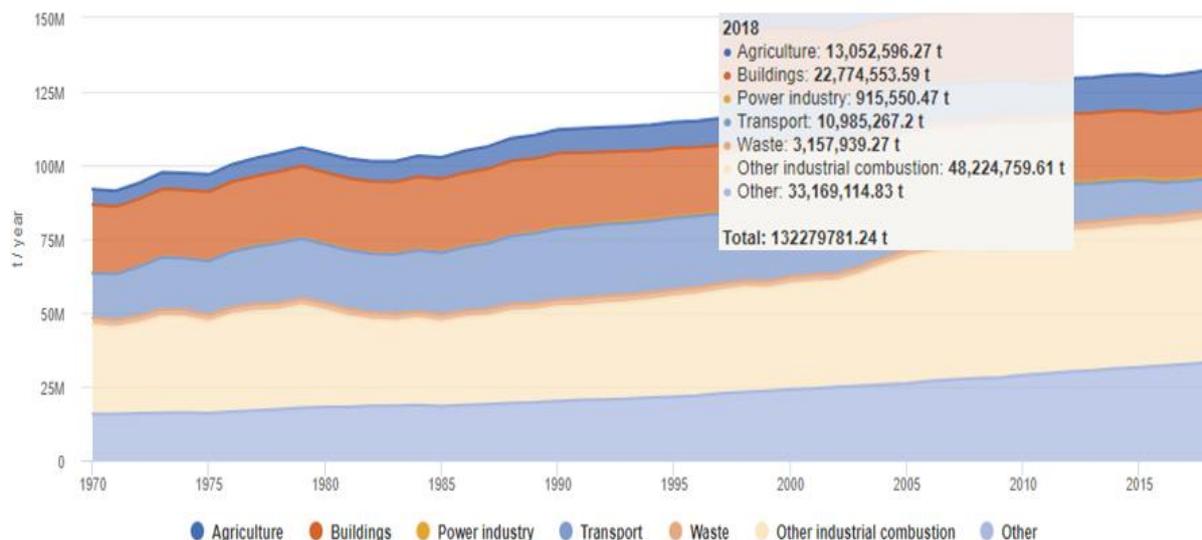


Figura 2: Evolución histórica de emisiones mundiales de COVs por sector económico (EEA, 2018)

De este conjunto de compuestos destaca un grupo de hidrocarburos aromáticos denominado BTEX, formado por benceno ( $C_6H_6$ ), tolueno ( $C_6H_5CH_3$ ), etilbenceno ( $C_8H_{10}$ ) y xileno ( $C_8H_{10}$ ), que se encuentran en combustibles fósiles como el petróleo y sus derivados, y que se caracterizan por los graves efectos que presentan tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Figura 3). Su empleo es muy frecuente debido a su uso en la síntesis de productos plásticos, fibras sintéticas o pesticidas entre otros, lo que ha provocado un incremento en la emisión de BTEX en los últimos años (Valladares, 2013). Sin embargo, estos compuestos presentan propiedades genotóxicas, generan problemas sobre el sistema respiratorio, afectan al sistema nervioso central y a otros órganos como riñones o hígado, además de ser cancerígenos y mutagénicos como el caso del benceno, el cual está clasificado como carcinógeno humano de riesgo medio por la EPA (Carvajal et al., 2018). Además, dicho organismo ha establecido niveles máximos permisibles para los diferentes compuestos en el agua potable de 1000, 700 y 10000  $\mu\text{g/L}$  para el tolueno, etilbenceno y xileno respectivamente (Chesnaux, 2008). Del mismo modo, se han establecido concentraciones máximas en el aire de 5 y 434  $\text{mg/m}^3$  de tolueno y etilbenceno respectivamente (EPA, 2023). Debido a los efectos perjudiciales que presentan, existe una gran necesidad de desarrollar tecnologías de tratamiento eficaces que ayuden a reducir las emisiones de estos compuestos.

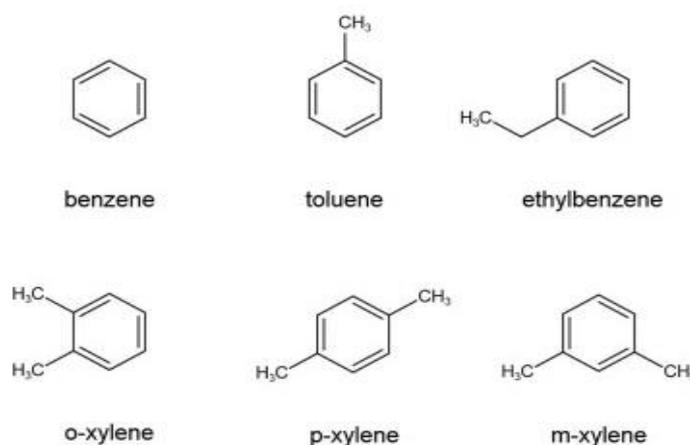


Figura 3: Estructura molecular de los BTEX (Yu et al., 2022)

### 1.2.2. Tolueno

Dentro de los BTEX se encuentra el tolueno (también denominado metilbenceno), el cual es empleado como materia prima para la obtención de diferentes sustancias y productos como el ácido benzoico, fenol, colorantes, medicamentos, perfumes, TNT o detergentes entre otros (PRTR, 2023). A presión y temperatura ambiente se trata de un líquido incoloro con un olor característico similar al disolvente de pintura que se caracteriza por ser soluble en la mayor parte de sustancias orgánicas lipofílicas, siendo poco miscible en agua. El tolueno está clasificado como sustancia peligrosa por el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (Miteco, 2023), ya que produce efectos perjudiciales en el ser humano, afectando al sistema nervioso, riñones, hígado y al sistema reproductor.

La síntesis química de tolueno se produce por la ciclodehidrogenación del n-heptano a partir de catalizadores, y como subproducto en el proceso de formación de etileno y propeno. Las propiedades físicas del tolueno se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Propiedades físicas y termodinámicas del tolueno (PRTR, 2023)

Fórmula química	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>
Peso molecular	92,1 g/mol
Punto de ebullición	111 °C
Punto de fusión	-95 °C
Densidad relativa del líquido	0,87 g/ml
Solubilidad en agua	0,47 g/L
Presión de vapor (20 °C)	2,9 kPa
Densidad relativa del gas	3,2 g/ml
Punto de inflamación	4 °C
Temperatura de autoignición	480 °C

## 1.3. Técnicas actuales para el tratamiento de COVs

### 1.3.1. Tecnologías físico-químicas de tratamiento de COVs

Los efectos perjudiciales derivados de estos contaminantes han generado la necesidad de desarrollar diferentes estrategias de tratamiento para minimizar sus niveles. Las técnicas de tratamiento de COVs más empleadas actualmente en la industria se basan en procesos fisicoquímicos, como los procesos de oxidación térmica y catalítica, adsorción, absorción, separación por membranas o condensación entre otras, debido a sus elevadas eficacias de eliminación que pueden alcanzar una eficacia superior al 90% (Yu et al., 2022). Sin embargo, estas técnicas suponen elevados costes de inversión y operación debido a la complejidad de algunos sistemas, además de ser poco respetuosos con el medioambiente ya que algunas tecnologías requieren condiciones extremas de operación, consumos energéticos elevados y materias primas costosas (Carvajal et al., 2018). En la Tabla 2 se muestran las técnicas físico-químicas más empleadas, sus ventajas e inconvenientes, eficiencias de eliminación así como su impacto ambiental:

Tabla 2: Características de las tecnologías físico-químicas de tratamiento de COVs

Tecnología	Ventajas	Desventajas	Eficiencia eliminación	Impacto ambiental	Referencia
Oxidación térmica	Muy versátil en cuanto a caudal y concentración contaminante	Elevado consumo energético y emisiones de CO <sub>2</sub> , generación de contaminantes secundarios (NO <sub>x</sub> y CO), elevados volúmenes de equipos y costes de mantenimiento	Eficiencia de eliminación de los contaminantes superior al 99%.	Alto	(Genano, 2022)
Oxidación catalítica	No se generan contaminantes secundarios, consumo energético bajo y pequeño volumen de equipos	Sensibilidad térmica, limitaciones en la transferencia de materia, elevado coste del catalizador y posible envenenamiento de catalizadores	Alta eficiencia de eliminación (≈95%)	Alto	(Condorchem Envitech, 2023)
Quemador de gas residual	Capaz de purificar varios tipos de emisiones.	Elevado consumo de combustible (altos costes de inversión)	La eficiencia de eliminación es superior al 99%.	Alto	(Genano, 2022)
Adsorción	Purifica grandes corrientes de aire con bajas concentraciones de COVs	Elevado coste de operación (reemplazo/regeneración del adsorbente)	Alta eficiencia de eliminación (>95%)	Alto	(Genano, 2022)
Absorción	Purifica grandes corrientes de aire con bajas concentraciones de COVs	Consumo de disolventes tóxicos e inflamables y elevado consumo energético	Alta eficiencia de eliminación (≈98%)	Alto	(Genano, 2022)
Separación por membranas	No requiere sustancias adicionales, consumo energético bajo	Posible saturación de los poros de la membrana	Eficacias de separación superiores al 80%	Medio	(Yu et al., 2022)
Condensación	Tratamiento de emisiones de COVs de alta concentración (> 5000 ppmv)	Elevado consumo energético	Eficacias de eliminación superiores al 95%	Alto	(Condorchem Envitech, 2023)

Además de las tecnologías citadas existen técnicas mixtas que combinan varias tecnologías como la adsorción y la oxidación térmica regenerativa, o la evapooxidación (Condorchem Envitech, 2023). Aunque dichas técnicas consiguen una eliminación eficaz de los contaminantes en las corrientes tratadas, en la mayoría de estas tecnologías dichos compuestos quedan retenidos, acumulándose sin ser degradados completamente y requiriendo tratamientos posteriores de eliminación (González-Martín et al., 2021). Por ello, una opción más ambientalmente respetuosa, capaz de degradar completamente una gran diversidad de COVs con diferentes concentraciones de manera simultánea y que puede ser más rentable y eficiente si se diseña e implementa correctamente es el tratamiento de COVs con tecnologías biológicas (Lamprea et al., 2021).

### 1.3.2. Tecnologías biológicas para el tratamiento de COVs

Las tecnologías biológicas se presentan como una alternativa rentable y sostenible para el tratamiento de corrientes gaseosas con concentraciones bajas o moderadas de estos contaminantes, sin requerir de productos químicos, ni generando residuos peligrosos. Sin embargo, su viabilidad se encuentra aún limitada debido a dos factores principales: 1) El limitado conocimiento que se tiene de microorganismos capaces de degradar dichos compuestos, muchos de ellos compuestos recalcitrantes y que a altas concentraciones, tanto los COVs como sus derivados metabólicos son tóxicos y 2) a la necesidad de encontrar las condiciones adecuadas para asegurar la actividad microbiana, tanto a nivel de cultivo como de operación, ya que estos compuestos presentan limitaciones en cuanto a su baja transferencia de materia, complicando su disponibilidad para las comunidades microbianas, lo que hace que sean difíciles de eliminar de manera completa.

- **Microorganismos degradadores de COVs**

Hasta el momento se conoce una pequeña variedad de microorganismos que sean capaces de degradar COVs (Cantera et al., 2022a). Sin embargo, se han aislado microorganismos de alta versatilidad metabólica capaces de emplear dichos compuestos orgánicos volátiles como fuente de carbono y energía (Wu et al., 2023). Entre ellos destacan varios géneros bacterianos (Tabla 3), como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* o *Burkholderia*, ya que muchas de sus especies son capaces de mineralizar completamente una gran variedad de COVs (Chaudhary et al., 2023).

Tabla 3: Microorganismos degradadores de COVs

BTEX	Microorganismos	Referencia
Benceno	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1, <i>Pseudomonas</i> sp. OX1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> J1104, <i>P. putida</i> F1, <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, <i>Ralstonia pickettii</i> PKO1, <i>B. vietnamiensis</i> G4, <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>R. jostii</i> RHA1, <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, <i>Paraburkholderia aromaticivorans</i> BN5	(Kumar, A., 2019), (Yoshikawa et al., 2017), (Lee et al., 2019), (Kim et al., 2002)
Tolueno	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1, <i>Pseudomonas</i> sp. OX1, <i>P. putida</i> F1, <i>P. putida</i> mt-2, <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, <i>Ralstonia pickettii</i> PKO1, <i>B. vietnamiensis</i> G4, <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>R. jostii</i> RHA1, <i>R. opacus</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, <i>Paraburkholderia aromaticivorans</i> BN5, <i>Thauera</i> sp. DNT-1, <i>Acetivobacter</i> sp,	

Etilbenceno	<i>P. putida</i> F1, <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>R. jostii</i> RHA1, <i>R. opacus</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, <i>Paraburkholderia aromaticivorans</i> BN5
Xilenos	<i>Pseudomonas</i> sp. OX1, <i>P. putida</i> mt-2, <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17 (o-xileno), <i>R. jostii</i> RHA1

En cuanto a las rutas metabólicas para la degradación de COVs, existen diferentes vías dependiendo de las enzimas de degradación involucradas (Figura 4). Estas rutas se encuentran catalizadas por enzimas oxigenasas. Durante las rutas metabólicas se producen un grupo de metabolitos intermedios, compuestos de catecol, que se generan por diferentes vías: catecol durante la degradación de benceno y tolueno, 3-metilcatecol en la degradación de tolueno, o-xileno y m-xileno, y 4-metilcatecol durante la degradación de p-xileno. Estos compuestos son transformados posteriormente en piruvato y acetaldehído que se utilizan en el anabolismo celular (Yoshikawa et al., 2017).

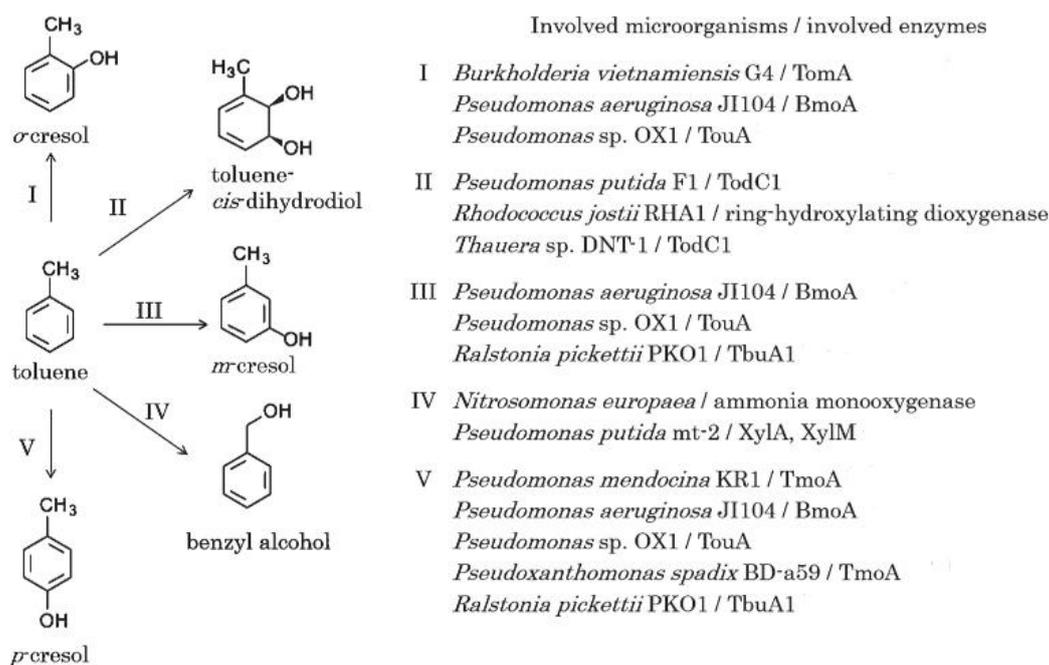


Figura 4: Etapas metabólicas iniciales en la biodegradación de tolueno (Yoshikawa et al., 2017)

• **Tecnologías biológicas de tratamiento de COVs**

Entre los sistemas biológicos de eliminación de COVs más comunes se encuentran dos tipos de configuraciones: los biorreactores de lecho empacado, siendo los biofiltros y biofiltros percoladores los más comunes; y los biorreactores de crecimiento en suspensión, como los tanques agitados y los biorreactores airlift (Figura 5) (Cantera et al., 2017a).

Los biofiltros (BF) consisten en reactores de oxidación biológica basados en el contacto entre la corriente gaseosa contaminada húmeda y los microorganismos, que se encuentran inmovilizados en un material de empaque donde crecen, el cual es atravesado

por dicha corriente para conseguir su purificación (Figura 5.d). Los microorganismos emplean el contaminante como fuente de carbono y energía. Esta tecnología es empleada en corrientes gaseosas con concentraciones de contaminante inferiores a  $5 \text{ g/m}^3$ . Presentan altas superficies de contacto gas-líquido y bajos costos de operación, pero poseen un bajo control en las condiciones de crecimiento y ocupan grandes volúmenes. En estos sistemas se deben tener en cuenta diferentes parámetros como el tipo de relleno, humedad, temperatura, pH, velocidad de flujo, caída de presión y tiempo de residencia de la fase gas entre otros (Castro, 2009).

Los biofiltros percoladores (BTF) consisten en reactores de oxidación biológica donde el gas entra al reactor en contracorriente a la fase líquida, permitiendo que los contaminantes absorbidos en el líquido se encuentren en contacto constante con el microorganismo para alcanzar una eliminación rápida (Figura 5.c). Esta tecnología presenta grandes ventajas como bajas caídas de presión, equipos compactos, mayor estabilidad, bajo coste de operación y una mayor facilidad de controlar los parámetros operacionales, además de una alta eficiencia de eliminación ( $>90\%$ ). Sin embargo requiere el suministro continuo de nutrientes, elevados costes de inversión y posible taponamiento del sistema por la biomasa (Yu et al., 2022).

En cuanto a los biorreactores de tanque agitado (Figura 5.a), los microorganismos se encuentran suspendidos en el medio de cultivo gracias a la agitación mecánica que proporciona la homogeneización del contenido del biorreactor y la mejora de la transferencia gas-líquido en el medio. La corriente gaseosa contaminada es introducida directamente mediante difusor. Esta técnica permite un entorno controlado para el crecimiento de microorganismos. La homogeneidad de las variables en todos los puntos del reactor asegura una mayor eficacia y rendimiento de los bioprocesos (Cultipliy, 2022). Además, esta configuración permite la extracción de la biomasa para una posible valorización.

Por último, los biorreactores airlift (Figura 5.b) son otro tipo común de reactores biológicos basados en la circulación de burbujas de gas con el objetivo de mezclar el medio de cultivo y mantener a los microorganismos en suspensión (Cultipliy, 2022). A diferencia de los biorreactores de tanque agitado, no requiere agitación mecánica, sino que su agitación es neumática y son empleados generalmente en bioprocesos donde la transferencia gas-líquido es importante. Además su simplicidad (no requiere partes móviles), su bajo consumo energético y las elevadas tasas de transferencia de calor y masa la convierten en una alternativa de gran interés (Braga et al., 2015).

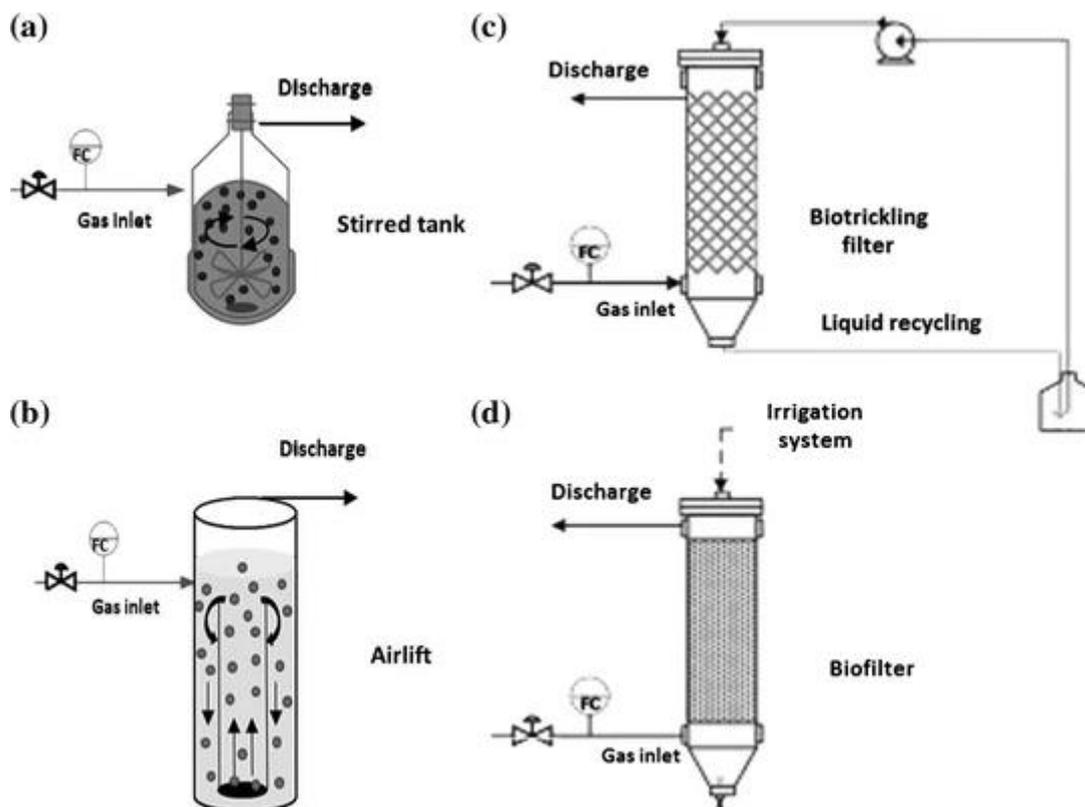


Figura 5: Principales configuraciones de biotecnologías orientadas al tratamiento de COVs: a) Biorreactor de tanque agitado, b) Biorreactor Airlift, c) Biofiltro percolador, d) Biofiltro (Cantera et al., 2017a)

Aunque estas tecnologías ya han sido implementadas a escala real, aún existen limitaciones en los procesos debido a que suelen ser más lentos que los procesos físico-químicos, a la poca experiencia e información hasta ahora sobre las posibles mejoras a aplicar para aumentar la eficiencia y rentabilidad del proceso, las limitaciones en la transferencia gas-líquido, la identificación de nuevas especies viables y la búsqueda de condiciones óptimas de cultivo y operación. Por ello, es necesario desarrollar nuevos estudios a escala de laboratorio para superar dichas limitaciones y optimizar los procesos en planta real.

## 1.4. Bioconversión de COVs en productos valiosos

Los procesos biológicos desarrollados durante los últimos años han permitido observar la capacidad de ciertos microorganismos de generar productos de valor a partir de la biodegradación de compuestos contaminantes residuales empleándolos como fuente de carbono y energía. Esto permite abaratar los costes en la obtención de estos compuestos, los cuales se producen tradicionalmente empleando azúcares como materia prima que representan hasta el 50% del coste de producción y compiten con el mercado alimentario (Zeng, 2019). A pesar de ello, hasta ahora casi no hay estudios sobre la biotransformación de COVs en sustancias con valor de mercado.

### 1.4.1. Bioplásticos

Uno de los escasos bioproductos que se han sintetizado hasta el momento a partir de COVs son los bioplásticos, siendo los polihidroxialcanoatos (PHA) los más comunes (Figura 6),

como el poli-3-hidroxitbutirato (PHB) o el poli-3-hidroxitvalerato (PHV). Los bioplásticos consisten en poliésteres lineales producidos de forma natural en condiciones de limitación de nutrientes (N, O, P, S o Mg) y exceso de carbono, como una reserva de carbono y energía, por varios géneros bacterianos (Figura 6). La intensa necesidad de sustituir los plásticos tradicionales derivados de combustibles fósiles por productos más respetuosos medioambientalmente ha provocado un interés comercial acerca de este tipo de bioproductos, ya que éstos presentan propiedades mecánicas muy similares a algunos plásticos convencionales como el polietileno (PE) o polipropileno (PP) con el añadido de ser biodegradables y biocompatibles (Cantera et al., 2017a).

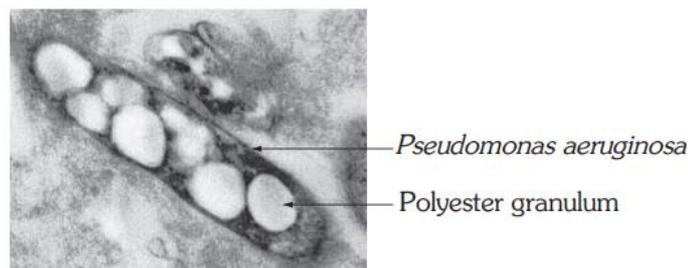


Figura 6: Acumulación de PHAs en *P.aeruginosa* (Yadira & Riaño, 2010)

Se ha reportado una pequeña variedad de microorganismos degradadores de COVs capaces de producir PHAs (Tabla 4). Varias especies de *Pseudomonas* son capaces de producir PHAs de cadena media a partir de diferentes COVs. Además, algunas especies del género *Rhodococcus*, como *Rhodococcus aetherivorans* son capaces de producir PHB empleando COVs aromáticos.

Tabla 4: Acumulación de PHA en cultivos bacterianos de BTEXS

Microorganismo	COV	Contenido máx PHA*	Tipo Reactor	Condiciones operación	Referencias
<i>P. putida</i> F1	Tolueno (L) Benceno (L) ETB (L)	22% 15% 14%	Pruebas por lotes (matraces agitados)	T=30°C; pH=7 [Hidrocarburo aromático] = 0.7% vol	(Nikodinovic et al., 2008)
<i>P. putida</i> mt-2	Tolueno (L) p-xileno (L)	22% 26%			
<i>P. putida</i> CA-3	Estireno (L)	32,9%			
Cultivo mixto: <i>P. putida</i> F1, mt-2 y CA-3	BTEXS (L)	36%	Pruebas por lotes en STR	T=30°C; pH= 6.8 Tiempo operación: 48h	
<i>Pseudomonas fulva</i> TY16	Tolueno (G) ETB (G)	58,9% 28,6%	Pruebas por lotes en STR	T=30°C; pH= 7 Tiempo operación: 50h Alimentación tolueno: 0.42 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	(Ni et al., 2010)
<i>Pseudomonas</i> sp. TN301	Tolueno (L) o-xileno (L) BTEX (L)	14,8% 19,2% 25%	Pruebas por lotes	Tiempo operación: 48 h [Hidrocarburo aromático] = 0.7% vol	(Narancic et al., 2012)

<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IAR1	Tolueno (L)	18%	Pruebas de lotes alimentados	T=28°C Tiempo operación: 72 h [Tolueno] = 0.06% vol.	(Hori et al., 2009)
--	-------------	-----	------------------------------	--	---------------------

L: contaminante alimentado en forma líquida; G: contaminante alimentado en forma gaseosa; ETB: etilbenceno; STR: reactor de tanque agitado; \*Contenido máximo de PHA expresado en %p/p

Uno de los principales problemas de los PHAs es que poseen poco valor en el mercado (2-7 €/kg) y que ya se producen industrialmente de manera eficiente usando una gran cantidad de sustratos (Pesante & Frison, 2023), por lo que se están investigando nuevas alternativas para la bioconversión de compuestos orgánicos volátiles en nuevos productos con mayor valor social y económico. En este caso, uno de los sectores con mayor movimiento en el mercado es el sector farmacéutico, el cual maneja un mercado de 1,4 billones de dólares (Statista, 2021), por lo que el estudio de bioconversión de COVs en bioproductos de interés en estos sectores puede ser una gran alternativa, tratándose de un campo inexplorado hasta ahora.

## 1.5. Biomoléculas de interés farmacéutico y médico.

Hasta ahora, los únicos bioproductos de interés obtenidos a partir de la biotransformación de compuestos orgánicos volátiles se basaban en los bioplásticos mencionados anteriormente. Sin embargo, su transformación en compuestos de alto valor de mercado, como los fármacos y los cosméticos podría ayudar a fomentar y rentabilizar sus eliminaciones, y promovería una economía circular y neutra con el clima.

Compuestos interesantes, por su alto valor son los osmolitos o solutos compatibles generados por microorganismos cuando se exponen a ambientes extremos, como la alta salinidad (Becker & Wittmann, 2020). Los solutos compatibles pueden ser de diferentes clases estructurales como azúcares (p.ej. sacarosa), polioles (p.ej. glicerol), diaminoácidos N-acetilados, betaínas (glicina betaína y sus derivados) o inminoácidos (p.ej. prolina o glutamato). En los inminoácidos se incluyen ectoínas, como la ectoína e hidroxiectoína. Las bacterias emplean diferentes solutos para su equilibrio osmótico en función de diferentes factores como la salinidad, la duración del estrés osmótico, la fuente de carbono empleada en su cultivo o la disponibilidad de sustratos y osmolitos en el entorno (Pastor et al., 2010).

### 1.5.1. Ectoína e hidroxiectoína

Entre los osmolitos producidos se encuentra la ectoína, y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína, solutos compatibles que proporcionan equilibrio osmótico a una gran variedad de bacterias halotolerantes. La ectoína (ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) es un iminoácido cíclico, derivado del aspartato (Figura 7a) (Becker & Wittmann, 2020). Se trata de un compuesto soluble en agua, de bajo peso molecular (142,16 g/mol) y zwitteriónico (Ng et al., 2020).

La hidroxiectoína, derivado hidroxilado de la ectoína, se trata de otro soluto compatible de interés comercial (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) (Figura

7b). Se obtiene a partir de la hidroxilación biológica de la ectoína catalizada por la ectoína hidroxilasa (Pastor et al., 2010).

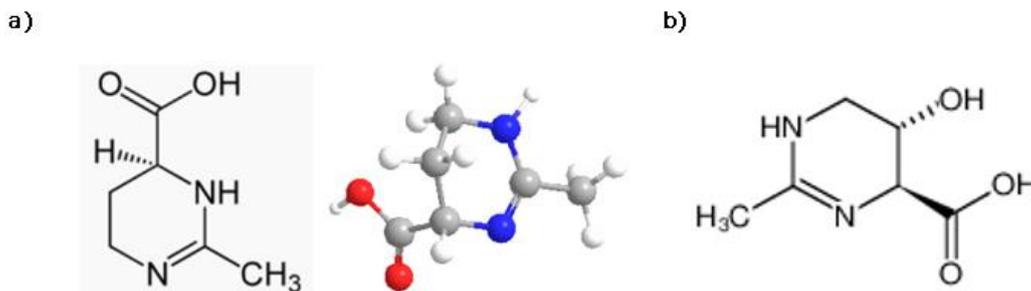


Figura 7: Estructura molecular de la ectoína (a) y de la hidroxiectoína (b)

Ambas moléculas son eficaces como estabilizadores de enzimas, complejos ADN-proteína y ácidos nucleicos frente a la acción nociva de altas salinidades, desecación, congelación y desnaturalización térmica, lo que las hace muy interesantes para su uso en cosmética, medicina o nutrición (Ng et al., 2020). Su gran interés hace que se hayan convertido en un producto de alto valor económico en el sector farmacéutico (1000 €/kg ectoína y 1200 €/kg hidroxiectoína) y cuya importancia de mercado se incrementa cada año (Cantera et al., 2020). En el caso de la hidroxiectoína presenta unas propiedades protectoras superiores a las de la ectoína, lo que la convierte en un producto de mayor valor. Además, tiene una función protectora frente al estrés por calor. Debido a las excelentes propiedades que presentan, se espera que su mercado siga creciendo, sobre todo enfocado a dos áreas principales, la industria farmacéutica y la industria médica. En cuanto a la industria farmacéutica, sus aplicaciones están orientadas hacia el sector cosmético, especialmente en productos relacionados con el cuidado de la piel y el cabello. Por otro lado, la industria médica está empezando a emplear la ectoína en aerosoles nasales y colirios, cremas para la dermatitis o en líquidos para inhalación pulmonar debido a sus propiedades antialérgicas y antidesecantes. Generalmente la ectoína y la hidroxiectoína son producidas de forma natural a la vez (Cantera et al., 2022c).

Actualmente estos osmolitos son producidos industrialmente mediante biotecnologías a partir de *Halomonas elongata* mediante un proceso llamado biomilking, consistente en una fermentación por lotes basada en choques hipo e hiperosmóticos de manera secuencial (Oren, 2010). La limitación que presenta es el alto coste del proceso y su baja sostenibilidad ya que requiere de azúcares de alta calidad, que compiten con el mercado alimentario (Cantera et al., 2017b), por lo que se están desarrollando estudios para la búsqueda de sustratos alternativos para su producción de forma barata y respetuosa medioambientalmente.

Las bacterias de los géneros *Halomonas*, *Brevibacterium* y *Chromohalobacter* son capaces de acumular grandes cantidades de ectoína (hasta 15,5% g/g biomasa) cuando se encuentran a altas salinidades, siendo la cepa *Halomonas elongata* la más común para su producción industrial. Las bacterias del género *Halomonas* son capaces de crecer en condiciones de salinidad de hasta el 35% de NaCl obteniendo concentraciones de ectoína entre 150-358 mg/g biomasa (Cantera et al., 2022b). Se han desarrollado estudios para la obtención de ectoína a concentraciones salinas inferiores a partir de microorganismos modificados, pero el rechazo por parte del mercado hace que se busquen nuevas alternativas (Cantera et al., 2022c).

Una alternativa poco desarrollada aún para la obtención de bioproductos de interés es el empleo de compuestos contaminantes como fuente de carbono. Esta alternativa presenta

la ventaja de utilizar un contaminante residual nocivo para la obtención de productos de alto valor, evitando así el empleo de materias primas de elevado coste y por lo tanto, reduciendo el coste del proceso. Estudios recientes han demostrado que algunos metanótrofos halotolerantes del género *Methylobacterium*, *Methylobacter* y *Methylohalobius* tienen la capacidad de producir ectoína en biorreactores hasta concentraciones del 3 al 10 % (g/g), empleando  $\text{CH}_4$  como fuente de carbono en función de la concentración de NaCl, lo que permite, además de obtener bioproductos valiosos, mitigar emisiones contaminantes (Cantera et al., 2018).

Sin embargo, no se conoce ninguna especie capaz de transformar COVs en ectoína e hidroxiectoína. Por ello, en investigaciones anteriores se ha desarrollado una búsqueda a través de minería genética en bases de datos públicas con el fin de encontrar bacterias capaces de degradar COVs y producir ectoína e hidroxiectoína de acuerdo con su material genómico. De dicha búsqueda se obtuvieron dos candidatos que potencialmente eran capaces de biotransformar tolueno en sustancias de alto valor (ectoína e hidroxiectoína): *Rhodococcus opacus* y *Halomonas stevensii*.

- *Rhodococcus opacus*

Se trata de una bacteria grampositiva aerobia con capacidad natural de tolerar y consumir compuestos aromáticos tóxicos (Figura 8-izqda). Presenta un gran potencial en la producción de sustancias valiosas a partir de compuestos aromáticos (Diao et al., 2022). Se ha comprobado su capacidad de producción de PHAs empleando COVs como fuente de carbono operando en reactor de tanque agitado bajo condiciones de limitación en nitrógeno, obteniendo productividades de PHAs de hasta el 39,7% en peso (Rodríguez, 2022). Presenta unas condiciones óptimas de cultivo de 28-30 °C y una concentración de NaCl máxima de 7% (Nazari et al., 2022).

- *Halomonas stevensii*

Se trata de una bacteria de tipo bacilo gramnegativa, aerobia, halófila, móvil, no formadora de esporas (Figura 8-drcha). En estudios anteriores se ha observado la capacidad que presentan de eliminar compuestos contaminantes como el  $\text{CO}_2$  en biorreactores continuos empleando el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono y tiosulfato como fuente de energía, obteniendo capacidades de eliminación de hasta 37,1  $\text{mg CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; y su capacidad de obtener sustancias de alto valor como ectoína a partir de dicha fuente de carbono, obteniendo concentraciones de ectoína de hasta el 22% (g/g) (Cantera et al., 2022b). Las condiciones de cultivo se encuentran a una temperatura entre 10-40 °C (óptimo 30-35 °C) y un pH entre 7-11 (óptimo pH 8-9). El rango de concentración salina en la que se observa crecimiento se encuentra entre 0-20% NaCl (óptima 3-7,5%) (Kim et al., 2010).

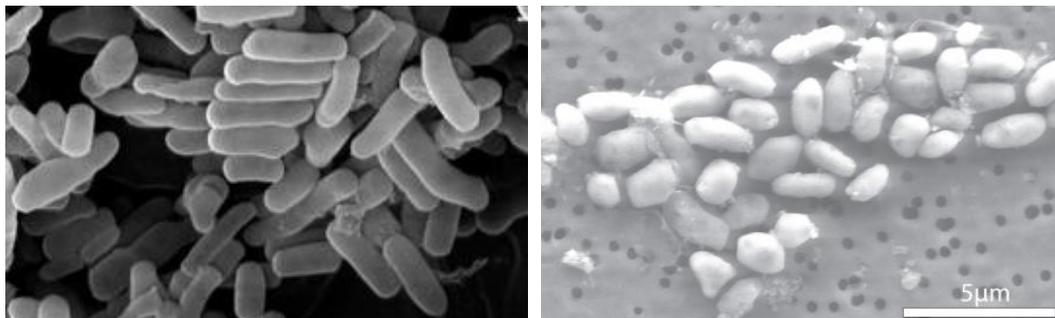


Figura 8: *Rhodococcus opacus* (izqda.) y *Halomonas sp.* (drcha.) (Wolfe-Simon et al., 2011)

## 2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo principal el estudio por primera vez de la biotransformación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) en compuestos de alto valor farmacéutico y médico empleando dos especies de bacterias, *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus*. Para ello se realizarán diferentes ensayos en lotes y en continuo operando a diferentes concentraciones salinas.

El presente estudio incluye los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la capacidad biodegradativa de tolueno de las especies bacterianas *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus*.
- Comparar la capacidad de producción de sustancias de alto valor de mercado por dichas especies bacterianas empleando tolueno como única fuente de carbono y energía.
- Evaluar la influencia de la concentración de NaCl en la biodegradación de COVs y producción de sustancias de alto valor de mercado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Inóculo y medio mineral empleado

##### - Inóculo empleado

Para realizar el estudio experimental se han empleado dos especies distintas de bacterias, *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus*, procedentes de la colección de cultivo Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Para cada tipo de ensayo, las bacterias fueron previamente crecidas introduciendo un 1% de inóculo fresco (2 mL/200 mL) en medio mineral M9 (Tabla 5) con glucosa como principal fuente de energía y carbono, transfiriendo posteriormente un 5% de inóculo crecido (10 mL/200 mL) a medio mineral salino de amonio (AMS) (Tabla 6) sin otra fuente de carbono o energía que el tolueno.

##### - Medio de cultivo

Como se ha mencionado anteriormente, para el estudio se emplearon dos tipos de medios, el medio mineral M9 y el medio mineral salino de amonio AMS. A continuación, se muestra la composición de las diferentes soluciones y el volumen empleado para los dos medios minerales:

##### 1) Medio mineral M9

Tabla 5: Composición medio mineral M9

<b>Solución I: Concentrado M9 (10X)</b>	<b>(100 mL/L)</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	75,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/L
NaCl	5 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
<b>Solución II</b>	<b>(20 mL/L)</b>
Glucosa (20%)	200 g/L
<b>Solución III</b>	<b>(1 mL/L)</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	246,5 g/L
<b>Solución IV</b>	<b>(0,3 mL/L)</b>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1M)	147 g/L
<b>Solución V</b>	<b>(1 mL/L)</b>
Biotina	1 g/L
<b>Solución VI</b>	<b>(1 mL/L)</b>
Tiamina	1 g/L
<b>Solución VII: Elementos traza</b>	<b>(10 mL/L)</b>
EDTA	5 g/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,83 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	0,168 g/L

CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,13 g/L
CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
HBO <sub>3</sub>	0,01 g/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0016 g/L

Las soluciones I, II, III y IV fueron autoclavadas a 121 °C durante 20 min para asegurar la esterilidad del proceso. En cuanto a las soluciones V, VI y VII fueron filtradas con filtros estériles de 0,22 μm para mantener la esterilidad del proceso, ya que no se pueden autoclavar dichas soluciones debido a que precipitarían.

## 2) Medio mineral salino de amonio (AMS)

Tabla 6: Composición medio mineral salino de amonio (AMS)

Medio mineral AMS	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/L
NaCl	*
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g/L
KNO <sub>3</sub>	1 g/L
TES Ácida	1 mL/L
TES Alcalina	1 mL/L

\*: Dependiendo de la concentración salina que se requiera

TES Ácida	
HCl (50 mM)	1,8 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (1 mM)	0,0618 g/L
MnCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,0613 g/L
FeCl <sub>2</sub> (7,5 mM)	0,9435 g/L
CoCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,0645 g/L
NiCl <sub>2</sub> (0,1 mM)	0,0129 g/L
ZnCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,0677 g/L
CuCl <sub>2</sub> (0,1 mM)	0,0134 g/L

TES Alcalina	
NaOH (10 mM)	0,4 g/L
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (0,1 mM)	0,0173 g/L
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> (0,1 mM)	0,0294 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (0,1 mM)	0,0205 g/L

El medio mineral se debe autoclavar a 121°C durante 20 min para asegurar su esterilidad. También se preparó una solución conjunta de vitaminas y solución 3B en una botella serológica donde se introdujo la solución 3B filtrada mediante filtros estériles de 0,22 μm y las vitaminas en un ratio 10:1 (Tabla 7).

Tabla 7: Composición solución 3B y solución de vitaminas

Solución 3B	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11 g/L
Solución Vitaminas	
Biotina	0,02 g/L
Nicotinamida	0,2 g/L
p-Ácido aminobenzoico	0,1 g/L
Tiamina (Vit B1)	0,2 g/L
Ácido pantoténico	0,1 g/L
Piridoxamina	0,5 g/L
Cianocobalamina (Vit B12)	0,1 g/L
Riboflavina	0,1 g/L

Para los ensayos en lotes se preparó medio AMS con una concentración de 30, 40, 50 y 60 g L<sup>-1</sup> NaCl. Para los ensayos operados en continuo se introdujo en el medio mineral AMS un agente tampón, piperazina-1,4-bis(ácido-2-etanosulfónico), con el objetivo de mantener estable el pH durante los ensayos. Todos los reactivos empleados en la elaboración de las preparaciones fueron adquiridos en PanReac AppliChem-ITW Reagents (Barcelona, España). En cuanto al compuesto contaminante empleado en el estudio se utilizó tolueno (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>, ≥99,5%) adquirido en Sigma-Aldrich (St.Louis, EE.UU).

### 3.2. Descripción del sistema experimental en continuo. Diagrama de flujo

El sistema experimental empleado para la elaboración del presente estudio se representa en el siguiente diagrama (Figura 9):

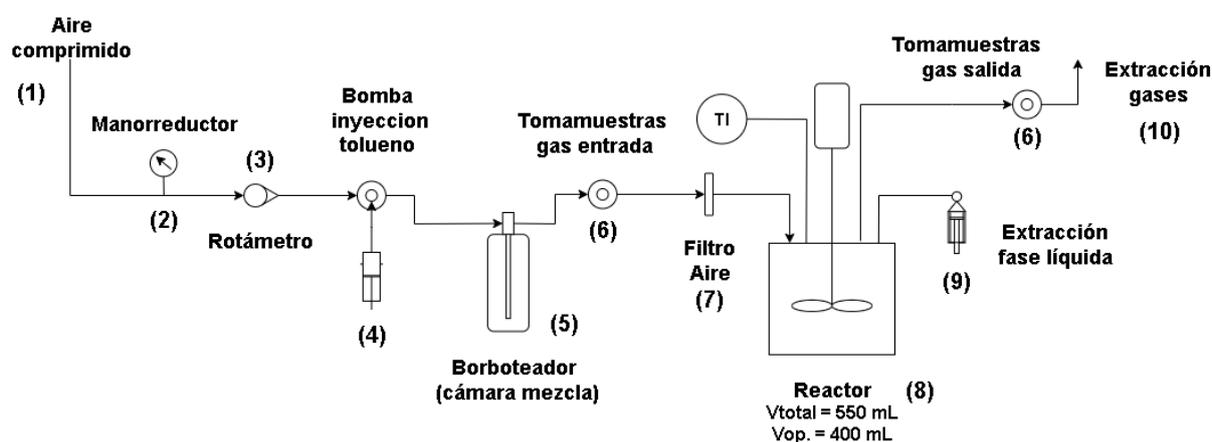


Figura 9: Diagrama de flujo del sistema experimental empleado

La corriente de entrada al sistema consiste en una corriente de aire comprimido (1) regulada mediante un manorreductor (2) y con un caudal de 40 mL/min ajustado mediante un rotámetro (3). En esta corriente se inyecta tolueno mediante una bomba de infusión (4) que dosifica la cantidad necesaria para obtener una concentración de tolueno a la entrada del reactor de 4 g/m<sup>3</sup>. El tolueno entra al sistema mediante una jeringa de líquidos de 5 mL en forma líquida, evaporándose en contacto con el aire. Esta corriente se homogeniza mediante un borboteador (5), y es filtrada mediante un filtro de aire (7) antes de entrar al

reactor (8). La corriente gaseosa entra al reactor por la parte inferior mediante un tubo difusor y abandona el sistema por la parte superior. El reactor es un biorreactor automatizado compuesto por un vaso de vidrio de 0,5 L de volumen útil y una torre de control (de la casa Applikon Biotechnology) con tres bombas peristálticas y varios sensores que permiten controlar el pH, temperatura, demanda de oxígeno o el nivel entre otros. En la parte superior incorpora un agitador de flujo radial. El reactor dispone en la parte superior de diferentes conexiones para la toma de muestra, la entrada y salida de las corrientes gaseosas, y para los sensores de pH y temperatura. El reactor fue operado a 150 rpm para alcanzar la mezcla completa y mejorar la transferencia de materia gas-líquido. Las muestras de las corrientes gaseosas se tomaron a la entrada y a la salida del reactor en los tomamuestras correspondientes (6), mientras que las muestras líquidas se extrajeron mediante jeringa a través de una conexión del reactor (9). La corriente gaseosa de salida se dirige finalmente hacia el sistema de extracción (10) instalado en el laboratorio.

### 3.3. Procedimiento experimental

#### - Experimentos operados en discontinuo

Para el crecimiento de los cultivos en medio mineral M9 con glucosa se emplearon dos botellas de vidrio de 1,2 L (una botella para cada tipo de bacteria). Dichas botellas se cerraron con septum de butilo herméticos y tapones de rosca y fueron autoclavadas a 121 °C durante 20 minutos antes de proceder a la inoculación. Una vez autoclavadas se inocularon con un 5% (10 mL/200 mL) de inóculo de cada una de las bacterias seleccionadas. Una vez inoculadas se colocaron en placas agitadoras (Fisher Scientific) para su agitación a 250 rpm a 25°C.

Tras el crecimiento de los cultivos en medio M9, dichos inóculos fueron transferidos a medio AMS a diferentes salinidades. Para los ensayos con *H. stevensii*, el medio AMS fue preparado con 3, 5 y 6% NaCl respectivamente, mientras que para *R. opacus* se preparó el medio AMS con una concentración salina del 3, 4, 5 y 6% NaCl para analizar la influencia de la salinidad en la capacidad de biodegradación de tolueno y producción de ectoína e hidroxietoína por parte de las especies bacterianas empleadas. Para ello, cada una de las especies crecidas se centrifugó a 7800 rpm durante 10 min, y el pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de medio AMS en condiciones estériles. Dicho inóculo se usó para llevar a cabo experimentos en lotes en triplicado y duplicado usando tolueno como fuente de carbono y energía. Para ello se usaron 4 botellas estériles de 1,2 L por ensayo, donde se introdujeron 190 mL de AMS, a la salinidad correspondiente del ensayo, y 10 mL del inóculo resuspendido (excepto en el control abiótico). El tolueno se añadió a cada botella mediante una jeringa de líquidos de 5 µL, inyectando en las botellas 4,6 µL de tolueno (equivalentes a 4 g/m<sup>3</sup> en la fase gas) como única fuente de carbono y energía. Una vez introducido el contaminante se colocaron las botellas en placas agitadoras a 250 rpm a 25°C (Figura 10). Después de 30 minutos en agitación se tomó la primera muestra del espacio de cabezas como punto inicial del estudio, a partir del cual se pudo analizar la evolución de la degradación de tolueno a lo largo del experimento.

Los ensayos se realizaron analizando periódicamente la concentración de tolueno, la densidad óptica y el pH de las botellas a lo largo del tiempo. Las botellas de ensayo fueron alimentadas de nuevo con tolueno una vez que se consumía por completo el tolueno en el espacio de cabezas, iniciando un nuevo ciclo de consumo. Tras cinco ciclos de consumo,

se extrajeron muestras del caldo de cultivo de cada botella para determinar la producción de ectoína e hidroxiectoína.

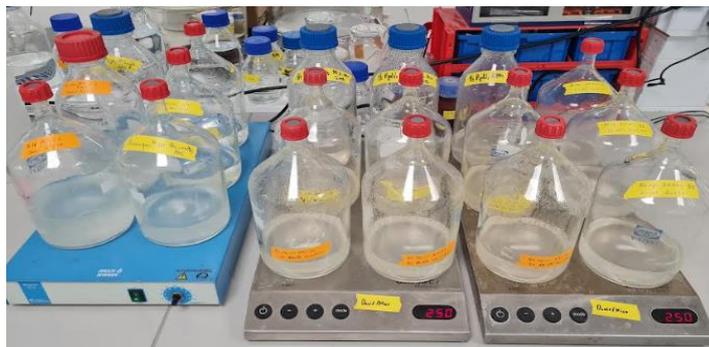


Figura 10: Ensayos biodegradación tolueno *R.opacus* y *H.stevensii*

### - Experimentos en continuo

Durante esta fase experimental se procedió al montaje del sistema en continuo (Figura 11), en el cual se realizaron previamente las pruebas hidráulicas y se comprobaron todas las conexiones del sistema para comprobar la ausencia de posibles fugas. Inicialmente se realizó un test abiótico (24 horas) antes de la inoculación del sistema para descartar la posible eliminación del tolueno de forma físico-química. Para ello el reactor se esterilizó con 400 mL de medio AMS, se conectó y se controló la presión de la línea de aire a 1 bar ajustando el flujo de la corriente de aire a 40 mL/min. Posteriormente se puso en marcha la bomba de jeringa, ajustando un flujo de inyección de tolueno de 0,19  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el tiempo de residencia en 10 minutos. Se dejó estabilizar el sistema y se tomó una muestra de gas en la entrada y salida del reactor para observar las concentraciones de tolueno en ambos puntos. Cuando se obtuvo la misma concentración de tolueno a la entrada y salida se procedió al experimento biótico.

Una vez finalizado el ensayo abiótico se procedió a inocular el reactor. Para ello se usó como inóculo el centrifugado de los experimentos en lotes resuspendido en 50 mL de medio AMS estéril. Se extrajeron 50 mL del medio AMS del reactor y se reemplazaron con los 50 mL de inóculo para tener un volumen operacional en el reactor de 400 mL. Se realizaron dos ensayos en continuo, el primero a partir de *R. opacus* en medio AMS 3% NaCl mediante el inóculo aclimatado en los ensayos batch a dicha concentración salina, y el segundo a partir de *H.stevensii* en medio AMS 6% NaCl mediante inóculo aclimatado en los ensayos batch correspondientes a dicha salinidad. Se operó a diferentes concentraciones de sal para observar su influencia en la capacidad de los cultivos para eliminar el contaminante y producir osmolitos.

En cada ensayo se evaluaron diariamente las concentraciones en fase gas de tolueno,  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  en la entrada y salida del reactor, la densidad óptica y el pH del cultivo, y diferentes parámetros operacionales como el caudal, presión y temperatura del sistema. También se extrajeron diariamente muestras para determinar la acumulación de ectoína e hidroxiectoína. Por último, al inicio y al final de cada ensayo se tomaron muestras adicionales de la fase líquida para la evaluación del carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico (IC) y nitrógeno total (TN), además de la determinación de sólidos suspendidos totales (SST).



Figura 11: Imagen del sistema experimental propuesto

### 3.4. Métodos analíticos

Los diferentes parámetros evaluados en los ensayos en lotes y en continuo fueron analizados mediante las siguientes técnicas de análisis:

La evolución en la concentración de tolueno en las botellas y en el reactor se analizó diariamente mediante un GC-FID (cromatógrafo de gas con detector de ionización de llama) del modelo Agilent 8860 GC System equipado con una columna HP-5 ms (30m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m). En el método de análisis empleado, tanto la temperatura del inyector como la del detector se mantuvieron constantes a 250°C. El cromatógrafo presenta dos rampas de temperatura en la columna, la primera va desde 40°C hasta 180°C y la segunda desde 180°C hasta 200°C, y una presión en el inyector de 14,2 psi. El muestreo se llevó a cabo mediante una jeringa de gases hermética con válvula de cierre de 250  $\mu$ l.

Para el análisis de las concentraciones de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en la fase gas, se empleó un GC-TCD (cromatógrafo de gas con detector de conductividad térmica) del modelo Bruker 430-GC equipado con una columna CP-Molsieve 5Å GC (15m x 0,53mm x 15 $\mu$ m). En el método analítico, las temperaturas en el horno, inyector y detector se mantuvieron en 45, 150 y 200°C, respectivamente. Las muestras fueron tomadas mediante una jeringa de gases hermética con válvula de cierre de 100  $\mu$ l.

A partir de las rectas de calibrado de cada compuesto, que relacionan el área con su concentración, se determinaron las concentraciones de cada compuesto presente en la muestra (Anexo I).

En cuanto al análisis de la fase líquida se analizó el pH de las muestras mediante un pH-Meter BASIC 20+ (Crison, España) equipado con un electrodo de membrana de vidrio. Además, se analizó la densidad óptica (OD) para observar la evolución del crecimiento del inóculo mediante el empleo de un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Japón).

El análisis de sólidos suspendidos totales (SST) se realizó mediante análisis por peso seco, en el cual la muestra es filtrada a vacío y el filtro es posteriormente secado en estufa a 70°C durante un día. Una vez a temperatura ambiente se determinó la diferencia entre el peso del filtro antes y después del proceso. Mediante la curva de calibrado de sólidos realizada se obtiene la concentración de biomasa a partir de la OD obtenida (Anexo II).

El análisis de ectoína e hidroxiectoína se realizó centrifugando 2 mL de medio de cultivo a 12000 rpm durante cinco minutos en tubos Eppendorf y retirando el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces para concentrar la biomasa. Una vez obtenido el pellet se llevó a congelar a -20°C. Para la medición de los solutos se resuspendió el pellet en etanol 70% y añadiendo zirconia se introdujo en un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, EE.UU.) para romper la célula y extraer el soluto intracelular realizando tres ciclos de un minuto. Después se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante dos minutos y se extrajo 1 mL de sobrenadante filtrado en viales de HPLC. El análisis de ectoína e hidroxiectoína se analizó mediante un HPLC Prominence-i LC-2050C (Shimadzu Corporation, Japón) equipado con un detector UV a 210 nm. El HPLC lleva incorporado un Polaris, NH<sub>2</sub>, 180 Å, 3 µm, 4,6 × 150 mm (Agilent Technologies, EE.UU.). La fase móvil fue acetonitrilo/H<sub>2</sub>O 75/25 (%) a un caudal de 0,6 mL/min. La temperatura del horno fue fijada en 30°C. Se emplearon patrones externos de ectoína (95% pureza) e hidroxiectoína (95% pureza) (Sigma Aldrich, Alemania). A partir de las rectas de calibrado, que relacionan el área con su concentración, se determinaron las concentraciones de cada osmolito presente en la muestra (Anexo III).

La temperatura del reactor se monitorizó mediante un sensor de temperatura incorporado en el propio equipo, la presión mediante un medidor de presión y el caudal a través de la variación de volumen de agua mediante probeta invertida, en la cual la línea de salida de gas del reactor se introduce durante un tiempo determinado.

La determinación de TOC, IC y TN disuelto en el caldo de cultivo se realizó empleando un analizador de carbono orgánico total del modelo TOC-L CPH unido al equipo TNM-1 (Shimadzu Corporation, Japón) con un tiempo de análisis medio por vial de 20 minutos.

### 3.5. Cálculos realizados

Para evaluar el rendimiento del sistema propuesto se han empleado los siguientes parámetros de análisis:

**Eficacia de eliminación (RE):** La eficacia se calcula como el cociente entre la diferencia de concentración del COV a la entrada y a la salida del reactor respecto a la concentración de entrada, medida en tanto por ciento (%):

$$RE (\%) = \frac{[COV]_{Entrada} - [COV]_{Salida}}{[COV]_{Entrada}} \cdot 100$$

*Ecuación 1: Cálculo RE*

Donde  $[COV]_{Entrada}$  y  $[COV]_{Salida}$  hacen referencia a las concentraciones (g/m<sup>3</sup>) del COV a la entrada y a la salida del biorreactor.

**Capacidad de eliminación (EC):** Se determina como la cantidad de compuesto orgánico volátil eliminado por volumen de corriente tratada y por tiempo expresado en g/(m<sup>3</sup>·h).

$$EC \left( \frac{g}{m^3 \cdot h} \right) = \frac{([COV]_{Entrada} - [COV]_{salida}) \cdot \dot{V}}{V}$$

Ecuación 2: Cálculo EC

Siendo  $[COV]_{Entrada}$  y  $[COV]_{salida}$  las concentraciones de COV a la entrada y a la salida del biorreactor en  $g/m^3$ ,  $\dot{V}$  el caudal de corriente gaseosa tratada en  $m^3/h$  y  $V$  el volumen del reactor en  $m^3$ .

**Rendimiento de osmolito:** Se determina como el cociente entre la concentración de osmolito obtenido de la muestra y la concentración de biomasa presente. La concentración de soluto se determina a partir del área obtenida del análisis en el HPLC mediante la recta de calibrado correspondiente. Como la muestra se concentró dos veces, dicha concentración debe dividirse a la mitad para obtener la concentración real en  $mg_{soluta}/L$ . En cuanto a la concentración de sólidos, se determina a partir de la densidad óptica de la muestra mediante la curva de biomasa en  $g_{SST}/L$ . El resultado obtenido se expresa en  $mg_{soluta}/g_{SST}$ :

$$Producción\ soluto \left( \frac{mg_{soluta}}{g_{SST}} \right) = \frac{[Soluta] \left( \frac{mg}{L} \right)}{[Biomasa] \left( \frac{g}{L} \right)}$$

Ecuación 3: Cálculo del osmolito acumulado

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Ensayos en discontinuo

Los ensayos operados por lotes permitieron realizar un seguimiento de la capacidad de las especies empleadas para la eliminación de tolueno y la influencia de la salinidad del medio mineral en el proceso de biodegradación del contaminante. Además, tras el quinto ciclo de consumo de tolueno, se tomaron muestras del medio de cultivo para su posterior análisis y valoración de la producción de sustancias de alto valor farmacéutico (ectoína e hidroxiectoína), observando la influencia de la salinidad del medio en la producción de dichas sustancias de alto valor.

- Estudio de biodegradación de tolueno

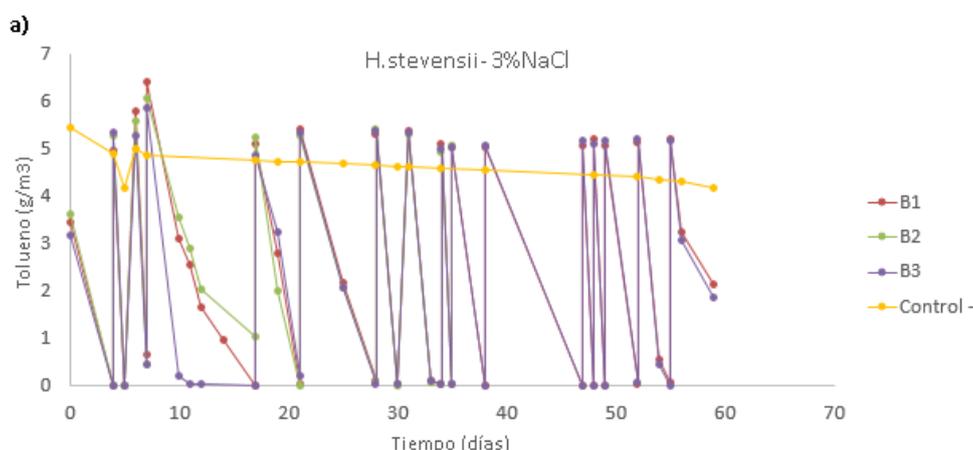
#### Ensayos *Halomonas stevensii*

Se realizaron tres ensayos en los cuales se comprobó la capacidad de eliminación de la cepa, su adaptación al contaminante y la influencia de la salinidad en su adaptación. El primer experimento, realizado a una salinidad del 3% NaCl, se llevó a cabo por triplicado durante 59 días y se observó que tras cuatro días de operación en fase de aclimatación, en los cuales no se observó consumo de tolueno, dio comienzo la fase exponencial, alcanzando eliminación completa de tolueno. Se realizaron 16 ciclos de consumo totales durante el primer ensayo (Figura 12.a).

En el segundo ensayo se incrementó la salinidad del medio hasta el 5% NaCl y se realizó un ensayo por duplicado en el cual se observó un consumo completo del contaminante el día 3 de operación, siendo alimentada posteriormente. El estudio tuvo una duración de 34 días y se realizaron 8 ciclos completos de consumo de tolueno (Figura 12.b).

El último ensayo se realizó por duplicado a una salinidad en el medio de cultivo del 6% NaCl, observando un primer consumo completo de tolueno el día 2 de ensayo. Tras ello se realizaron ciclos de consumo llegando a realizar durante los 31 días de ensayo 7 ciclos de consumo completos para la botella B1 y 6 ciclos para la botella B2, ya que esta última botella fue retirada el día 21 para su empleo en los ensayos en continuo (Figura 12.c).

A continuación, se muestra la evolución en las concentraciones de tolueno de los tres experimentos realizados (Figura 12):



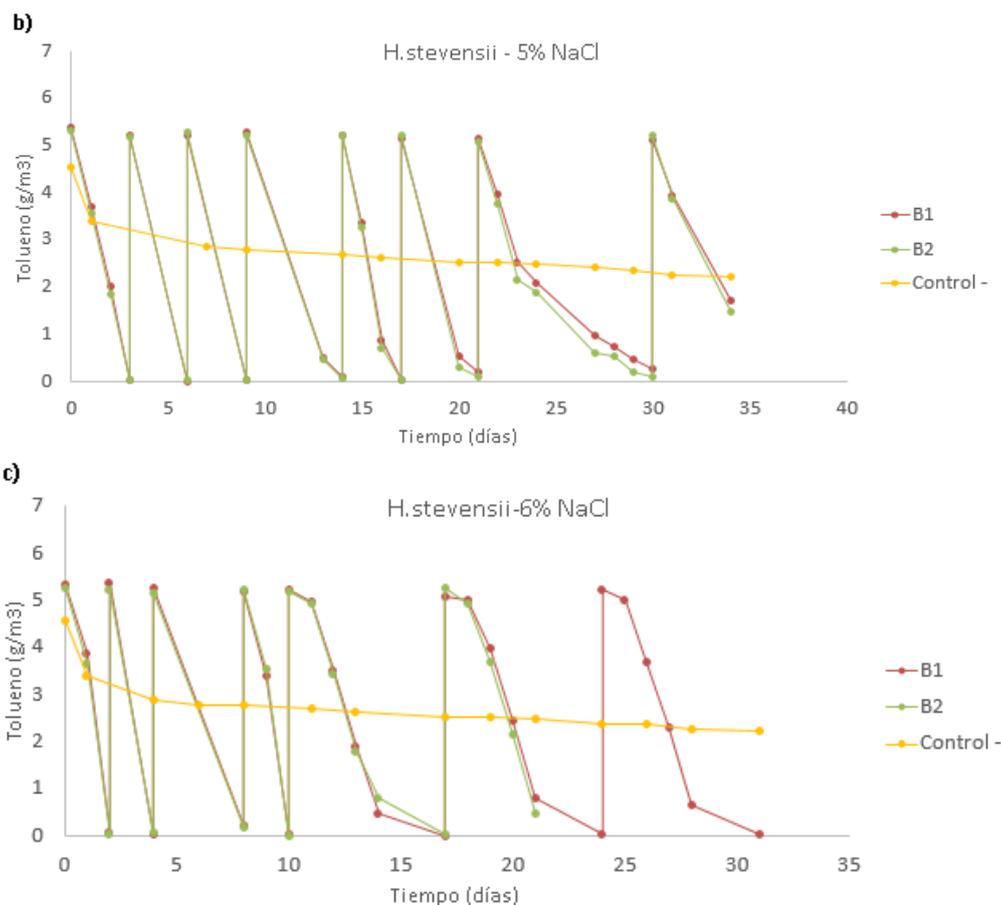


Figura 12: Evolución del consumo de tolueno en los ensayos por lotes con *H. stevensii* a una concentración salina del: a) 3% NaCl, b) 5% NaCl y c) 6% NaCl

Se puede apreciar que la concentración de tolueno en los controles abióticos va reduciéndose ligeramente en el tiempo debido posiblemente a la toma de muestras o por difusión; sin embargo, no presentan la tendencia del resto de botellas con biomasa, indicando que en las botellas de ensayo biótico se está produciendo la biodegradación del tolueno por parte de *H. stevensii*. En el ensayo al 3% NaCl cada ciclo de consumo de tolueno de la fase gas tuvo una duración promedio de 3-4 días, mientras que los ensayos al 5 y 6% NaCl tuvieron una duración promedio de los ciclos entre 4-5 días, lo que indica que a mayor salinidad en el medio, la velocidad de degradación de tolueno por parte del inóculo se reduce, ya que una mayor concentración de NaCl limita el crecimiento microbiano.

Además, se monitorizó la evolución en el crecimiento del inóculo en cada ensayo, observando en prácticamente todas las botellas un crecimiento del inóculo debido al consumo de tolueno. Para el ensayo al 3% NaCl se observó un crecimiento de biomasa desde  $352,7 \pm 22,3$  mg/L hasta  $406,4 \pm 22,3$  mg/L, en el ensayo al 5% un incremento de la concentración desde  $68,9 \pm 5,9$  mg/L hasta  $73,6 \pm 5,9$  mg/L, y para el ensayo al 6% desde una concentración de  $163,1 \pm 8,7$  mg/L hasta  $179,7 \pm 7,2$  mg/L. Se observa un mayor crecimiento del inóculo en el ensayo a una salinidad del 3% NaCl, debido a que se han realizado una gran cantidad de ciclos de consumo de tolueno (16 ciclos), superior a la del resto de ensayos realizados con esta especie, lo que hace que el inóculo haya podido crecer a partir de su aclimatación y consumo de tolueno como fuente de carbono y energía. Estudios previos permitieron demostrar la capacidad de biodegradar tolueno a partir de microorganismos, como (Maliyekkal et al., 2004), en el cual se obtuvieron eficacias de eliminación de tolueno del 100% empleando un consorcio mixto microbiano.

### Ensayos *Rhodococcus opacus*

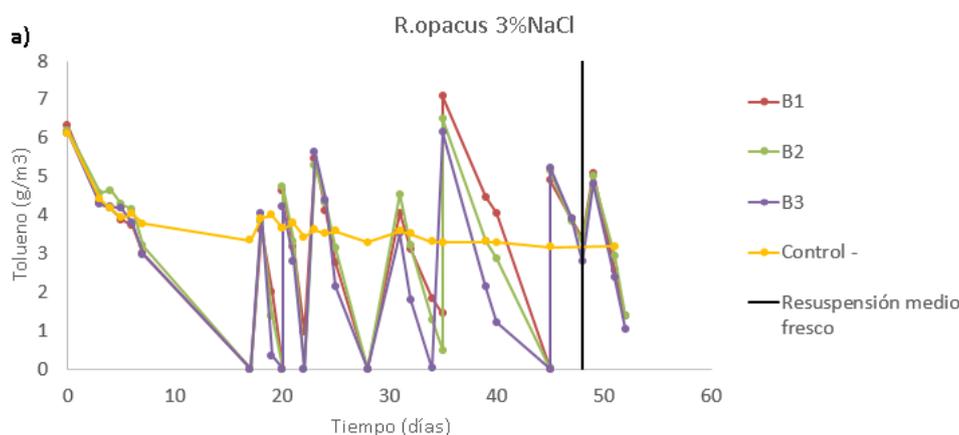
Para la bacteria *Rhodococcus opacus* se realizaron cuatro ensayos. El primer estudio se llevó a cabo por triplicado a una concentración salina del 3% NaCl durante 52 días. Se observa una disminución progresiva de la concentración de tolueno desde el día 1 de operación hasta el día 17, en el cual el inóculo consumió el contaminante de forma completa. Tras su consumo se procedió a alimentar de nuevo con tolueno y se observó su degradación hasta un total de 6 ciclos completos. Al final del ensayo, el día 48 de operación, se procedió a resuspender el inóculo en medio mineral fresco debido a una posible limitación de nutrientes que hacía que los ciclos tuvieran mayor duración (Figura 13.a).

En el segundo ensayo se procedió de forma similar al ensayo anterior, aumentando la concentración salina al 4% NaCl. En este caso, *R. opacus* previamente crecido en medio M9 fue capaz de consumir el tolueno de manera completa el día 3 de ensayo, realizando durante los 46 días de ensayo 9 ciclos de consumo de tolueno completos cuya duración fue de 2-3 días. El día 35 de ensayo se procedió a resuspender el inóculo en medio mineral fresco para no limitar el sistema de nutrientes (Figura 13.b).

En el tercer ensayo se incrementó la concentración salina hasta el 5% NaCl. En este ensayo por duplicado el inóculo fue capaz de consumir de manera completa el tolueno el día 3 de ensayo, realizando 6 ciclos de consumo con una duración entre 5-6 días. El ensayo tuvo una duración de 34 días (Figura 13.c).

Por último, se realizó un ensayo por duplicado durante 31 días a una concentración salina del 6% NaCl. En este caso se observó que, tras 6 días de ensayo en fase de latencia, el inóculo consumió de manera completa el tolueno, dando comienzo la fase exponencial y realizando 11 ciclos de consumo completos con una duración entre 2 y 3 días (Figura 13.d).

La siguiente figura muestra la evolución en las concentraciones de tolueno de los cuatro ensayos realizados:



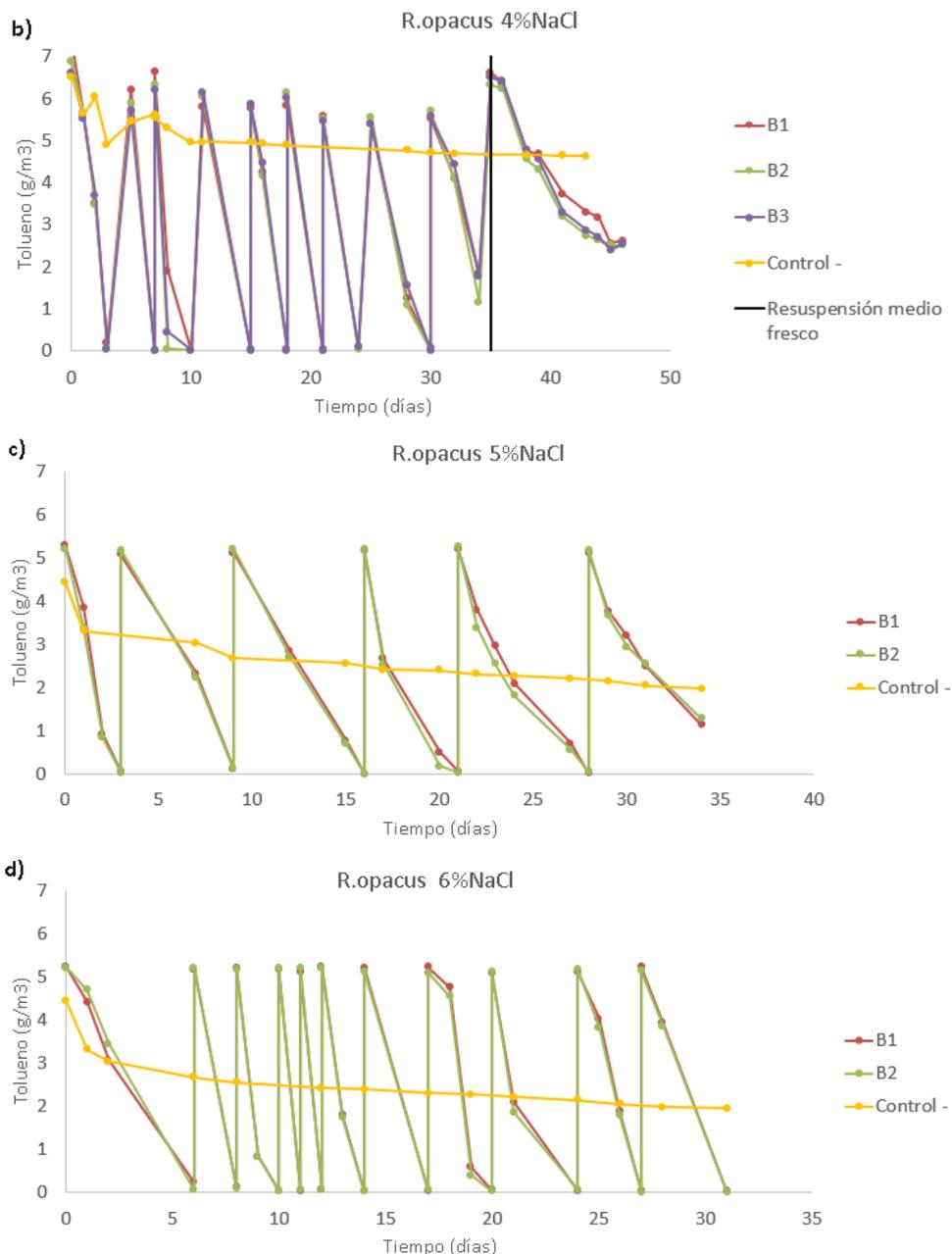


Figura 13: Evolución del consumo de tolueno en los ensayos por lotes con *R. opacus* a una concentración salina del: a) 3% NaCl, b) 4% NaCl, c) 5% NaCl y d) 6% NaCl

En todos los ensayos, la concentración de tolueno en el control abiótico tiende a disminuir ligeramente durante el desarrollo del estudio debido a la toma de muestras o por difusión, sin eliminarse completamente como en el caso de las botellas de ensayo, indicando que se ha producido biodegradación del tolueno por parte de la bacteria. Si fijamos el día 31 como día final para cada ensayo se observa que en el ensayo al 3% alcanza el quinto ciclo, el ensayo al 4% alcanza el noveno ciclo, el ensayo al 5% alcanza el sexto ciclo mientras que en el ensayo al 6% alcanza el undécimo ciclo. En este caso las velocidades de degradación de los ensayos al 3 y 6% NaCl no son coherentes, ya que en teoría, a mayor salinidad, hay un mayor estrés bacteriano, y por lo tanto una menor velocidad de degradación. Por el contrario, si sólo se comparan las cinéticas de los ensayos al 4 y 5% NaCl sí se observa la influencia de la salinidad en la cinética de degradación.

Además, se monitoreó la evolución del crecimiento del inóculo en cada ensayo, observando que en los ensayos al 3% NaCl la concentración de biomasa va disminuyendo progresivamente desde 0,55 g/L hasta 0,28 g/L debido a un descenso inicial por su aclimatación al contaminante, una progresiva falta de nutrientes en el medio de cultivo o por la producción de algún metabolito intermedio que impida el crecimiento de biomasa. En cuanto al crecimiento en el ensayo al 4% NaCl se observa un ligero crecimiento en la concentración de biomasa durante la fase exponencial los primeros 25 días de ensayo desde 0,43 g/L hasta 0,45 g/L, reduciéndose posteriormente hasta 0,33 g/L debido a que alcanzó la fase estacionaria, por la limitación progresiva de nutrientes del medio AMS inicial o por la producción de metabolitos intermedios que impidan el crecimiento de biomasa. En cuanto a los ensayos realizados al 5 y 6% NaCl se observa un incremento de la concentración de biomasa debido al estado de crecimiento bacteriano en su fase exponencial, degradando tolueno durante el análisis experimental, y observando un incremento de concentración de biomasa para el ensayo al 5% desde  $0,07 \pm 0,04$  g/L hasta  $0,16 \pm 0,02$  g/L, y para el ensayo al 6% desde  $0,23 \pm 0,0$  g/L hasta  $0,4 \pm 0,1$  g/L.

La elevada eficacia de eliminación de tolueno por parte de *Rhodococcus opacus* ya fue reportada en otros estudios como en (Rodríguez, 2022) en el cual se empleó la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 43205, la cual fue capaz de eliminar el tolueno con un rendimiento de eliminación del 100%.

- **Capacidad de producción de sustancias de alto valor**

Tras completar cinco ciclos de consumo de tolueno en cada ensayo experimental, se realizó un seguimiento de la producción de ectoína e hidroxiectoína por parte de las bacterias estudiadas y se analizó la influencia de la salinidad en su producción.

En cuanto a los ensayos con *H. stevensii* se observa que las concentraciones de ectoína en los tres ensayos son similares, con rendimientos promedio de  $0,72 \pm 0,1$ ,  $0,4 \pm 0,13$  y  $0,64 \pm 0,03$  mg/g biomasa para los ensayos a una salinidad del 3, 5 y 6% NaCl respectivamente (Figura 14). Si se comparan las concentraciones al 5 y 6% se observa un incremento de la concentración de ectoína, ya que la concentración de NaCl tiene un efecto determinante en la concentración de ectoína intracelular en relación a la presión osmótica, aumentando la concentración del osmolito con el aumento de NaCl (Lang et al., 2011). La concentración obtenida en el ensayo al 3% NaCl se ha atribuido al mayor número de ciclos de consumo de tolueno realizados comparados con el resto de ensayos, con un mayor aporte de carbono, por lo que dicho valor no puede compararse realmente con las concentraciones del resto de ensayos.

En cuanto a las concentraciones obtenidas de hidroxiectoína se observó que en el ensayo al 3% NaCl no se produjo dicho osmolito, mientras que para los ensayos al 5 y 6% se obtuvieron unas concentraciones de  $0,81 \pm 0,03$  y  $0,46 \pm 0,4$  mg/g respectivamente.

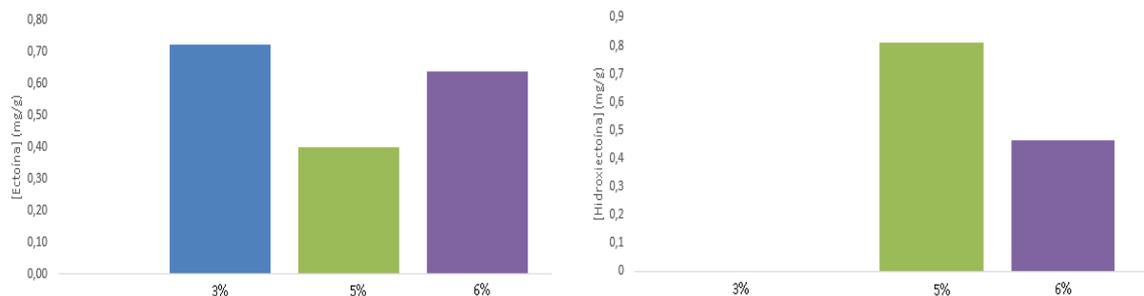


Figura 14: Producción de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) a diferentes salinidades en los ensayos batch con *H.stevensii*

En cuanto a los ensayos con *R. opacus* se observa que las concentraciones de ectoína van incrementándose a medida que aumenta la salinidad del medio, con concentraciones promedio de  $0,12 \pm 0,03$ ,  $0,25 \pm 0,05$ ,  $0,27 \pm 0,05$  y  $0,92 \pm 0,17$  mg/g biomasa para los ensayos a una salinidad del 3, 4, 5 y 6% NaCl respectivamente (Figura 15). Respecto a las concentraciones obtenidas de hidroxiectoína se observó que en los ensayos al 3 y 4% NaCl se obtuvieron concentraciones inferiores ( $0,46 \pm 0,2$  y  $0,27 \pm 0,07$  mg/g respectivamente) en comparación con las producciones de los ensayos al 5 y 6% NaCl ( $2,60 \pm 0,54$  y  $1,62 \pm 0,12$  mg/g respectivamente). Se obtuvo una mayor concentración de osmolitos a altas salinidades debido a que al encontrarse la bacteria a un mayor estrés salino, sintetiza mayor cantidad de osmolitos de manera intracelular para alcanzar el equilibrio osmótico (Ng et al., 2020).

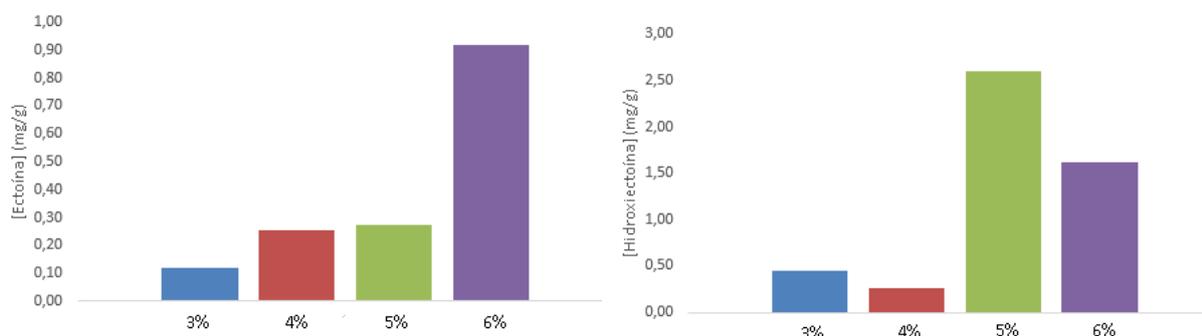


Figura 15: Producción de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) a diferentes salinidades en los ensayos batch con *R.opacus*

Si comparamos los resultados obtenidos de las producciones de ectoína de ambas especies se puede observar que las concentraciones obtenidas en las dos especies son similares para el mismo ensayo (Figura 16), excepto en el ensayo a una concentración salina del 3%, en la cual la diferencia de concentración producida es notable debida probablemente a una mayor aclimatación al tolueno de *H.stevensii* en dicho ensayo. El ensayo al 4% para *H.stevensii* no se realizó por lo que no se puede comparar con la concentración de ectoína obtenida con *R.opacus* a dicha concentración salina.

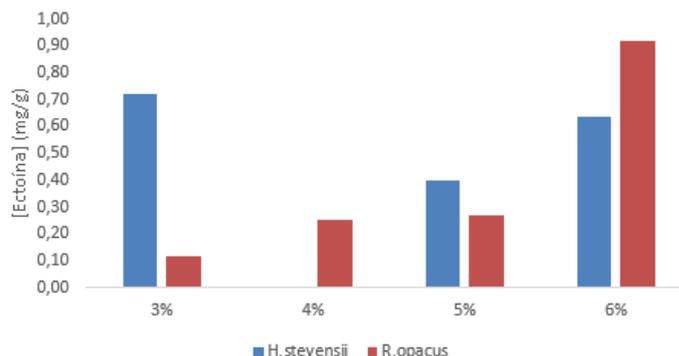


Figura 16: Comparación de la producción de ectoína entre las dos especies estudiadas: *H. stevensii* (azul) y *R. opacus* (rojo)

En cuanto a la producción de hidroxiectoína se observa una mayor producción en la cepa de *Rhodococcus opacus* en todos los ensayos a diferente salinidad (Figura 17). Esto puede deberse a que el inóculo se haya aclimatado mejor al tolueno que *H. stevensii*, generando una mayor producción de osmolito.

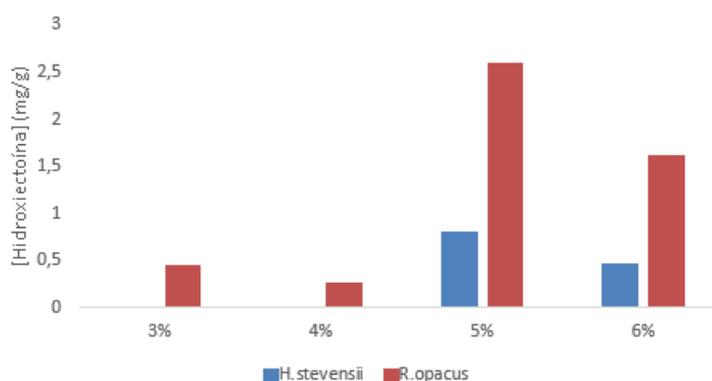


Figura 17: Comparación de la producción de hidroxiectoína entre las dos especies estudiadas: *H. stevensii* (azul) y *R. opacus* (rojo)

Las concentraciones de ectoína e hidroxiectoína obtenidas no son muy significativas en comparación a otros estudios realizados con diferentes fuentes de carbono. Esto se debe a que en este estudio se operó con concentraciones bajas de tolueno ( $4 \text{ g/m}^3$ ), por lo que la fuente de carbono suministrada fue pequeña. Además, en estudios previos se emplearon medios de elevada salinidad (15-20%), lo que mejora la producción de ectoína (Cantera et al., 2022b). Por ejemplo, (Sauer & Galinski, 1998) obtuvo concentraciones de ectoína en batch de  $155 \text{ mg/g}$  a partir de *Halomonas elongata* DSM 142T empleando glucosa como fuente de carbono. Otro estudio (Zhang et al., 2009) pudo obtener ectoína con una concentración de  $245,9 \text{ mg/g}$  a partir de *Halomonas salina* DSM 5928 empleando glutamato sódico como fuente de carbono.

Sin embargo, estos resultados de ectoína e hidroxiectoína permiten demostrar la posibilidad de bioconversión de compuestos orgánicos volátiles en sustancias de alto valor farmacéutico y médico.

## 4.2. Ensayos en continuo

Tras realizar los ensayos en lotes y observar la capacidad de las especies empleadas para eliminar tolueno y producir sustancias de alto valor, se llevaron a cabo dos experimentos en continuo en un reactor de tanque agitado alimentado con tolueno, el primero empleando *Rhodococcus opacus* como inóculo a una salinidad del medio del 3% NaCl, y el segundo empleando *Halomonas stevensii* con una concentración salina en el medio del 6% NaCl. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada ensayo:

- **Ensayo 1: *Rhodococcus opacus* (AMS 3% NaCl)**

Previamente a la inoculación y operación del reactor, se mantuvo durante un día operando el reactor en abiótico para asegurar que la degradación de tolueno es biológica una vez comenzase el estudio, descartando una posible eliminación físico-química. En este caso se puede apreciar una ligera diferencia entre la concentración de tolueno en la entrada ( $5,65 \pm 0,24 \text{ g/m}^3$ ) y en la salida ( $4,8 \pm 0,18 \text{ g/m}^3$ ) del reactor debido a una posible adsorción del tolueno en las paredes del reactor o en alguna conexión del sistema. Como se ha visto en previos estudios (Li et al., 2017), el tolueno tiende a volatilizarse y adsorberse en las superficies. Por ello, durante la operación del reactor en el ensayo se tuvo en cuenta dicha diferencia a la hora de evaluar la eficacia de eliminación del contaminante.

Después de realizar el test abiótico se procedió a inocular el reactor con el inóculo de *Rhodococcus opacus* empleado en el ensayo en lotes al 3% NaCl. Dicho ensayo tuvo que realizarse tres veces tras dos intentos en los cuales no se obtuvieron resultados favorables. En el primer intento se operó el sistema durante 7 días sin observar una degradación significativa de tolueno, alcanzando una eficacia máxima de eliminación del 5,4% el día 3 de ensayo (Figura 18).

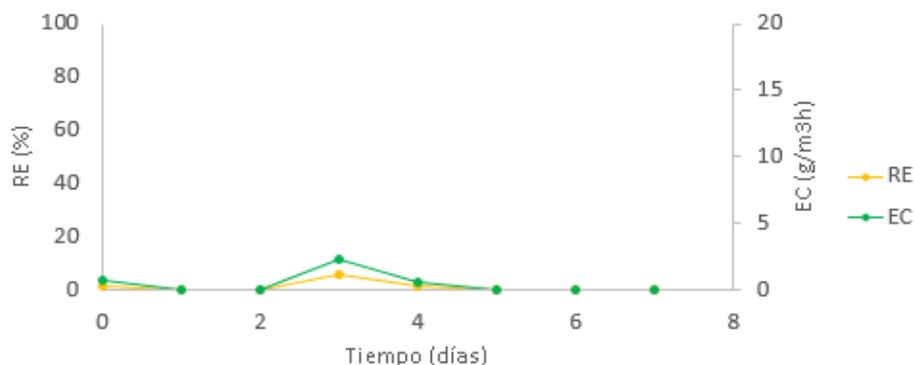


Figura 18: Eficacia (RE) y capacidad (EC) de eliminación de tolueno durante Ensayo 1 R1

En el ensayo se observó que el pH del medio de cultivo experimentó una disminución significativa a lo largo del estudio desde un pH inicial de 6,83 hasta un pH el día 7 de ensayo de 4,48. Esta disminución del pH puede deberse a la producción de metabolitos secundarios ácidos como el ácido benzoico durante la degradación de tolueno por parte de las bacterias (Pruneda et al., 2015), lo que provocó una acidificación del medio y por lo tanto la muerte de las bacterias, ya que dichas bacterias suelen crecer a pH superiores a 6,8 (Janßen et al., 2013). La posible muerte de las bacterias se puede corroborar con la disminución progresiva que se observa en la concentración de biomasa durante el ensayo desde 0,234 g/L hasta 0,156 g/L (Figura 19), debido a la acidificación del medio del medio

de cultivo que impidió el crecimiento celular y la eliminación de tolueno por parte del cultivo.

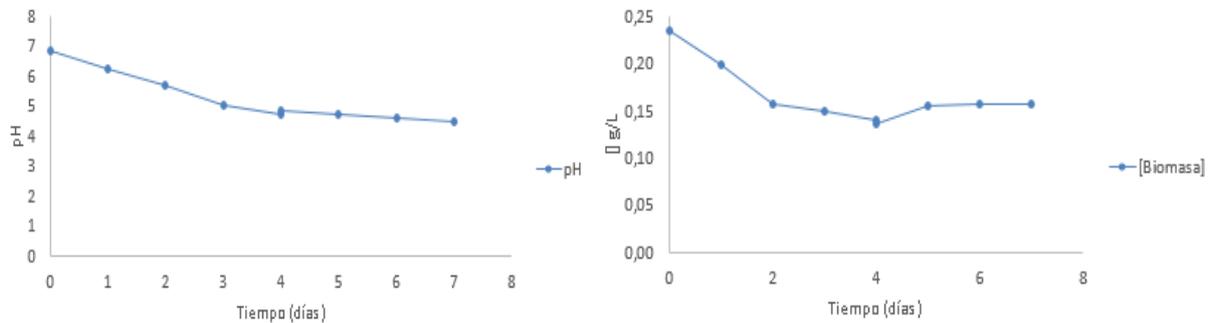


Figura 19: Evolución del pH y de la concentración de biomasa durante Ensayo 1 R1

Por último, las concentraciones de solutos compatibles (ectoína e hidroxiectoína) acumuladas en las bacterias sufrieron una disminución progresiva hasta su completa desaparición debido al descenso significativo del pH, que impidió el crecimiento celular y provocó la lisis celular, excretando ectoína e hidroxiectoína al medio y disminuyendo su concentración intracelular (Figura 20).

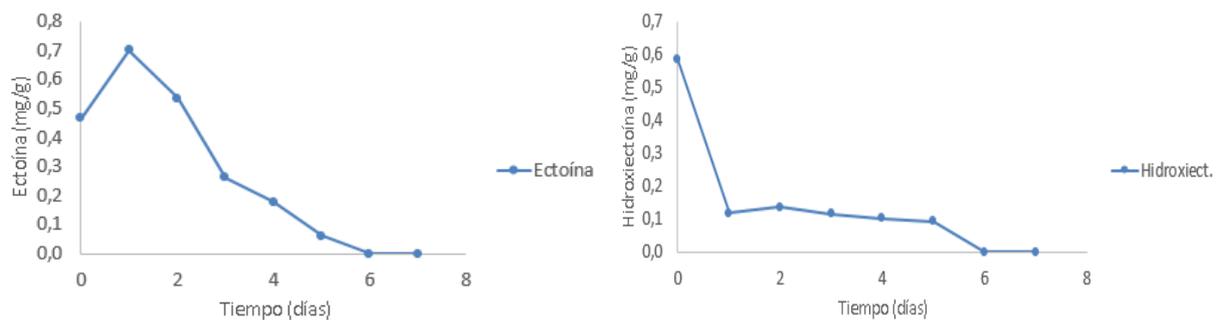


Figura 20: Evolución de la concentración de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) durante Ensayo 1 R1

El resto de parámetros (temperatura, caída de presión y caudal de salida) se mantuvieron prácticamente constantes en  $23 \pm 0,6$  °C, 10 mbar y  $43 \pm 0,7$  mL/min respectivamente durante todo el ensayo.

Tras observar dichos resultados se procedió a retirar el ensayo y comenzar un nuevo ensayo en el cual se empleó un inóculo de *Rhodococcus opacus* con una concentración inicial de biomasa de 0,7 g/L, superior al ensayo anterior (0,3 g/L). Una vez inoculado el reactor se operó el sistema durante 2 días debido a que se observaron los mismos problemas que en el ensayo anterior. Se observó una eficacia máxima de eliminación del 8% el último día de ensayo; sin embargo, el pH se redujo desde 7,02 hasta 5,82, además de una reducción en la concentración de biomasa desde 0,283 hasta 0,171 g/L. También se observó un descenso de la concentración de hidroxiectoína, por lo que se decidió detener el reactor y buscar nuevas estrategias de operación (Figura 21).

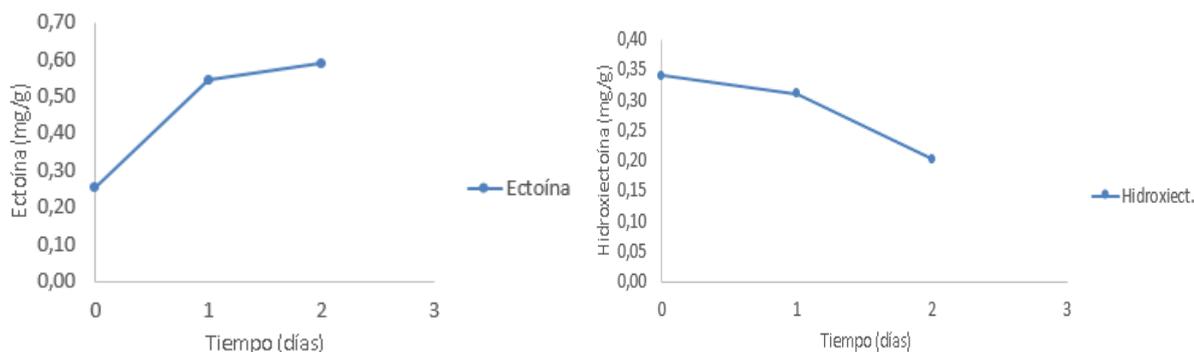


Figura 21: Evolución de la concentración de ectoína e hidroxiectoína (mg/g) durante el Ensayo 1 R2

Tras observar que el pH disminuyó de forma significativa en los dos intentos anteriores se propuso añadir una solución amortiguadora de pH (buffer) la cual permite mantener el pH del medio de cultivo estable permitiendo el crecimiento del inóculo durante la operación del sistema. Una vez preparado el medio con la solución buffer se realizó un nuevo ensayo empleando inóculo de *Rhodococcus opacus* aclimatado previamente en tolueno en medio AMS 3%NaCl. Este ensayo se llevó a cabo durante 14 días. A continuación se muestran los resultados obtenidos en dicho ensayo con *R.opacus*:

#### A) Evolución temporal de la concentración de tolueno en la fase gas

Al inicio del ensayo experimental la diferencia de la concentración de tolueno en la entrada y en la salida fue muy similar a la obtenida durante el ensayo abiótico sin observar una degradación significativa del tolueno (Figura 22). Sin embargo, a partir del día 3 se observa que la concentración de tolueno a la salida del reactor empieza a disminuir hasta alcanzar una concentración mínima de 3,05 g/m<sup>3</sup> de tolueno el día 4, debido a la aclimatación y consumo de tolueno por parte del inóculo. A partir de este día, la concentración de tolueno en la salida alcanza el estado estacionario en  $3,32 \pm 0,17$  g/m<sup>3</sup>, hasta el día 12 donde la concentración de tolueno comenzó a aumentar en la salida hasta 4 g/m<sup>3</sup> debido posiblemente a una limitación por nutrientes en el cultivo, ya que solo se intercambiaban diariamente 10 mL de medio mineral fresco. La concentración de tolueno en la entrada se mantuvo prácticamente constante durante el estudio en  $6,57 \pm 0,48$  g/m<sup>3</sup>.

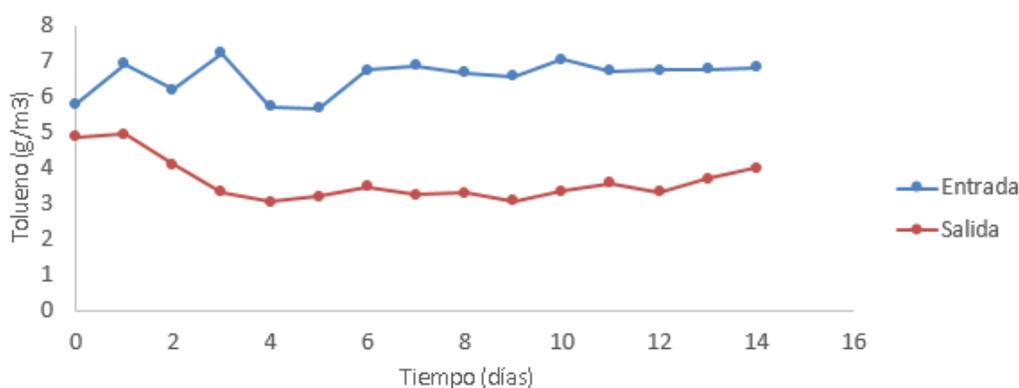


Figura 22: Evolución de la concentración de tolueno durante el periodo experimental a la entrada (azul) y salida (rojo) del reactor del Ensayo 1 R3

Para analizar el rendimiento del reactor, se determinaron la eficacia de eliminación (RE) y la capacidad de eliminación (EC).

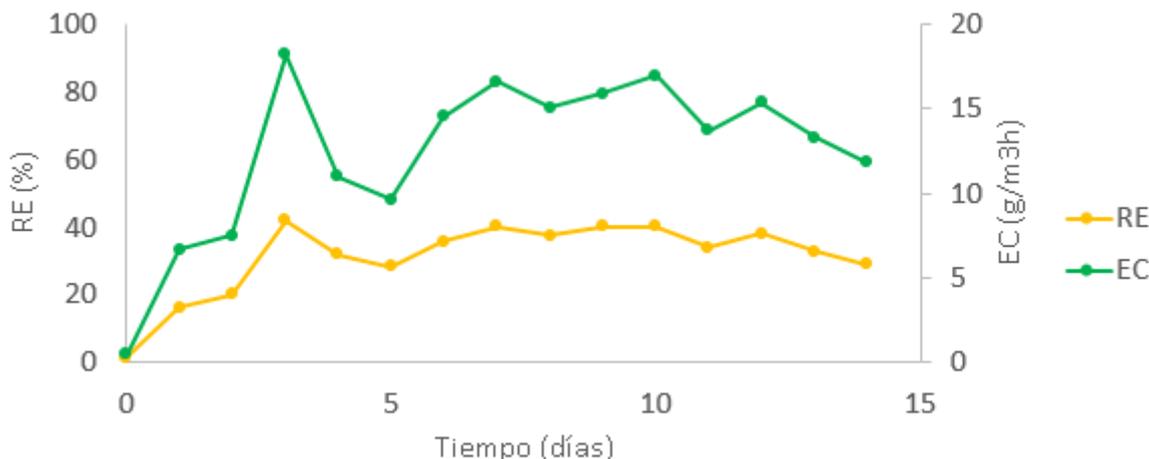


Figura 23: Evolución de la RE (amarillo) y EC (verde) del tolueno en el reactor durante el periodo experimental del Ensayo 1 R3

En cuanto a la eficacia de eliminación se observa un crecimiento de la eficacia durante los primeros días de ensayo, alcanzando una eficacia máxima de eliminación del 42,0% el día 3 debido al estado de las bacterias en fase exponencial de degradación (Figura 23). Posteriormente la eficacia de eliminación se mantiene prácticamente constante durante la mayor parte del ensayo en aproximadamente  $36,1 \pm 4,4\%$  hasta el día 12, donde empieza a reducirse hasta el 28,8% el día 14 debido posiblemente a la limitación de nutrientes en el cultivo. En cuanto a la capacidad de eliminación, se observa la misma evolución que en la RE, con una capacidad máxima de eliminación de tolueno de  $18,21 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  el día 3, un valor prácticamente estable hasta el día 12 de  $14,2 \pm 2,6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , reduciéndose posteriormente hasta  $11,80 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  el día 14.

En estudios previos han comprobado la capacidad de diferentes cepas de *Rhodococcus*, como *Rhodococcus opacus* DSM 43205 (Rodríguez, 2022) y *Rhodococcus erythropolis* (Malhautier et al., 2014) de eliminar tolueno en continuo a concentraciones de 4 y  $5 \text{ g/m}^3$  respectivamente con eficacias del 100%.

Durante la operación también se evaluó la producción de  $\text{CO}_2$  en la salida del reactor. Desde el inicio del ensayo hasta el día 3 se observa una producción significativa de  $\text{CO}_2$  con una concentración máxima en dicho periodo de  $1,98 \text{ g/m}^3$  debido a la fase exponencial de degradación (Figura 24). A partir del día 3, la concentración de  $\text{CO}_2$  en la salida sigue aumentando aunque de forma menos pronunciada, estabilizándose a partir del día 6 en una concentración promedio de  $2,02 \pm 0,1 \text{ g/m}^3$ . Si se evalúa la producción de  $\text{CO}_2$  en el tiempo (Figura 25) se observa la misma tendencia que la evolución de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la salida, con un aumento significativo hasta el día 3 ( $11,9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  el día 3), estabilizándose el día 6 con una producción promedio de  $12,1 \pm 0,6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . El  $\text{CO}_2$  producido se origina como producto durante los procesos metabólicos del microorganismo, el cual a partir de una fuente de carbono y en condiciones aerobias, generan productos ligados al metabolismo como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y biomasa nueva (Castañeda et al., 2019). En este caso el consumo inicial de tolueno por parte del microorganismo genera  $\text{CO}_2$  de forma significativa, hasta que se estabiliza su producción debido a que se estabiliza la eliminación de tolueno.

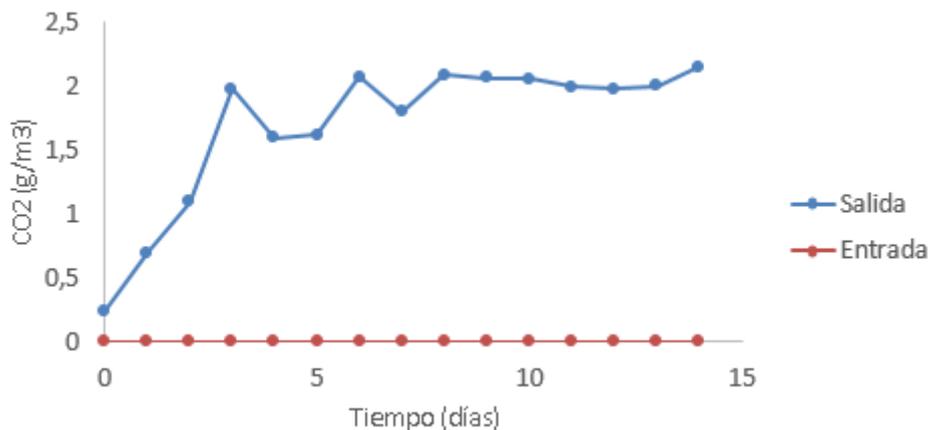


Figura 24: Evolución de la concentración de CO<sub>2</sub> durante el periodo experimental a la entrada (rojo) y a la salida (azul)

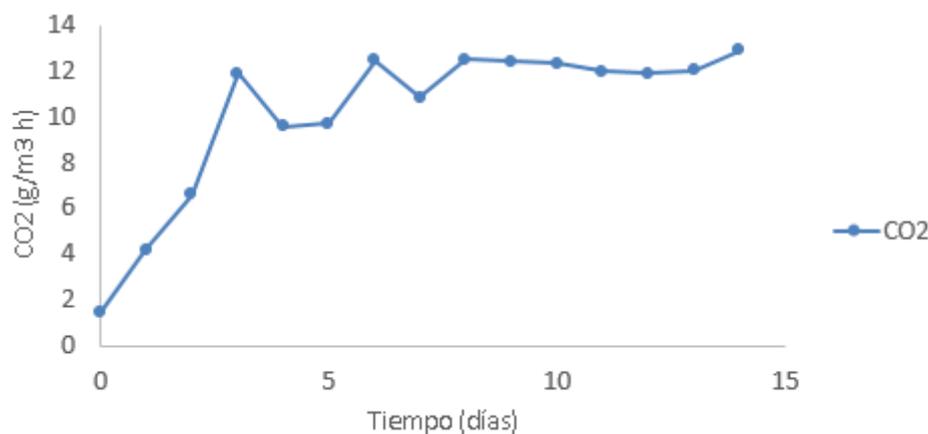


Figura 25: Producción de CO<sub>2</sub> (g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) durante el estudio experimental

## B) Análisis fase líquida

### - pH y OD

El pH del medio de cultivo experimenta un ligero descenso a lo largo del estudio desde un pH 7 el día 1 hasta 6,87 el día 14, posiblemente debido a la producción de metabolitos ácidos (Figura 26). Sin embargo son valores muy cercanos a pH neutro, manteniéndose por encima de los valores límite de crecimiento (>6,8), indicando que la solución buffer empleada ha permitido estabilizar el pH del sistema y por lo tanto realizar el estudio favorablemente.

En cuanto al crecimiento de la biomasa analizado por densidad óptica se observa cómo la biomasa se mantiene inicialmente constante con una concentración de 0,18 g/L debido a la fase de latencia hasta el día 3 de ensayo, donde empieza a aumentar hasta una concentración final de 3,44 g/L, demostrando el crecimiento del inóculo empleando tolueno como única fuente de carbono. Cabe destacar en este caso que dichos valores de concentración pueden no ser exactos, debido a posibles interferencias durante la medición por metabolitos intermedios que provoquen un aumento de la OD. El análisis por densidad

óptica del medio de cultivo puede conllevar un error significativo a causa del crecimiento agregado de la biomasa. Dicho crecimiento también se observó a partir del análisis de los sólidos suspendidos volátiles (SST), medidos al inicio y al final del estudio, obteniendo una concentración inicial de 1,14 g/L y una concentración final de 3,89 g/L. Este aumento de la concentración de sólidos confirma el crecimiento de la biomasa durante el estudio y la eficacia del sistema, sin embargo, se trata de una concentración muy elevada para la densidad óptica que se presenta, lo que puede indicar una interferencia con otros compuestos como las sales del medio mineral.

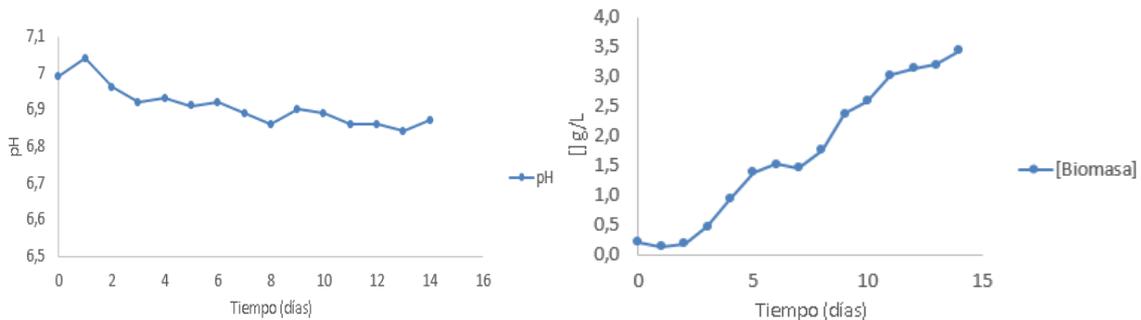


Figura 26: Evolución del pH (izqda.) y de la concentración de biomasa (dcha.) durante el Ensayo 1 R3

- Evolución en la producción de sustancias de alto valor

Las concentraciones de solutos compatibles (ectoína e hidroxiectoína) producidas por las bacterias mostraron una ligera disminución los primeros días de ensayo debido a la falta de aclimatación del inóculo al sistema (Figura 27). Sin embargo, a partir del día 3 se observa un incremento significativo en la producción de ambas sustancias, debido a su fase exponencial de degradación de tolueno, con unas concentraciones máximas de ectoína de 9,4 mg/L el día 10 de ensayo y de hidroxiectoína de 3,8 mg/L el día 14 de ensayo.

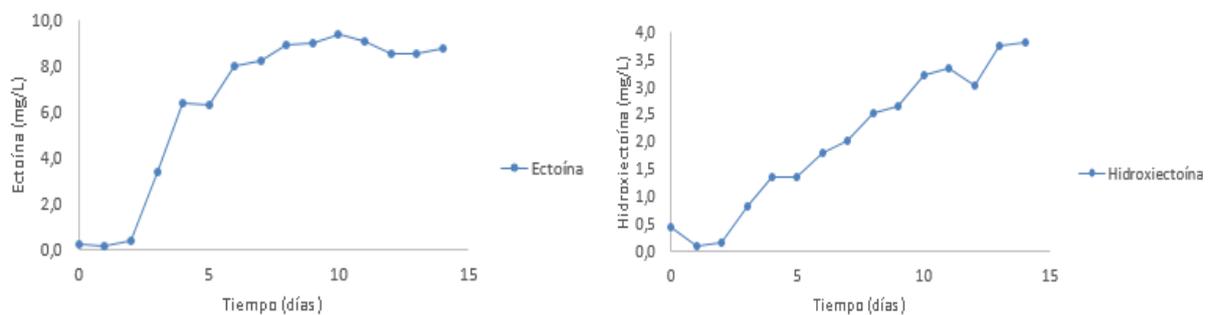


Figura 27: Evolución de las concentraciones de ectoína (izqda.) e hidroxiectoína (dcha.) durante el estudio experimental del Ensayo 1 R3

El resto de parámetros de operación (temperatura, caída de presión y caudal de salida) se mantuvieron en un promedio de  $24,1 \pm 0,4$  °C, 10 mbar y  $42 \pm 0,5$  mL/min respectivamente durante todo el estudio experimental.

- **Ensayo 2: *Halomonas stevensii* (AMS 6% NaCl)**

Una vez finalizado el ensayo descrito anteriormente con *R. opacus* se procedió a iniciar un nuevo ensayo empleando como inóculo *H. stevensii* aclimatado previamente en tolueno en medio AMS 6%NaCl. Este ensayo se llevó a cabo durante 14 días. A continuación se muestran los resultados obtenidos en dicho ensayo con *H. stevensii*:

**A) Evolución temporal de la concentración de tolueno en la fase gas**

Previamente a la inoculación del reactor se realizó un nuevo ensayo abiótico durante un día para asegurar una eliminación de tolueno de forma biológica posteriormente en el ensayo. En este caso se puede observar una diferencia entre la concentración de tolueno en la entrada ( $6,85 \pm 0,11 \text{ g/m}^3$ ) y en la salida ( $5,32 \pm 0,1 \text{ g/m}^3$ ) del reactor, siendo una diferencia tomada en cuenta a la hora de evaluar el rendimiento de eliminación biológica del contaminante.

Durante el estudio experimental se observó que las concentraciones de tolueno a la entrada y a la salida del reactor se mantuvieron estables durante los primeros diez días de ensayo, con una concentración a la entrada de  $7,01 \pm 0,25 \text{ g/m}^3$  y una concentración a la salida de  $5,5 \pm 0,27 \text{ g/m}^3$ , siendo una diferencia muy similar a la obtenida durante el ensayo abiótico, y por lo tanto, concluyendo que prácticamente no se produjo eliminación biológica de tolueno por parte de *H. stevensii* (Figura 28). Este hecho puede deberse a que la carga de contaminante es demasiado alta e inhibitoria para el inóculo y no es capaz de degradarlo. Estudios previos (Malhautier et al., 2014) han evaluado las concentraciones de tolueno máximas en especies como *Rhodococcus erythropolis*, determinando valores tóxicos a partir de los  $6 \text{ g/m}^3$ . Debido a la no observación de biodegradación en el reactor, durante el ensayo se realizaron dos reinoculaciones del mismo, la primera el día 4 y la segunda el día 10 de ensayo, en las cuales se introdujo biomasa de *H.stevensii* de los ensayos de aclimatación en batch al 6% NaCl resuspendida en medio mineral AMS fresco, sin observar ninguna evolución favorable. El día 12 de ensayo se produjo un descenso de la concentración de tolueno en la entrada y en la salida del reactor debido a un error en la inyección de contaminante por parte de la bomba de jeringa.

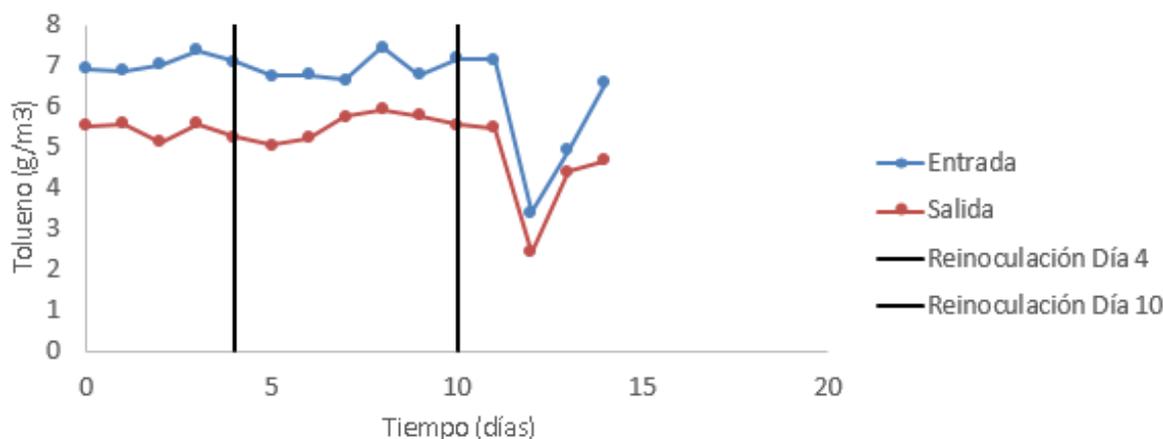


Figura 28: Evolución de la concentración de tolueno durante el periodo experimental a la entrada (azul) y salida (rojo) del reactor *H.stevensii*

Tanto la eficacia como la capacidad de eliminación de tolueno por parte del sistema fueron muy bajas, alcanzando eficacias promedio de  $1,73 \pm 2,16\%$  y obteniendo una eficacia máxima de eliminación del  $5,93\%$ , mientras que la capacidad de eliminación máxima fue de  $2,34 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  el día 14 de ensayo (Figura 29). Estos valores indican que la biodegradación de tolueno fue prácticamente nula.

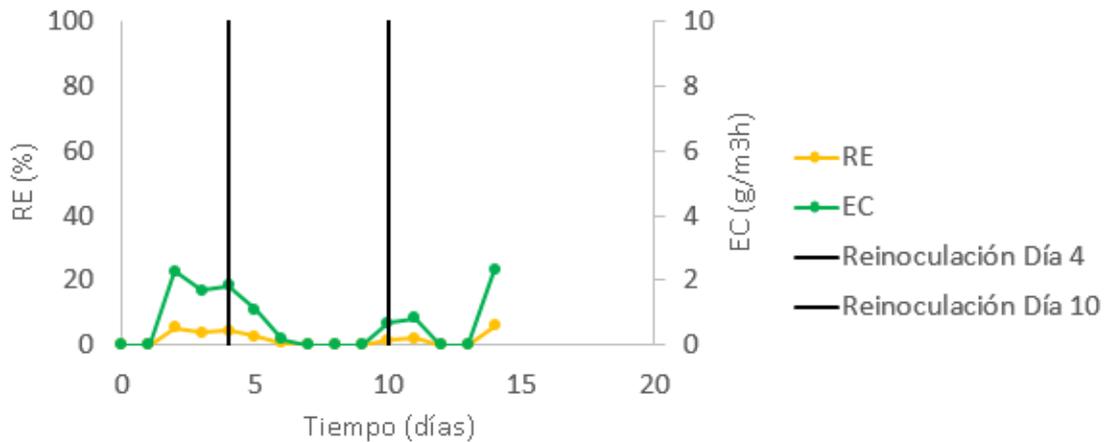


Figura 29: Evolución de la RE (amarillo) y EC (verde) del tolueno en el reactor durante el periodo experimental del Ensayo 2

También se monitorizó la producción de  $\text{CO}_2$  durante el estudio experimental, observando un ligero incremento de la concentración de  $\text{CO}_2$  desde el inicio del ensayo, con una concentración inicial en la salida del reactor de  $0,29 \text{ g/m}^3$ , hasta una concentración final de  $\text{CO}_2$  el día 14 de  $0,62 \text{ g/m}^3$ , manteniéndose la concentración en la entrada prácticamente nula (Figura 30). Este ligero incremento puede ser debido a que el inóculo degrade una pequeña parte de tolueno que entra al sistema.

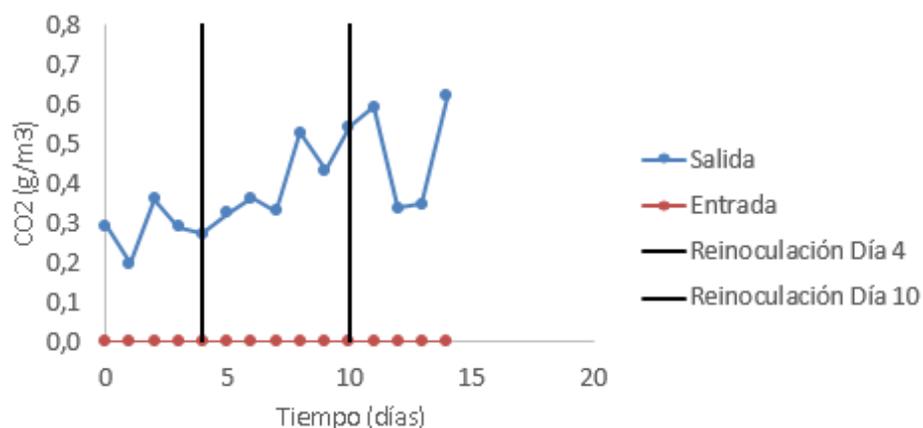


Figura 30: Evolución de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la entrada (rojo) y salida (azul) durante el ensayo 2

De forma similar, la producción de  $\text{CO}_2$  con el tiempo aumenta ligeramente durante los 14 días de ensayo, desde una producción inicial de  $1,77 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  hasta una producción final de  $3,72 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Figura 31). Las reinoculaciones realizadas durante el ensayo no permiten observar una mejora significativa en la producción de  $\text{CO}_2$ .

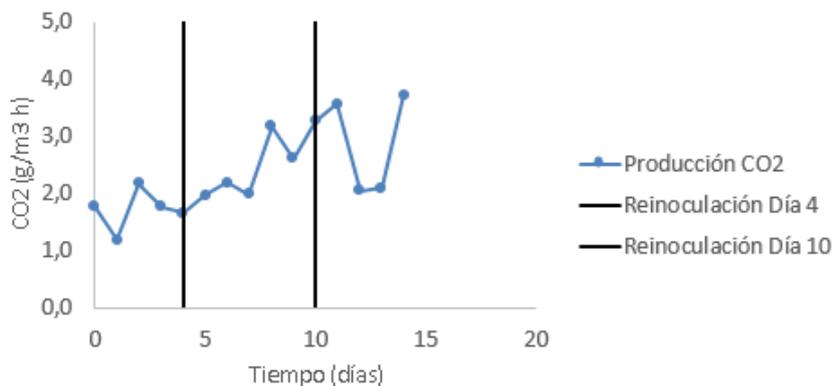


Figura 31: Producción de CO<sub>2</sub> durante el segundo ensayo en continuo

## B) Análisis fase líquida

### - pH y OD

El pH del medio de cultivo se mantuvo prácticamente constante durante todo el ensayo en  $6,92 \pm 0,02$  gracias al empleo de la solución amortiguadora. Este pH es muy cercano al pH neutro dentro del rango de pH de cultivo (pH 7-11), sin embargo no se encuentra entre las condiciones óptimas de cultivo (pH 8-9) (Kim et al., 2010), por lo que el rendimiento del sistema ha podido verse afectado.

En cuanto al crecimiento del inóculo analizado por densidad óptica se aprecia que la concentración de biomasa se reduce desde el día 1 hasta el día 4 desde 0,19 g/L hasta 0,1 g/L debido a la elevada carga de contaminante en continuo alimentada y su no aclimatación en el medio. Tras la reinoculación el día 4 de ensayo la concentración aumentó hasta 0,12 g/L, observando posteriormente un descenso progresivo hasta el día 10 de 0,09 g/L. La última reinoculación realizada el día 10 supuso un incremento en la concentración de biomasa hasta 0,2 g/L, observando posteriormente la misma tendencia que en el resto de etapas y reduciéndose hasta 0,12 g/L el día 14 (Figura 32). Esta disminución de la concentración de biomasa indica que el inóculo no ha sido capaz de aclimatarse completamente al tolueno y por lo tanto se ha producido la muerte celular. Además se realizó un análisis de los sólidos suspendido totales al inicio y al final del ensayo obteniendo una concentración inicial y final de 1,92 y 2 g/L respectivamente, observando un ligero crecimiento posiblemente debida a la acumulación de materia celular muerta.

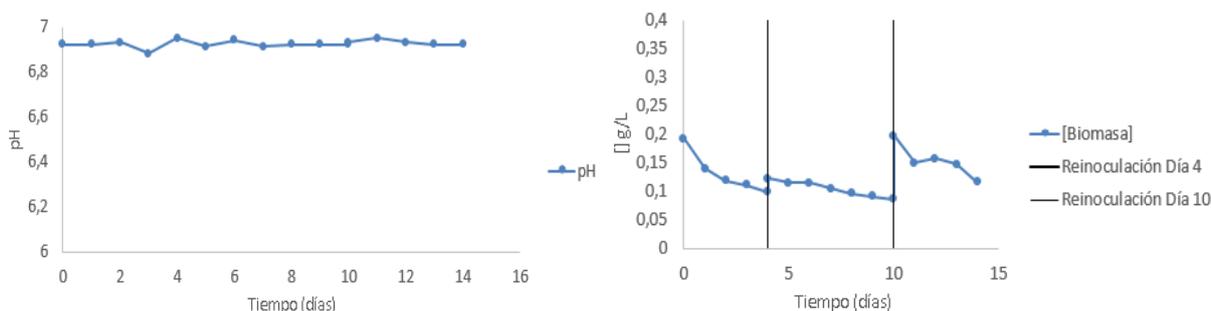


Figura 32: Evolución del pH (izqda.) y de la concentración de biomasa (dcha.) durante el segundo ensayo en continuo

- Evolución en la producción de sustancias de alto valor

La producción de ectoína e hidroxiectoína se analizó durante los primeros cuatro días de ensayo, en los cuales se puede observar un incremento en la concentración de ectoína desde 0,9 mg/L hasta 2,1 mg/L el día 1, que después va disminuyendo hasta 1,52 mg/L el día 4 de ensayo debido a la no aclimatación del inóculo. Las concentraciones de hidroxiectoína se mantienen prácticamente constantes durante los primeros cuatro días en 1,7 mg/L (Figura 33).

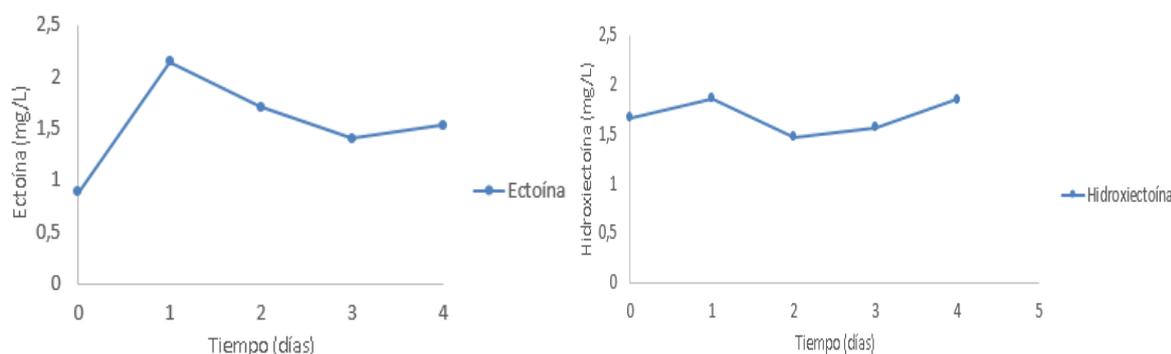


Figura 33: Evolución de las concentraciones de ectoína (izqda.) e hidroxiectoína (dcha.) durante el segundo ensayo en continuo

Por último, el resto de parámetros de operación (temperatura, caída de presión y caudal de salida) se mantuvieron en un promedio de  $23,8 \pm 0,4$  °C, 10 mbar y  $42,1 \pm 0,3$  mL/min respectivamente durante todo el estudio experimental.

Los resultados obtenidos en este último ensayo no han permitido demostrar claramente la capacidad de degradación de tolueno por parte de *H.stevensii* y su bioconversión en ectoína e hidroxiectoína en continuo. Esto puede ser debido a la elevada carga de contaminante introducida en el reactor, que haya llegado a ser tóxico para las bacterias, inhibiendo su crecimiento. Otro motivo a tener en cuenta pueden ser las condiciones de cultivo, ya que durante el ensayo los valores de temperatura y pH se encontraban dentro del rango apto para el cultivo del inóculo, sin embargo no eran las condiciones óptimas para su crecimiento (Apartado 1.5). En estudios previos se cultivó *H.stevensii* en modo semicontinuo en un biorreactor empleando compuestos contaminantes como CO<sub>2</sub> (15% v/v) como fuente de carbono y tiosulfato como fuente de energía logrando eliminaciones del 100% de la fase gaseosa (Mishra et al., 2018). Por ello, en un futuro estudio podría realizarse el mismo ensayo optimizando las condiciones de cultivo y alimentando el reactor con una menor carga de contaminante para observar la evolución del sistema.

## 5. CONCLUSIONES

Este estudio ha permitido evaluar la capacidad de biodegradación de compuestos orgánicos volátiles, concretamente el tolueno, y su biotransformación en compuestos de alto valor farmacéutico y médico (ectoína e hidroxiectoína) empleando *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus* a diferentes concentraciones salinas. A partir de los ensayos en batch y en continuo se pueden extraer las siguientes conclusiones.

- Los ensayos realizados en batch permitieron observar una eficacia de biodegradación del tolueno ( $4 \text{ g/m}^3$ ) del 100% por parte de *Halomonas stevensii* y *Rhodococcus opacus* a las diferentes concentraciones salinas estudiadas.
- Tras el quinto ciclo de consumo de tolueno en los ensayos batch se obtuvieron concentraciones de ectoína e hidroxiectoína para *H. stevensii* de  $0,72 \pm 0,1 \text{ mg/g}$  (3% NaCl),  $0,4 \pm 0,13 \text{ mg/g}$  (5% NaCl) y  $0,64 \pm 0,03 \text{ mg/g}$  (6% NaCl) de ectoína, y de  $0 \text{ mg/g}$  (3% NaCl),  $0,81 \pm 0,03 \text{ mg/g}$  (5% NaCl) y  $0,46 \pm 0,4 \text{ mg/g}$  (6% NaCl) de hidroxiectoína. La variación de la salinidad influyó en las concentraciones de ectoína e hidroxiectoína, observando un aumento en la concentración de osmolitos al incrementar la concentración de NaCl.
- Las concentraciones de ectoína e hidroxiectoína obtenidas en los ensayos batch para *Rhodococcus opacus* se vieron influenciadas por la variación de la salinidad, obteniendo concentraciones superiores de los osmolitos a mayor salinidad. Tras el quinto ciclo de consumo se obtuvieron concentraciones de ectoína e hidroxiectoína de  $0,12 \pm 0,03$  (3% NaCl),  $0,25 \pm 0,05$  (4% NaCl),  $0,27 \pm 0,05$  (5% NaCl) y  $0,92 \pm 0,17 \text{ mg/g}$  (6% NaCl) de ectoína, y  $0,46 \pm 0,2$  (3% NaCl),  $0,27 \pm 0,07$  (4% NaCl),  $2,60 \pm 0,54$  (5% NaCl) y  $1,62 \pm 0,12 \text{ mg/g}$  (6% NaCl) de hidroxiectoína.
- El ensayo en continuo con *Rhodococcus opacus* al 3% de NaCl alcanzó una eficacia de eliminación (RE) del 42%, operando a un tiempo de residencia de 10 min, obteniendo unas concentraciones máximas de ectoína e hidroxiectoína de 9,4 mg/L y 2,8 mg/L respectivamente.
- El ensayo en continuo con *H.stevensii* al 6% de NaCl alcanzó una eficacia de eliminación (RE) del 5,9%, por lo que será necesario optimizar las condiciones de operación (en cuanto a la concentración de tolueno suministrada) y las condiciones de cultivo (pH y T) para alcanzar mejores rendimientos de eliminación en los ensayos en continuo.
- Las concentraciones de ectoína e hidroxiectoína obtenidas durante los ensayos experimentales no fueron muy significativas en comparación a otros estudios; sin embargo, se pudo demostrar la posibilidad de bioconversión de compuestos orgánicos volátiles en sustancias de alto valor farmacéutico y médico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- *Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.* | EPA de EE. UU. (2023). Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://www.epa.gov/>
- *Base de datos de emisiones para la investigación atmosférica global (EDGAR)* — Agencia Europea de Medio Ambiente. (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/external/emissions-database-for-global-atmospheric>
- Becker, J., & Wittmann, C. (2020). Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Current Opinion in Biotechnology*, 65, 118–128. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.02.010>
- Braga, A., Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., & Belo, I. (2015). Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 55–62. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2014.09.006>
- Cantera, S., Frutos, O. D., López, J. C., Lebrero, R., & Torre, R. M. (2017a). Technologies for the bio-conversion of GHGs into high added value products: Current state and future prospects. *Green Energy and Technology*, 0(9783319549835), 359–388. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54984-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54984-2_17)
- Cantera, S., Lebrero, R., Rodríguez, S., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2017b). Ectoine bio-milking in methanotrophs: A step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chemical Engineering Journal*, 328, 44–48. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.07.027>
- Cantera, S., López, M., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2022a). Comparative evaluation of bacterial and fungal removal of indoor and industrial polluted air using suspended and packed bed bioreactors. *Chemosphere*, 308, 136412. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.136412>
- Cantera, S., Muñoz, R., Lebrero, R., López, J. C., Rodríguez, Y., & García-Encina, P. A. (2018). Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 128–135. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.12.021>
- Cantera, S., Phandanouvong-Lozano, V., Pascual, C., García-Encina, P. A., Lebrero, R., Hay, A., & Muñoz, R. (2020). A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylobacterium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium. *Waste Management*, 102, 773–781. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.11.043>
- Cantera, S., Sousa, D. Z., & Sánchez-Andrea, I. (2022b). Enhanced ectoines production by carbon dioxide capture: A step further towards circular economy. *Journal of CO2 Utilization*, 61, 102009. <https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2022.102009>
- Cantera, S., Tamarit, D., Strong, P. J., Sánchez-Andrea, I., Ettema, T. J. G., & Sousa, D. Z. (2022c). Prospective CO<sub>2</sub> and CO bioconversion into ectoines using novel microbial

- platforms. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 21(3), 571–581. <https://doi.org/10.1007/S11157-022-09627-Y>
- Carvajal, A., Akmirza, I., Navia, D., Pérez, R., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2018). Anoxic denitrification of BTEX: Biodegradation kinetics and pollutant interactions. *Journal of Environmental Management*, 214, 125–136. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.02.023>
  - Chaudhary, D. K., Park, J. H., Kim, P. G., Ok, Y. S., & Hong, Y. (2023). Enrichment cultivation of VOC-degrading bacteria using diffusion bioreactor and development of bacterial-immobilized biochar for VOC bioremediation. *Environmental Pollution*, 320, 121089. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121089>
  - Chesnaux, R. (2008) *Analytical closed-form solutions for assessing pumping cycles, times and costs required for NAPL remediation*
  - *Cómo afectan los COV a la calidad del aire, la salud y el medio ambiente - Parte 1.* (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://www.crowcon.com/es/blog/how-vocs-affect-air-quality-health-and-the-environment/>
  - *Compuesto Orgánico Volátil: Significado De Cov.* (2020). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://www.brofind.es/compuestos-organicos-volatiles>
  - *Contaminación atmosférica.* (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de [https://www.who.int/es/health-topics/air-pollution#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/air-pollution#tab=tab_1)
  - *De compuestos orgánicos volátiles.* (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/act-emis/compuestos\\_organicos\\_volatiles.aspx](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/act-emis/compuestos_organicos_volatiles.aspx)
  - Diao, J., Carr, R., & Moon, T. S. (2022). Deciphering the transcriptional regulation of the catabolism of lignin-derived aromatics in *Rhodococcus opacus* PD630. *Communications Biology* 2022 5:1, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04069-2>
  - *DIRECTIVA 2004/42/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO.* <https://www.boe.es/doue/2004/143/L00087-00096.pdf>
  - *Directive 2008/50/EC, air quality — European Environment Agency.* (2023). Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://www.eea.europa.eu/policy-documents/directive-2008-50-ec-of>
  - *El impacto de los compuestos orgánicos volátiles en la calidad del aire interior | US EPA.* (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://espanol.epa.gov/cai/el-impacto-de-los-compuestos-organicos-volatiles-en-la-calidad-del-aire-interior>
  - González-Martín, J., Kraakman, N. J. R., Pérez, C., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2021). A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere*, 262, 128376. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128376>

- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2008.10.005>
- *Industria farmacéutica: ingresos mundiales 2001-2021* | Statista. (2021). Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://es.statista.com/estadisticas/635153/ingresos-mundiales-del-sector-farmaceutico/>
- Janßen, H. J., Ibrahim, M. H. A., Bröker, D., & Steinbüchel, A. (2013). Optimization of macroelement concentrations, pH and osmolarity for triacylglycerol accumulation in *Rhodococcus opacus* strain PD630. *AMB Express*, 3. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-38>
- Kim, D., Kim, Y. S., Kim, S. K., Kim, S. W., Zylstra, G. J., Kim, Y. M., & Kim, E. (2002). Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3270. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3270-3278.2002>
- Kim, K. K., Lee, K. C., Oh, H. M., & Lee, J. S. (2010). *Halomonas stevensii* sp. nov., *halomonas hamiltonii* sp. nov. and *halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 369–377. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.004424-0>
- Kumar, A. (2019) Biofiltration: A method for Volatile organic compounds(VOCs) removal-A review. (2019). [www.ijedr.org](http://www.ijedr.org)
- *La contaminación del aire*. European Environment Agency (2023). Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://www.eea.europa.eu/en/topics/in-depth/air-pollution>
- Lamprea Pineda, P. A., Demeestere, K., Toledo, M., Van Langenhove, H., & Walgraeve, C. (2021). Enhanced removal of hydrophobic volatile organic compounds in biofilters and biotrickling filters: A review on the use of surfactants and the addition of hydrophilic compounds. *Chemosphere*, 279, 130757. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130757>
- Lang, Y. jun, Bai, L., Ren, Y. nan, Zhang, L. hua, & Nagata, S. (2011). Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928T. *Extremophiles*, 15(2), 303–310. <https://doi.org/10.1007/S00792-011-0360-9>
- Lee, Y., Lee, Y., & Jeon, C. O. (2019). Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36165-x>
- Li, J., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2017). Multivariate optimization for the simultaneous bioremoval of BTEX and chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas plecoglossicida*. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 238–246. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.09.020>

- Lucía G. Pruneda-Alvarez, Tania Ruiz-Vera, Iván N. Pérez-Maldonado. *Exposición no ocupacional a tolueno en diferentes escenarios de México* (2015). Recuperado el 4 de julio de 2023, de [https://www.researchgate.net/publication/277659492\\_Exposicion\\_no\\_ocupacional\\_a\\_tolueno\\_en\\_diferentes\\_escenarios\\_de\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/277659492_Exposicion_no_ocupacional_a_tolueno_en_diferentes_escenarios_de_Mexico)
- 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*, 247, 199–204. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.02.099>
- Maliyekkal, S. M., Rene, E. R., Philip, L., & Swaminathan, T. (2004). Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 109(1–3), 201–211. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2004.04.001>
- María, D. I., & Castañeda, T. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. Recuperado el 4 de julio de 2023, de <http://www.latextemplates.com>
- Mishra, S., Pahari, S., Siva, K., Mohanty, S., Gupta, S., & Raghuvanshi, S. (2018). Investigation on CO<sub>2</sub> bio-mitigation using *Halomonas stevensii* in laboratory scale bioreactor: Design of downstream process and its economic feasibility analysis. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 24, 274–286. <https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2018.01.018>
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 508–520. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05353.X>
- Nazari, M. T., Simon, V., Machado, B. S., Crestani, L., Marchezi, G., Concolato, G., Ferrari, V., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2022). *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *Journal of Environmental Management*, 323, 116220. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116220>
- Ng, H. S., Wan, P. K., Ng, T. C., & Lan, J. C. W. (2020). Primary purification of intracellular *Halomonas salina* ectoine using ionic liquids-based aqueous biphasic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2020.04.003>
- Ni, Y. Y., Kim, D. Y., Chung, M. G., Lee, S. H., Park, H. Y., & Rhee, Y. H. (2010). Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technology*, 101(21), 8485–8488. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.033>
- Nikodinovic, J., Kenny, S. T., Babu, R. P., Woods, T., Blau, W. J., & O'Connor, K. E. (2008). The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 665–673. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1593-0>

- Normativa española. (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/normativa/normativa-espanola.aspx>
- Opciones de tecnología para la eliminación de COV. (2022). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://www.genano.com/es/infobase/opciones-de-tecnologia-para-la-eliminacion-de-cov>
- Oren, A. (2010). *Environmental Technology Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms*. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 782–801. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.06.005>
- Pesante, G., & Frison, N. (2023). Recovery of bio-based products from PHA-rich biomass obtained from biowaste: A review. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101345. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2023.101345>
- PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA. (2009). <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/23259/Ana%20yelitzin%20Castro%20Gonz%c3%a1lez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- REGLAMENTO REACH. (2023). Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/>
- Rodríguez, S. (2022). *Optimización del proceso de bioconversión de compuestos orgánicos volátiles en biopolímeros*. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/54446>
- Rother, S. (2022). *Causas y consecuencias de la contaminación ambiental - Significados*. Recuperado el 21 de junio de 2023, de <https://www.significados.com/causas-y-consecuencias-de-la-contaminacion-ambiental/>
- Sauer, T., & Galinski, E. A. (1998). Bacterial Milking: A Novel Bioprocess for Production of Compatible Solutes. *Biotechnol Bioeng*, 57, 306–313. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980205\)57:3<306::AID-BIT7>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980205)57:3<306::AID-BIT7>3.0.CO;2-L)
- Tan, L. A., Nakanishi, E., & Lee, M. (2022). Association between exposure to air pollution and late-life neurodegenerative disorders: An umbrella review. *Environment International*, 158, 106956. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106956>
- Terrasa, D. (2022) *El smog*. Recuperado el 11 de julio de 2023, de <https://geografia.laguia2000.com/climatologia/el-smog>
- *Tipos de Biorreactores | Cultipliy*. (2022). Recuperado el 2 de julio de 2023, de <https://cultipliy.net/tipos-de-biorreactores/>

- Tolueno | PRTR España. (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://prtr-es.es/Tolueno,15660,11,2007.html>
- Tratamiento de COV, emisiones de compuestos orgánicos volátiles | Condorchem Envitech. (2023). Recuperado el 14 de mayo de 2023, de <https://condorchem.com/es/blog/depuracion-de-emisiones-cov/>
- Valladares, M. (2013). *Análisis de las concentraciones de BTEX presentes en la cuenca de Santiago. Comparación entre los años 2002 y 2009.*
- Wolfe-Simon, F., Blum, J. S., Kulp, T. R., Gordon, G. W., Hoefft, S. E., Pett-Ridge, J., Stolz, J. F., Webb, S. M., Weber, P. K., Davies, P. C. W., Anbar, A. D., & Oremland, R. S. (2011). A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*, 332(6034), 1163–1166. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1197258>
- Wu, X., Lin, Y., Wang, Y., Wu, S., & Yang, C. (2023). Volatile organic compound removal via biofiltration: Influences, challenges, and strategies. *Chemical Engineering Journal*, 144420. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.144420>
- Yadira, J., & Riaño, S. (2010). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa*, ISSN-e 1900-9380, Vol. 5, Nº. 2, 2010, Págs. 79-84, 5(2), 79–84. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3702404&info=resumen&idioma=ENG>
- Yoshikawa, M., Zhang, M., & Toyota, K. (2017). Biodegradation of Volatile Organic Compounds and Their Effects on Biodegradability under Co-Existing Conditions. *Microbes and Environments*, 32(3), 188–200. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME16188>
- Yu, B., Yuan, Z., Yu, Z., & Xue-song, F. (2022). BTEX in the environment: An update on sources, fate, distribution, pretreatment, analysis, and removal techniques. *Chemical Engineering Journal*, 435, 134825. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.134825>
- Zeng, A. P. (2019). New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development. *Biotechnology Advances*, 37(4), 508–518. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.01.003>
- Zhang, L. hua, Lang, Y. jun, & Nagata, S. (2009). Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, 13(4), 717–724. <https://doi.org/10.1007/S00792-009-0262-2>

## ANEXOS

### ANEXO I: Recta de calibrado del compuesto a estudio

Durante la experimentación se realizó una recta de calibración correspondiente al compuesto a estudio, el tolueno, en la cual se relaciona el área obtenida en la medición en el cromatógrafo de gases con la concentración del compuesto en la muestra extraída correspondiente. A continuación se muestra la recta de calibrado realizada:

- Tolueno

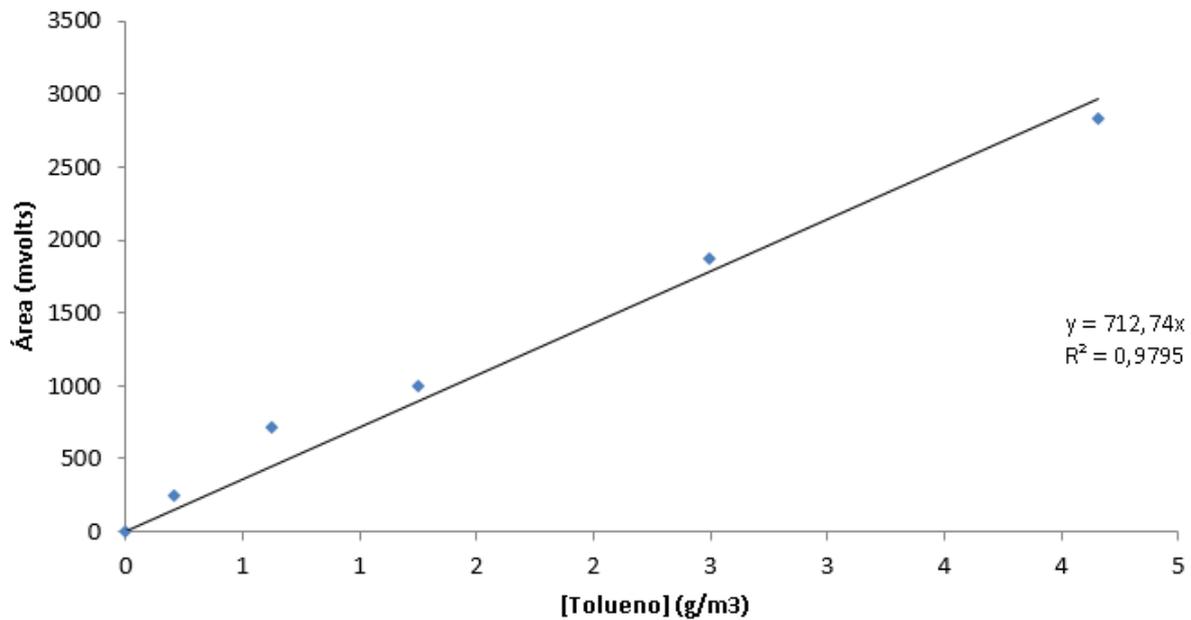


Figura 34: Recta de calibrado del tolueno

## ANEXO II: Rectas de calibrado de la concentración de sólidos

Además se realizaron dos rectas de calibración en las cuales se relacionan las densidades ópticas obtenidas para cada especie bacteriana en la medición de la fase líquida en el espectrofotómetro con la concentración de sólidos suspendidos totales en las muestras correspondientes a cada especie. A continuación se muestran las rectas de calibrado realizadas:

- *H.stevensii*

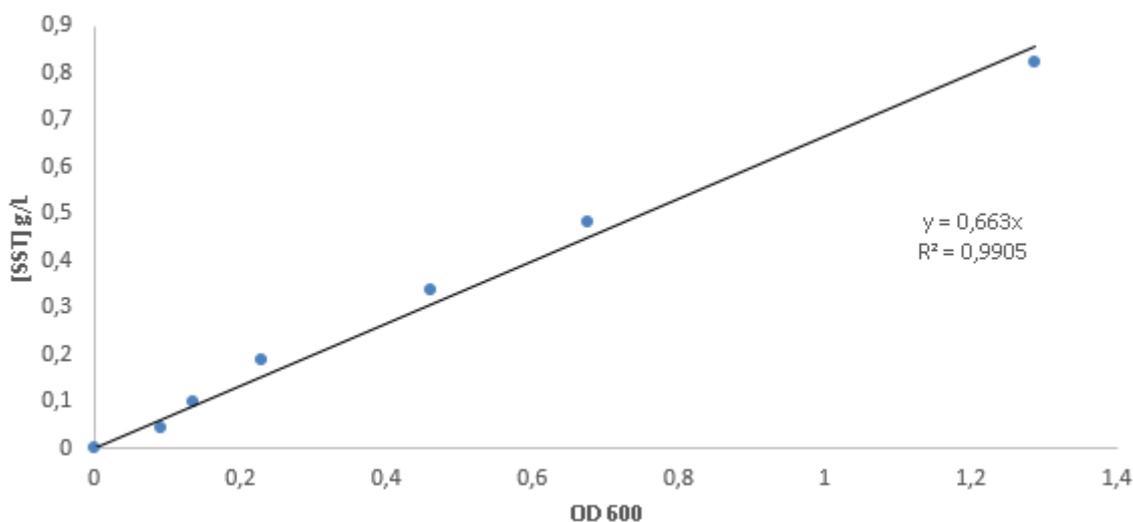


Figura 35: Recta de calibrado de la concentración de sólidos *H.stevensii*

- *R.opacus*

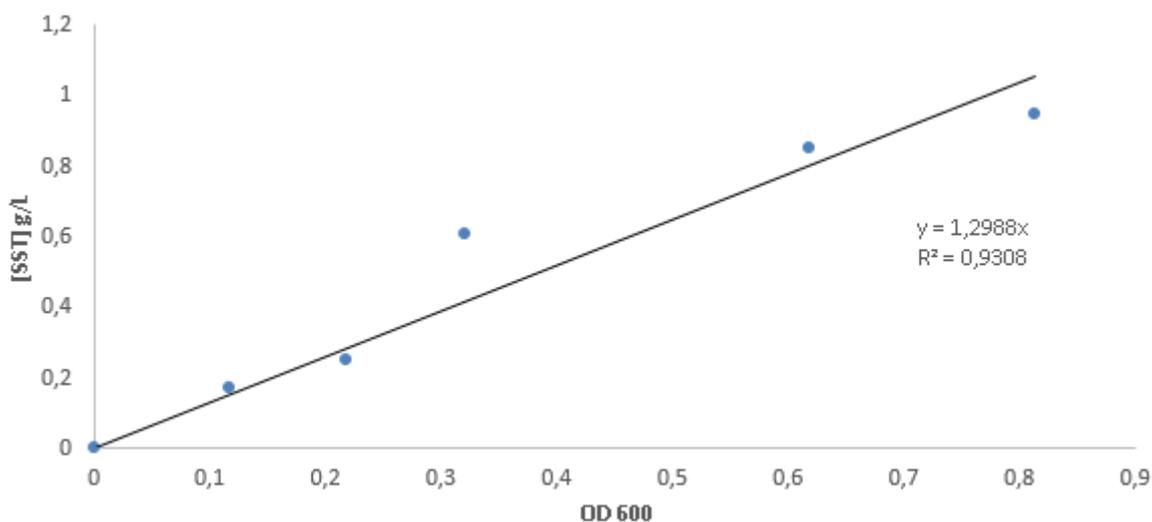


Figura 36: Recta de calibrado de la concentración de sólidos *R.opacus*

### ANEXO III: Rectas de calibrado de la concentración de osmolitos

Por último se realizaron dos rectas de calibración en las cuales se relacionan las áreas obtenidas en la medición en la cromatografía líquida HPLC con la concentración de ectoína e hidroxiectoína en las muestras extraídas correspondientes. A continuación se muestran las rectas de calibrado realizadas:

- **Ectoína**

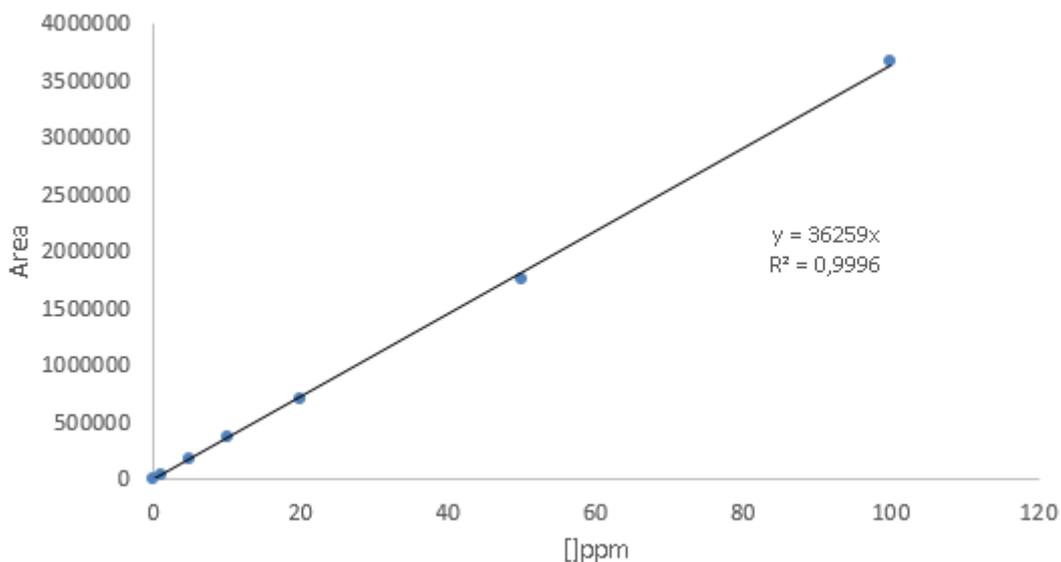


Figura 37: Recta de calibrado de la concentración de ectoína

- **Hidroxiectoína**

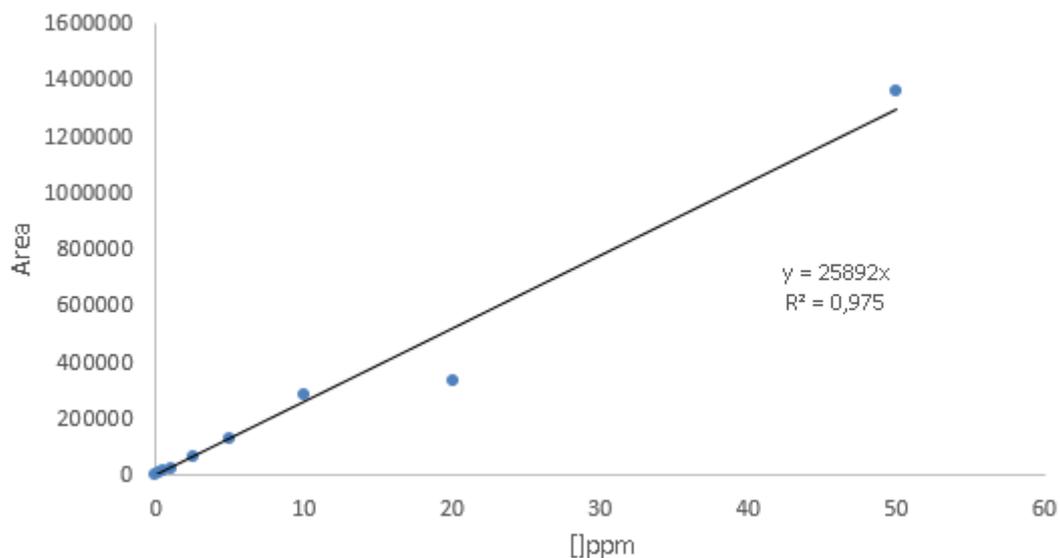


Figura 38: Recta de calibrado de la concentración de hidroxiectoína