



Universidad de Valladolid

VALIDACIÓN DE UN SISTEMA
AIRLIFT EN CONTINUO



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**VALIDACIÓN DE UN SISTEMA EN CONTINUO PARA LA
VALORIZACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES EN PRODUCTOS DE VALOR
AÑADIDO**

Autor: D. Mario Paniagua Martín
Tutor: Dña. Raquel Lebrero Fernández
D. Nicolás Díaz Moreno

Valladolid, Julio, 2025



Universidad de Valladolid

VALIDACIÓN DE UN SISTEMA AIRLIFT EN CONTINUO



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN

La creciente presencia de compuestos orgánicos volátiles (COV) en el ambiente, y en particular de los hidrocarburos aromáticos como el tolueno, representa una problemática en constante aumento debido a su inherente toxicidad y a los efectos perjudiciales que generan tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Ante este desafío, en el presente estudio se llevó a cabo la evaluación de un sistema de biodegradación continua de tolueno, mediante un cultivo de *Cupriavidus necator*, como alternativa biológica y sostenible para la valorización de COV en compuestos de alto valor añadido.

En concreto, se determinó el efecto de la concentración de tolueno sobre la eficiencia de eliminación, la producción de biomasa y la síntesis de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un biopolímero de interés industrial. Para ello, se llevaron a cabo ensayos batch utilizando tolueno como única fuente de carbono en un rango de concentraciones comprendido entre 4 y 54 g m⁻³. Los resultados obtenidos revelaron que, si bien el tolueno fue completamente eliminado en concentraciones inferiores a 21 g m⁻³, éste ejerce un efecto inhibitorio sobre el cultivo celular en concentraciones superiores a 28 g m⁻³, reduciendo, en consecuencia, la eficiencia del proceso.

Además, se estudió el rendimiento de eliminación de tolueno en un biorreactor tipo airlift de alta transferencia de materia, obteniendo una eficiencia de eliminación de 81,96 \pm 0,02%. Estos resultados evidenciaron el potencial de esta tecnología y del cultivo de *C. necator* para la eliminación biológica de tolueno y su valorización simultánea en PHB.

Palabras clave: Biodegradación, biorreactor airlift, compuestos orgánicos volátiles, *Cupriavidus necator*, PHB, tolueno.



ABSTRACT

The increasing presence of volatile organic compounds (VOCs), and in particular of aromatic hydrocarbons such as toluene, in the environment represents a constantly growing problem due to their inherent toxicity and the harmful effects they generate on both human health and the environment. In response to this challenge, the present study aimed to evaluate a continuous biodegradation system for toluene using a *Cupriavidus necator* culture, as a biological and sustainable alternative for the valorization of VOCs into high value-added compounds.

Specifically, the effect of toluene concentration on the removal efficiency, biomass production and synthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB), a biopolymer of industrial interest, was determined. For this purpose, batch tests were carried out using toluene as the sole carbon source in a range of concentrations between 4 and 54 g m⁻³. The results obtained revealed that, although toluene was completely eliminated at concentrations below 21 g m⁻³, it exerted an inhibitory effect on the cell culture at concentrations above 28 g m⁻³, thus reducing the efficiency of the process.

Moreover, toluene removal performance was studied in a high mass transfer airlift bioreactor, obtaining a removal efficiency of 81.96 \pm 0.02%. These results evidenced the potential of this technology and *C. necator* culture for the biological elimination of toluene and its simultaneous valorization into PHB.

Keywords: Airlift bioreactor, biodegradation, *Cupriavidus necator*, PHB, toluene, volatile organic compounds.



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Compuestos orgánicos volátiles (COV)	1
1.1.1	Tolueno.....	2
1.2	Tecnologías de eliminación de tolueno	3
1.2.1	Tecnologías fisicoquímicas	3
1.2.2	Tecnologías biológicas.	3
1.3	Biorreactor airlift.....	4
1.4	Polihidroxialcanoatos (PHA).....	5
1.5	Microbiología para la degradación de tolueno y síntesis de PHA	7
2.	OBJETIVOS	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1	Medio de cultivo	9
3.2	Inóculo.....	10
3.3	Metodología	10
3.3.1	Biodegradación de tolueno en ensayos batch.	10
3.3.2	Biodegradación de tolueno en un biorreactor airlift.	10
3.4	Métodos analíticos	13
3.4.1.	Fase gas	13
3.4.2.	Carbono orgánico total, nitrógeno total y carbono inorgánico (COT)	14
3.4.3.	Densidad óptica.....	14
3.4.4.	pH	14
3.4.5.	Sólidos suspendidos totales (SST)	14
3.4.6.	Análisis de PHA	14
4.	RESULTADOS	16
4.1	Ensayos de biodegradación en batch	16
4.2	Ensayo en biorreactor airlift	20
5.	CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	27
6.	BIBLIOGRAFÍA	28
	ANEXOS	32
	ANEXO I – Curvas de calibración	32



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Resumen de datos obtenidos durante los ensayos batch de degradación de tolueno	18
Tabla 2- Resumen de datos obtenidos durante el ensayo.....	22



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Biorreactor Airlift con recirculación interna (Kumar Vikrant, 2016).....	5
Figura 2 - Estructura general de los PHA (Khanna & Srivastava, 2005).....	6
Figura 3 – Diagrama de proceso de un biorreactor Airlift.....	12
Figura 4 - Eliminación de tolueno en cultivos batch alimentados con 4, 7, 14 y 21 g m ⁻³	16
Figura 5 - Eliminación de tolueno en un ensayo batch con 28 y 54 g m ⁻³ de tolueno.....	17
Figura 6 - Curva de producción de biomasa para ensayos batch alimentados con 4 a 54 g m ⁻³ de tolueno	18
Figura 7- Producción de PHA volumétrica y por gramo de biomasa.....	19
Figura 8 - Producción de PHA por gramo de tolueno.....	20
Figura 10 - Entrada, salida y rendimiento de eliminación de tolueno durante la experimentación en continuo en el reactor airlift.	21
Figura 11- Concentración de CO ₂ a la salida del reactor.....	22
Figura 12- Evolución de la densidad óptica (DO) durante el ensayo.....	24
Figura 13- Evolución de COT, CI, NT y NTE durante la experimentación.....	25
Figura 14 - Curva de calibración de tolueno	32
Figura 15 - Curva de calibración del CO ₂	32
Figura 16- Curva de biomasa vs DO	33



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos orgánicos volátiles (COV)

El creciente interés global por la calidad del aire y por mitigar los efectos perjudiciales de los contaminantes atmosféricos sobre la salud mundial y el medio ambiente ha convertido el control de las emisiones gaseosas en una prioridad internacional, tal como recoge la Organización Mundial de la Salud (OMS) (González-Martín et al., 2024). En este contexto, los compuestos orgánicos volátiles (COV) han cobrado especial relevancia como importantes contaminantes atmosféricos (Chary & Fernandez-Alba, 2012).

Los COV, que pueden encontrarse en estado líquido o gaseoso, se caracterizan por poseer puntos de ebullición entre 50-100 °C y 240-260 °C, además de una presión de vapor superior a 0,5 kPa a 25 °C, lo que favorece su volatilización y dispersión en el ambiente (Dobre et al., 2014). Entre sus propiedades químicas, destacan por su baja solubilidad en agua, su semivolatilidad y su capacidad para atravesar membranas biológicas, lo que puede conducir a su acumulación en tejidos grasos.

Las fuentes de COV pueden ser tanto naturales (biogénicas) como antropogénicas. Sin embargo, las emisiones de COV derivadas de actividades humanas, como la industria química, alimentaria, farmacéutica, así como la fabricación de pinturas, disolventes y combustibles, son particularmente relevantes debido a su elevado volumen y peligrosidad (Chary & Fernandez-Alba, 2012; Dobre et al., 2014). Fuentes recientes estiman que más de 142 millones de toneladas de carbono se emiten anualmente en forma de COV (Wang et al., 2022).

El impacto de estos compuestos sobre la salud pública es especialmente relevante en ambientes interiores, donde las concentraciones pueden llegar a ser hasta diez veces superiores a las del aire exterior (Van Tran et al., 2020). El tolueno, uno de los COV más habituales, ha sido detectado en concentraciones que oscilan entre 1 y 14 $\mu\text{g m}^{-3}$ y asociado a efectos adversos sobre la salud como asma, cáncer y trastornos neurológicos (Pei et al., 2020). Además, los COV participan en reacciones fotoquímicas que, en presencia de luz solar, favorecen la formación de aerosoles secundarios, contribuyendo tanto al cambio climático como a la generación de smog fotoquímico (Lan et al., 2020; Wang et al., 2022).



Dentro de los COV, el grupo conformado por benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) (Yu et al., 2022) destaca por su elevada toxicidad y por su uso recurrente en numerosos procesos industriales, siendo utilizados como materias primas y solventes en procesos de síntesis química (González et al., 2017). Estos compuestos han sido clasificados como contaminantes atmosféricos peligrosos (hazardous air pollutants “HAP”) debido a su alto potencial nocivo. En particular, el benceno está reconocido como carcinógeno para los seres humanos (González et al., 2017) y, junto con los demás compuestos BTEX, puede afectar gravemente al sistema nervioso central y al aparato respiratorio.

Ante esta situación, resulta fundamental establecer un seguimiento continuo de la calidad del aire, así como garantizar el cumplimiento de la normativa vigente y aplicar medidas de mitigación cuando se superen los límites establecidos para estos contaminantes (Lan et al., 2020).

1.1.1 Tolueno

El tolueno ($C_6H_5CH_3$) es un hidrocarburo aromático de gran relevancia industrial, ampliamente utilizado en diversos procesos productivos. Se distingue por su distintivo olor dulce, perceptible incluso a bajas concentraciones, y por sus propiedades fisicoquímicas, que facilitan su dispersión en el ambiente. Entre estas propiedades destaca su alta volatilidad y su notable presión de vapor, que alcanza los 3,73 bar a temperatura ambiente (INSST, 2007). Además, debido a su densidad inferior a la del aire, el tolueno tiende a acumularse en zonas bajas, incrementado el riesgo de inhalación (Carolina, 2020).

La exposición al tolueno puede provocar efectos adversos sobre la salud, cuya gravedad depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición. En casos de exposición aguda, los síntomas más frecuentes incluyen cefaleas y efectos anestésicos. Sin embargo, exposiciones prolongadas pueden generar consecuencias más graves, como pérdida de visión, parálisis muscular e incluso la muerte (Jang et al., 2016).

Aunque el tolueno se encuentra naturalmente en el petróleo crudo, la principal fuente de emisión es resultado de la actividad industrial. Entre las más relevantes se encuentran la fabricación de combustibles, coque, pinturas, adhesivos, plásticos, nailon y poliuretano (Murindababisha et al., 2021). Esta amplia variedad de aplicaciones industriales explica su presencia en numerosos productos de uso cotidiano.



Como consecuencia de estas actividades, las concentraciones ambientales de tolueno en áreas industriales pueden oscilar entre 5-150 $\mu\text{g m}^{-3}$, alcanzando valores aún mayores en las inmediaciones de las fuentes de emisión (Bravo et al., 2002). Por ello, resulta imprescindible implementar tecnologías eficaces para reducir sus emisiones, con el objetivo de mejorar la calidad del aire y disminuir los riesgos para la salud pública.

1.2 Tecnologías de eliminación de tolueno

1.2.1 Tecnologías fisicoquímicas

Las tecnologías fisicoquímicas se han consolidado como métodos altamente eficaces para la eliminación de COV. Entre las técnicas más empleadas se encuentran la adsorción, la degradación catalítica, la oxidación, la absorción y la condensación (Dobre et al., 2014; Murindababisha et al., 2021).

La adsorción, especialmente con carbón activo, destaca por su eficacia y bajo coste, siendo particularmente útil para la remoción de COV en bajas concentraciones (Dobre et al., 2014). Por su parte, la absorción utiliza un disolvente líquido para separar el COV del gas, generando un residuo tratable que concentra los contaminantes (Genano, 2019).

La degradación catalítica representa una alternativa eficiente para la oxidación de COV mediante el uso de bajas temperaturas y metales preciosos como catalizadores, evitando la generación de subproductos indeseados (Murindababisha et al., 2025; Odour Observatory, 2021). Finalmente, la oxidación fotocatalítica es otra opción prometedora que emplea radiación ultravioleta a temperatura ambiente, evitando la generación de subproductos tóxicos (Mamaghani et al., 2017).

1.2.2 Tecnologías biológicas.

Aunque las tecnologías fisicoquímicas convencionales han demostrado ser efectivas, las tecnologías biológicas están adquiriendo relevancia como alternativas sostenibles y de bajo costo, especialmente para el tratamiento de COV en bajas concentraciones y grandes volúmenes de gas (Xu et al., 2019). Estas tecnologías se basan en el uso microorganismos específicos capaces de degradar los contaminantes, lo que permite reducir el uso de reactivos químicos y de los consecuentes subproductos tóxicos, además de disminuir el consumo energético (Wu et al., 2023). Sin embargo, la eficacia de estos sistemas depende del control de condiciones de operación óptimas como temperatura, disponibilidad nutrientes o pH.



Diversos microorganismos han demostrado poseer la capacidad para degradar COV, permitiendo su implementación en distintas configuraciones de biorreactores. Entre las tecnologías biológicas más relevantes se encuentra la biofiltración, en la que los microorganismos crecen sobre un material de empaque donde ocurre la degradación del contaminante (Xi et al., 2006). Los biolavadores constituyen otra alternativa destacable en la que el contaminante se transfiere desde la fase gaseosa a una fase líquida en una torre de absorción para su posterior degradación en un biorreactor donde la biomasa se encuentra en suspensión (Dialld Bio Energy, n.d.). Una configuración más avanzada la constituyen los reactores tipo airlift, que optimizan la transferencia de materia entre fases favoreciendo la eficacia de biodegradación de los contaminantes (Xu et al., 2019).

1.3 Biorreactor airlift

Los biorreactores airlift se han consolidado como una tecnología eficiente y versátil en diversos procesos biológicos, destacando tanto en el cultivo de microalgas como en la biodegradación de COV (Conde et al., 2013).

Estos sistemas se caracterizan por un diseño estructural compuesto por dos zonas verticales interconectadas: el canal de ascenso (*riser*) y el canal de descenso (*downcomer*). Esta configuración favorece la recirculación interna del fluido, lo que incrementa el contacto gas-líquido y mejora significativamente la transferencia de materia entre fases (Xu et al., 2019).

Para comprender el comportamiento y la eficiencia del reactor, resulta fundamental analizar ciertos parámetros hidrodinámicos, como la velocidad del líquido y la retención del gas (*holdup* gaseoso). Investigaciones recientes han demostrado que la generación de burbujas finas dentro del reactor contribuye a mejorar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (k_L), así como a mejorar la retención de gas, optimizando el rendimiento global del proceso (Li et al., 2022).

En aplicaciones específicas con tolueno, se han reportado eficiencias de eliminación de hasta $230 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para cargas de entrada de $550 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, operando con un caudal de $0,132 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (Vergara-Fernández et al., 2008).

Entre las principales ventajas de los biorreactores airlift destacan su construcción sencilla, bajo consumo energético, capacidad de operar a diferentes velocidades superficiales gas-líquido y la generación de patrones de flujo bien definidos (Li et al., 2022). Además, estos reactores permiten la fluidización de sólidos con esfuerzos cortantes bajos y uniformes,

favoreciendo el crecimiento óptimo de los microorganismos responsables de la biodegradación (Conde et al., 2013) .

En la Figura 1 se muestra un esquema típico de un biorreactor airlift con recirculación interna:

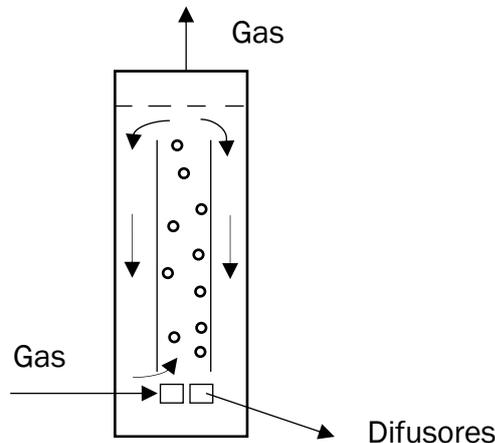


Figura 1- Esquema de un biorreactor airlift con recirculación interna

1.4 Polihidroxicanoatos (PHA)

La creciente preocupación por la contaminación ambiental causada por el uso masivo de plásticos ha impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles (Lau et al., 2020). La mayor parte de los plásticos convencionales se produce a partir de recursos petroquímicos no renovables, como el petróleo o el gas natural (Chamas et al., 2020). Actualmente, la producción mundial de plásticos supera los 430 millones de toneladas al año, de las que más de la mitad corresponden a productos de un solo uso. Sin embargo, apenas un 18% de estos residuos plásticos son reciclados (Chamas et al., 2020; ONU, 2023). Durante su degradación, los plásticos pueden generar microplásticos (<5 mm), que se dispersan y contaminan múltiples ecosistemas, incluyendo océanos, lagos, suelos y la atmósfera (Andrady, 2011).

En este contexto, los polihidroxicanoatos (PHA) han surgido como una alternativa prometedora a los plásticos derivados del petróleo. Estos biopolíesteres de origen microbiano destacan por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, lo que los convierte en materiales versátiles tanto para aplicaciones industriales como biomédicas (Goswami et al., 2021; Martin & Williams, 2003). A diferencia de los plásticos convencionales, los PHA se degradan de forma natural sin generar residuos tóxicos. Aunque su producción sigue siendo más costosa comparada con la de los plásticos de

origen fósil, se espera que el aumento en la demanda de materiales sostenibles contribuya a mejorar su competitividad en el mercado.

La síntesis de PHA es realizada por una amplia variedad de microorganismos, como *Cupriavidus necator*, *Chromatium vinosum* o *Pseudomonas aeruginosa*, que los acumulan en forma de gránulos citoplasmáticos denominados carbonosomas. Los PHA son almacenados como reserva de carbono y energía en condiciones de limitación de nutrientes, como nitrógeno o fósforo, así como por exceso o limitación de carbono. Desde su descubrimiento en 1926 por Lemogine, se ha demostrado que los PHA pueden presentar propiedades similares a la de los plásticos convencionales, como el polipropileno o polietileno, dependiendo de su composición química y de la longitud de cadena del polímero (Ceciliano-Castro et al., 2024; García et al., 2012). La estructura general de los PHA se muestra en la Figura 2:

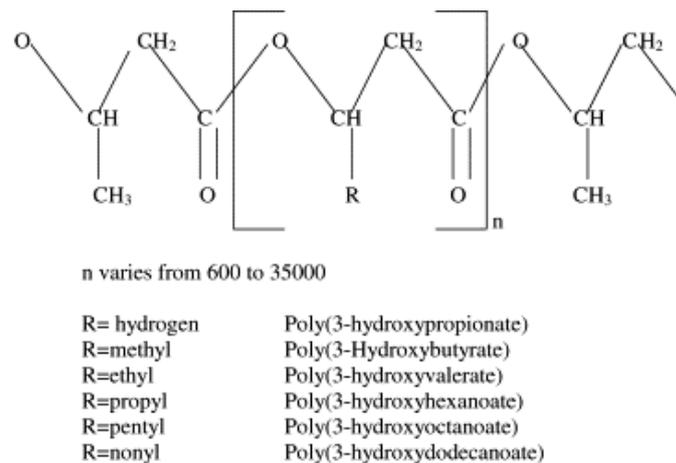


Figura 2 - Estructura general de los PHA y nombre del biopolímero en función del radical (Khanna & Srivastava, 2005)

Estos biopolímeros se clasifican según la longitud de sus cadenas laterales en:

- scl-PHA (cadena corta): 3-5 átomos de carbono.
- mcl-PHA (cadena media): 6-14 átomos de carbono.
- lcl-PHA (cadena larga): >14 átomos de carbono.

Los scl-PHA, en particular el polihidroxiбутирато (PHB) y el copolímero polihidroxiбутирато-cohidroxivalerato (PHBV), se caracterizan por su alta cristalinidad y resistencia a la tracción (Berezina et al., 2015 , Khanna & Srivastava, 2005). Por otro lado, los mcl-PHA presentan propiedades termoelastoméricas, baja cristalinidad y alta deformabilidad, con temperaturas de transición vítrea (Tg) de entre -50 y -25 °C y temperaturas de fusión (Tm) en el rango de 40-60 °C (Khanna & Srivastava, 2005).



1.5 Microbiología para la degradación de tolueno y síntesis de PHA

La degradación microbiana de tolueno representa un proceso clave en la remediación ambiental, dada la persistencia y la toxicidad de este compuesto aromático. Diversos microorganismos, tanto aerobios como anaerobios, han demostrado capacidad para degradar el tolueno en diferentes condiciones. Entre las bacterias aerobias más relevantes destacan *Malikia spinosa*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia pickettii* y *Burkholderia cepacia*, conocidas por su quimiotaxis hacia el tolueno (Parales et al., 2000; Révész et al., 2020).

En este contexto, *Cupriavidus necator* ha adquirido especial relevancia debido a su versatilidad metabólica y a su capacidad para transformar compuestos aromáticos persistentes, como el tolueno, en productos de alto valor industrial, como los polihidroxialcanoatos. *C. necator* es una bacteria gramnegativa, perteneciente a la familia Burkholdariaceae y a la clase β -proteobacteria. Su genoma codifica múltiples rutas metabólicas que le permiten utilizar diversas fuentes de carbono bajo condiciones tanto quimiolitótrofas como heterótrofas (Morlino et al., 2023; Vandamme & Coenye, 2004).

Por otro lado, la síntesis de PHB a partir de tolueno se realiza a través de su conversión a ácido benzoico, que posteriormente se transforma en catecol y, finalmente, en acetil-CoA, un precursor clave en la biosíntesis de PHB (Berezina et al., 2015). Esta vía metabólica involucra tres pasos enzimáticos principales:

1. Condensación: Dos moléculas de acetil-CoA se combinan para formar acetatoacetil-CoA, catalizado por la enzima 3-cetotiolasa (*phaA*).
2. Reducción: El acetoacetil-CoA se reduce a 3-hidroxiacetyl-CoA (3HB-CoA) mediante la acción de acetoacetil-CoA reductasa (*phaB*).
3. Polimerización: Finalmente, la PHB sintasa (*phaC*) cataliza la polimerización de los monómeros de 3HB-CoA, dando lugar al polímero PHB.

Estos tres genes (*phaA*, *phaB*, *phaC*) suelen organizarse en un operón común, permitiendo una regulación coordinada de la síntesis de PHB a partir de los intermediarios generados durante la degradación del tolueno (Zhang et al., 2022).



2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de la bacteria *Cupriavidus necator* para la valorización continua de tolueno en PHA en un biorreactor airlift. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar la capacidad degradativa de *C. necator* frente a distintas concentraciones de tolueno, entre 4 y 54 g m⁻³, en ensayos batch realizados en botellas estériles.
- Analizar el funcionamiento del reactor airlift operado con suministro continuo de tolueno a baja concentración y en condiciones de bajo tiempo de residencia.
- Caracterizar los PHA producidos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medio de cultivo

El medio mineral empleado fue el medio mínimo M9, ampliamente utilizado para el cultivo de bacterias. Para su preparación, por cada litro se agregaron 100 mL de solución de sales, 1 mL de la disolución de MgSO_4 , 0,3 mL de CaCl_2 , 1 mL de biotina, 1 mL de tiamina y 10 mL de solución de elementos traza, enrasando con agua destilada. Las disoluciones madre empleadas se describen a continuación:

- **Solución de sales (10×):** Se preparó disolviendo 75,2 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (30 g), NaCl (5 g) y NH_4Cl (5g) sobre 1 L de agua destilada.
- **MgSO_4 :** Para 100 mL de solución madre, se disolvieron 24,65 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sobre 87 mL de agua.
- **CaCl_2 :** Esta disolución se preparó disolviendo 14,70 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 94,5 mL de agua.
- **Biotina:** Se disolvieron 50 mg de biotina en 45 mL de agua. Posteriormente, se añadieron pequeñas alícuotas de NaOH 1 N hasta lograr la completa disolución de la biotina. Una vez disuelta, se ajustó el volumen a 50 mL añadiendo agua destilada. La solución resultante se esterilizó a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro. Finalmente, se prepararon alícuotas de 1 mL, que se almacenaron en una cámara frigorífica a -20 °C.
- **Tiamina:** Para 50 mL de solución madre, se disolvió 50 mg de tiamina-HCl en 45 mL de agua destilada y se enrasó hasta 50 mL. A continuación, la solución se esterilizó a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro.
- **Solución de elementos traza (100×):** Esta solución fue preparada disolviendo 5 g de EDTA en 800 mL de agua. Se ajustó el pH hasta un valor de 7,5 mediante NaOH . A continuación, se incorporaron los siguientes compuestos: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,82 g), ZnCl_2 (84 mg), $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg), H_3BO_3 (10 mg) y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,6 mg). La solución se enrasó con agua destilada hasta obtener un volumen total de 1 L y, finalmente, se esterilizó mediante un filtro de 0,22 μm .
- **Glucosa (20%):** Se disolvieron 100 g de glucosa en 440 mL de agua y se enrasó hasta 500 mL. No obstante, la glucosa solo fue empleada para llevar a cabo la inoculación del microorganismo (ver punto 3.1.2). En el resto de operaciones y experimentos, el tolueno fue la única fuente de carbono.



Finalmente, todas las disoluciones, a excepción de la biotina, la tiamina y los elementos traza, fueron esterilizadas en un Autoclave Raypa AES75 durante 15 minutos, a una temperatura de 121 °C.

3.2 Inóculo

La experimentación se llevó a cabo empleando un cultivo de *Cupriavidus necator* (Leibniz Institute DSMZ) que previamente había sido aclimatado a tolueno en laboratorio. El inóculo se cultivó durante una semana a 28 °C y 280 rpm en un agitador orbital, empleando botellas estériles selladas con tapones de bromobutilo.

3.3 Metodología

3.3.1 Biodegradación de tolueno en ensayos batch.

En primer lugar, se realizó un ensayo preliminar en condiciones controladas con el objetivo de evaluar y confirmar la capacidad de *C. necator* para emplear tolueno como única fuente de carbono. Para ello, se utilizaron botellas estériles selladas con tapones de bromobutilo con 200 mL de medio M9 en cada una. El ensayo batch consistió en un conjunto de pruebas destinadas a evaluar la eliminación de tolueno, el crecimiento del cultivo y la producción de PHA. Se realizaron un total de 6 experimentos por duplicado empleando 4, 8, 16, 24, 32 y 48 μL de tolueno y añadiendo un 5% v/v de inóculo con densidad óptica (DO) a 650 nm de $\sim 1,1$.

La adición de tolueno se efectuó al inicio de cada experimento empleando una jeringa Hamilton de líquidos de 10 μL . Durante el desarrollo, se realizó un seguimiento diario de la concentración de tolueno mediante cromatografía de gases, mientras que la densidad óptica (DO) a 650 nm se midió cada 48 horas para evaluar el crecimiento celular. Cuando el tolueno fue consumido en su totalidad, se procedió a añadir de nuevo la cantidad correspondiente hasta completar la duración de 7 días de ensayo. En el último día, se midió la concentración de nitrógeno total presente en el cultivo y se tomó una muestra de 2 mL de biomasa para la determinación y la cuantificación de polihidroxicanoatos.

3.1.2 Biodegradación de tolueno en un biorreactor airlift.

En este estudio, se evaluó la degradación de tolueno mediante un biorreactor airlift con recirculación interna mediante tubos concéntricos. Esta configuración se basa en un tubo cilíndrico concéntrico ubicado en el centro del reactor por el que circuló un caudal de flujo líquido bien definido (Li et al., 2022).



El sistema fue operado utilizando un biorreactor tipo airlift (R-101) con un volumen total de 10 L, operado bajo un volumen de trabajo de 7,5 L. Este tipo de biorreactor no requiere agitación mecánica, ya que garantiza una mezcla eficiente y una transferencia de materia adecuada mediante el flujo de gas ascendente como única fuerza impulsora.

El flujo de aire ingresó por la parte inferior del reactor, operando con un caudal constante de $0,09 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ a una presión en la corriente de entrada de 400 mbar. En consecuencia, el tiempo de residencia fue de 5 minutos. La temperatura se mantuvo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y el pH a ~ 7 . Se empleó una bomba de jeringa Fisherbrand a un caudal de $0,2 \text{ mL h}^{-1}$ para introducir tolueno líquido en la corriente de aire, permitiendo su volatilización. Esta mezcla de gases se transfirió a una cámara de mezcla para su homogenización antes de ingresar al reactor a través de 4 difusores ubicados en la parte inferior. Para garantizar la homogenización del cultivo y evitar la aparición de zonas anóxicas se mantuvo una recirculación de líquido mediante una bomba (P-101) a una velocidad de 450 mL min^{-1} .

El control del proceso se realizó mediante una rutina de análisis que incluyó la cuantificación diaria de tolueno y dióxido de carbono en las corrientes gaseosas de entrada y salida mediante cromatografía de gases, y en la fase líquida, se realizó una medición de sólidos suspendidos totales (SST) cada 48 horas, así como un análisis del nitrógeno total (NT), carbono orgánico total (COT) y pH. El intercambio de medio de cultivo fue ajustado en función de la concentración de biomasa, la tasa de crecimiento y el COT, variando entre 250 y 750 mL con una tasa de dilución de $0,02 \text{ d}^{-1}$ para los 2 primeros días, de $0,05 \text{ d}^{-1}$ para los días 3 y 4, de $0,075\text{-}0 \text{ d}^{-1}$ para los días 5 y 6, y de $0,1\text{-}0 \text{ d}^{-1}$ para los días restantes del ensayo. Para este proceso se empleó la bomba (P-102). Finalmente, los gases de salida, principalmente aire, CO_2 y tolueno residual no degradado, fueron eliminados del sistema por una línea ubicada en la parte superior del reactor. Este experimento se operó de manera continua durante un total de 14 días.

En la Figura 3 se puede observar el diagrama de proceso de este sistema:

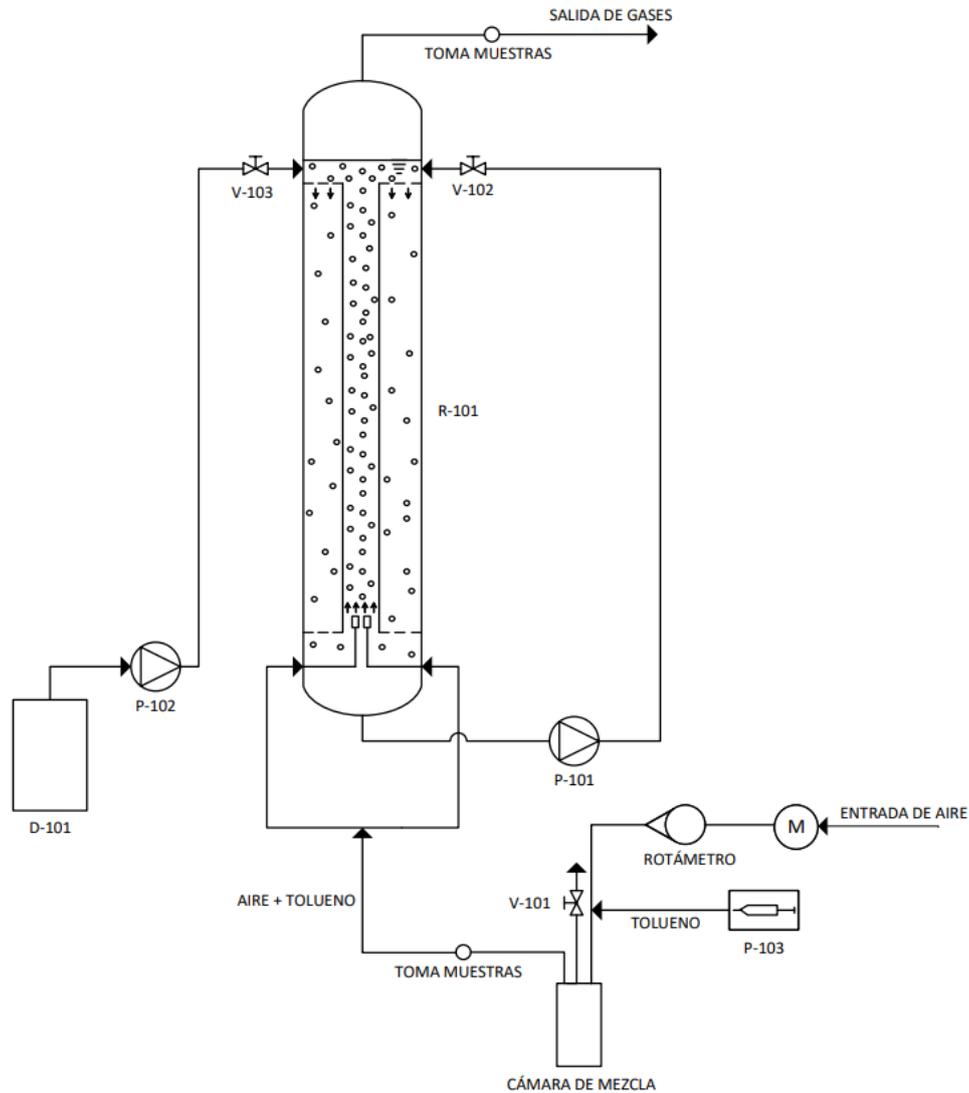


Figura 3 – Diagrama de proceso de un biorreactor airlift

Leyenda:

- R-101: Biorreactor airlift
- M: Manómetro
- P-101, P-102: Bombas centrífugas
- P-103: Bomba de jeringa
- V-101, V-102, V-103: Válvulas de paso
- D-101: Botella de almacenamiento de medio M9



3.4 Métodos analíticos

3.4.1. Fase gas

Las concentraciones de tolueno en las corrientes de aire, tanto en la entrada como en la salida del biorreactor, fueron analizadas diariamente empleando un cromatógrafo de gases GC-FID Agilent, equipado con una columna capilar Agilent HP-5MSI (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) y utilizando hidrógeno como gas portador. El sistema operó con un inyector split/splitless a 150 °C y un detector de ionización de llama a 200 °C (Kraakman et al., 2023). Por otro lado, para la cuantificación de CO₂ se empleó un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC, equipado con una columna CP-Molsieve 5^a (15 m × 0,53 μm × 15 μm), utilizando helio como gas portador. El inyector del sistema se mantuvo a 150 °C y el detector de conductividad térmica a 175°C. En ambos casos, las muestras se inyectaron en los equipos mediante una jeringa de vidrio Hamilton de 250 μL. Para poder determinar la concentración, se realizó una curva de calibrado mediante bulbos de muestreo de gases empleando diluciones y concentraciones conocidas de tolueno.

A partir de los valores de concentración, se calculó el porcentaje de eliminación y la carga diaria de tolueno en el sistema mediante las Ecuaciones 1 y 2, respectivamente:

$$\% \text{Eliminación}_{\text{Tolueno}} = \frac{[C_T]_{\text{in}} - [C_T]_{\text{out}}}{[C_T]_{\text{in}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Carga alimentación}_{\text{Tolueno}} \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^3 \cdot \text{h}} \right) = [C_T]_{\text{in}} \cdot Q \cdot \frac{1}{V_{\text{Reactor}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo $[C_T]_{\text{in}}$ y $[C_T]_{\text{out}}$ la concentración de tolueno a la entrada y a la salida del reactor respectivamente, 'Q' el flujo de aire alimentado (0,09 m³ h⁻¹) y por último V_{reactor} , corresponde al volumen útil del reactor (7,5 L).

Asimismo, se pudo determinar la cantidad de tolueno consumida en el reactor, por gramo de biomasa y hora, mediante la Ecuación 3:

$$\text{Consumo específico} \left(\frac{\text{mg tolueno}}{\text{g biomasa} \cdot \text{h}} \right) = [C_T]_{\text{elim}} \cdot Q \cdot \frac{1}{[\text{SST}]} \cdot \frac{1}{V_{\text{Reactor}}} \quad \text{Ecuación 3}$$



Finalmente, para determinar la concentración estimada teórica de SST a partir de la producción de CO₂ se empleó la Ecuación 4, la cual está basada en experimentos previos de degradación de tolueno mediante *Cupriavidus necator*:

$$SST_{\text{TEÓRICOS}} = 0,3337 \cdot [CO_2] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde SST_{Teóricos} son los sólidos suspendidos totales en g L⁻¹ y la [CO₂] es la concentración de CO₂ en la fase gas en g m⁻³.

3.4.2. Carbono orgánico total, nitrógeno total y carbono inorgánico (COT)

Para la determinación del nitrógeno total (NT), carbono orgánico total (COT) y carbono inorgánico (CI) presentes en el medio, se empleó el equipo COT-V_{CSH} de la marca Shimadzu. Este equipo utiliza el método de combustión oxidativa catalítica a 680°C, combinado con la técnica NDIR (Non-Dispersive Infra Red), permitiendo realizar mediciones de alta sensibilidad de sustancias orgánicas (Shimadzu, 2025).

3.4.3. Densidad óptica

Para determinar la densidad celular se utilizó un espectrofotómetro de la marca Shimadzu UV mini-1240, operando a una longitud de onda de 650 nm y utilizando cubetas para introducir la muestra a analizar.

3.4.4. pH

La medición del pH fue llevada a cabo cada 48 horas utilizando el pHmetro Crison BASIC-20.

3.4.5. Sólidos suspendidos totales (SST)

El análisis de biomasa se realizó mediante el análisis de SST. Brevemente, se filtró un volumen específico de muestra, 10 mL, a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 μm, utilizando un sistema de aspiración a vacío con un embudo Büchner. La concentración de biomasa se calculó como la diferencia de peso del filtro antes y después del proceso de filtración tras un secado en estufa a 100 °C durante 48 horas.

3.4.6. Análisis de PHA

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la composición de PHA, se empleó un cromatógrafo de gases modelo 7820A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977E (GC-MS), equipado con una columna DB-WAX (30 m × 250 μm × 0,25 μm). La



temperatura del inyector y de la columna se establecieron en 250 °C y 40 °C, respectivamente, incrementando la temperatura del horno a una tasa de 8 °C min⁻¹ hasta alcanzar un máximo de 200 °C. Las temperaturas de la fuente y del cuadrupolo del espectrómetro de masas fueron de 230 °C y 150 °C, respectivamente, utilizando helio como gas portador a un flujo de 1 mL min⁻¹.

Para la extracción de PHA, se añadieron 2 mL de cloroformo, 1 mL de propanol-HCl (80:20 v/v) y 10 µL de un patrón interno de ácido benzoico en tubos de vidrio que contenían biomasa liofilizada, sometiéndose la mezcla a digestión en un baño a 100 °C durante 4 horas. Tras el enfriamiento de las muestras, se incorporó 1 mL de agua destilada para separar la fase orgánica densa de la fase inorgánica. Aproximadamente 1,5 mL de la fase orgánica se recogieron con una pipeta y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm en un vial de cromatografía para su análisis. Se realizó una curva de calibrado con el patrón de PHB para poder determinar la concentración real de las muestras.

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos de biodegradación en batch

La experimentación en batch consistió en la evaluación de diversos cultivos suplementados con 4, 8, 16, 24, 32 y 48 μL de tolueno, correspondientes a 4, 7, 14, 21, 28 y 54 g m^{-3} , respectivamente. Los cultivos se mantuvieron durante 7 días para determinar el potencial de *C. necator* para utilizar tolueno como única fuente de carbono. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyó un control abiótico con 4 g m^{-3} de tolueno en la fase gas con el fin de cuantificar la pérdida por degradación abiótica y toma de muestras.

- **Eliminación de tolueno**

Los resultados de los ensayos alimentados con 4, 7, 14 y 21 g m^{-3} de tolueno mostraron una degradación diaria prácticamente completa del contaminante, manteniendo en todos los casos una eliminación superior al 98% respecto a la concentración total suministrada durante todo el ensayo. En consecuencia, la mayor tasa de degradación registrada fue de $21,3 \pm 0,1 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el cultivo alimentado con 21 g m^{-3} de tolueno (Figura 4).

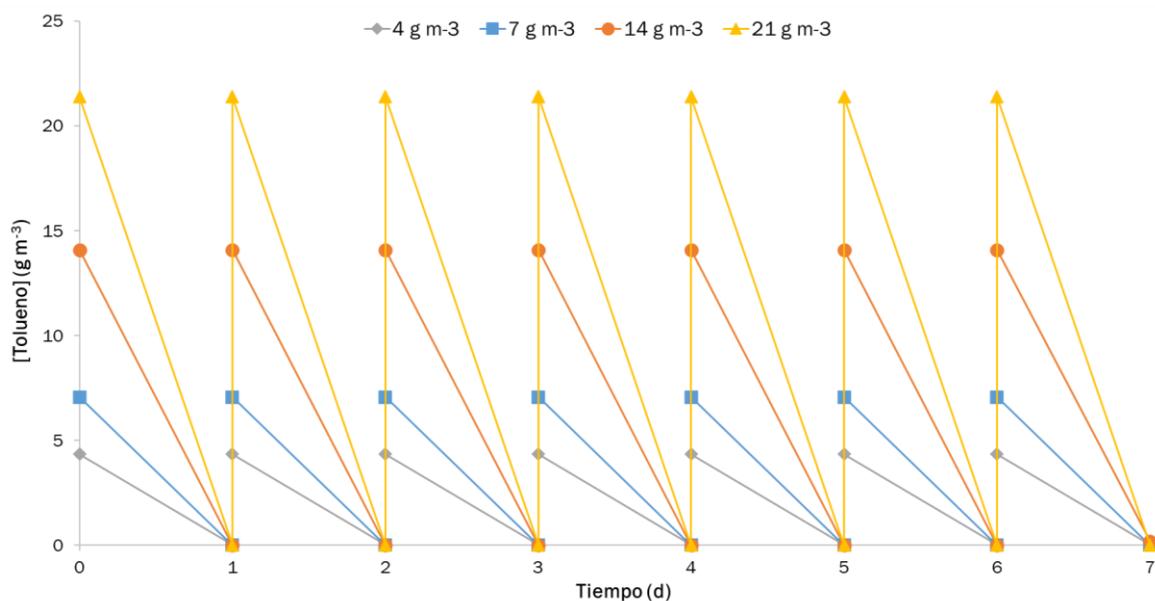


Figura 4 – Concentración de tolueno en los cultivos batch alimentados con 4, 7, 14 y 21 g m^{-3}

Por el contrario, los ensayos alimentados con 28 y 54 g m^{-3} de tolueno evidenciaron la inhibición del crecimiento en el cultivo de *C. necator*, sin observarse un consumo apreciable del contaminante. Este efecto pudo deberse a la toxicidad del tolueno cuando se presenta en concentraciones elevadas (Figura 5).

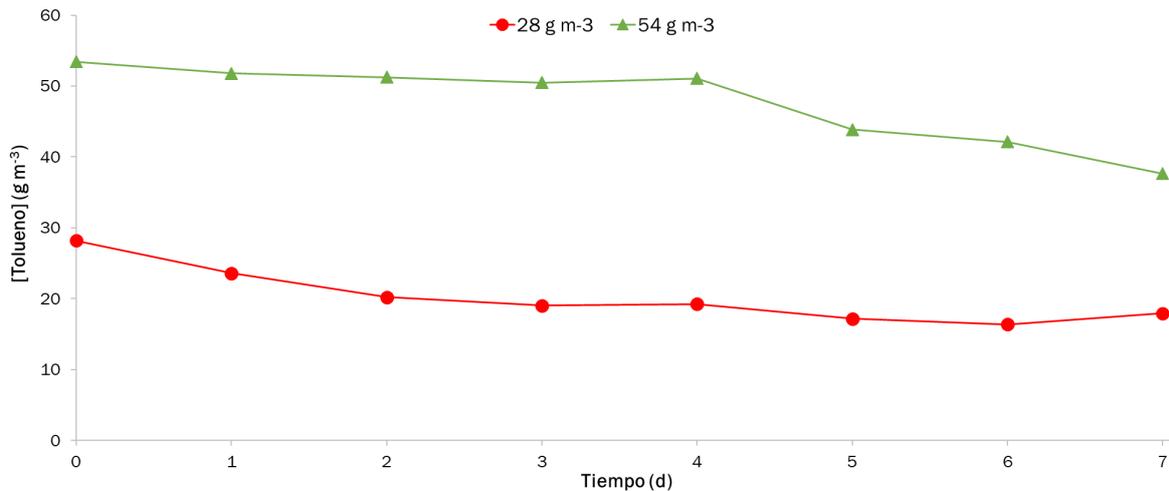


Figura 5 - Concentración de tolueno en los ensayos batch con 28 y 54 g m⁻³ de tolueno

Por lo tanto, concentraciones superiores a 28 g m⁻³ redujeron la eficiencia y la tasa de eliminación a valores inferiores al 19% y 9,9 ± 1,6 g m⁻³ d⁻¹, respectivamente. Estudios previos ya habían demostrado que concentraciones de tolueno muy elevadas pueden disminuir la velocidad de crecimiento e inhibir la actividad celular en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Ralstonia*, si bien en estos casos la inhibición no se alcanza hasta concentraciones superiores a las observadas en este estudio (~155 g m⁻³). Este efecto tóxico se atribuye principalmente al aumento de la permeabilidad de la membrana celular inducido por el tolueno (Alagappan & Cowan, 2003). Si bien el efecto inhibitorio del tolueno en concentraciones elevadas es evidente, la concentración a partir de la cual se manifiestan estos efectos tóxicos puede variar según la especie, la concentración de biomasa y las condiciones operativas o ambientales.

- **Producción de biomasa**

La concentración de biomasa obtenida al finalizar los ensayos se muestra en la Tabla 1. La mayor concentración, 0,98 ± 0,05 g L⁻¹, se alcanzó en el cultivo suplementado con 21 g m⁻³ de tolueno, mientras que la menor, 0,28 ± 0,03 g L⁻¹, se observó en los cultivos con 28 y 54 g m⁻³ de tolueno que habían sufrido inhibición (Figura 5). Estos efectos inhibitorios han sido documentados para diversos compuestos aromáticos, incluyendo benceno, tolueno y fenol, sobre bacterias como *Pseudomonas putida* (Mathur & Majumder, 2010). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que la producción de biomasa fue, como se esperaba, proporcional al consumo de tolueno. Por ejemplo, el cultivo alimentado con 4 g m⁻³ de tolueno no experimentó un aumento significativo en la concentración de biomasa, manteniéndose en 0,38 ± 0,01 g L⁻¹, probablemente debido a que la cantidad

de tolueno suministrada fue insuficiente para permitir un crecimiento celular apreciable (Figura 6).

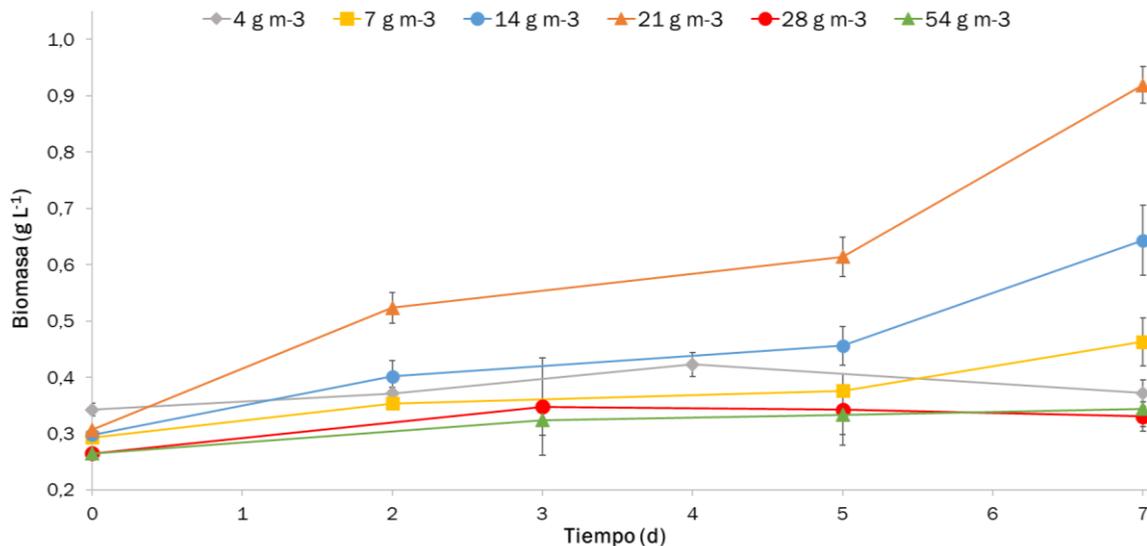


Figura 6 – Evolución de la concentración de biomasa en los batch alimentados con 4, 7, 14, 21, 28 y 54 g m⁻³ de tolueno

Finalmente, en la ‘Tabla 1’ se recopilan todos los datos de degradación de los ensayos batch:

V _{Tolueno, inicial} (μL)	[Tolueno] _{inicial} (g m ⁻³)	Eliminación (g m ⁻³ d ⁻¹)	Eliminación (%)	mg _{Tolueno, elim} · g ⁻¹ Biomasa
4	4	4,3 ± 0,0	99,9 ± 0,0	11,4 ± 0,0
8	7	7,1 ± 0,0	100 ± 0,0	15,0 ± 0,0
16	14	13,9 ± 0,02	98,7 ± 0,0	22,9 ± 0,02
24	21	21,3 ± 0,05	99,7 ± 0,02	21,7 ± 0,04
32	28	5,5 ± 0,6	19,5 ± 0,02	19,6 ± 2,2
48	53	9,9 ± 1,6	18,5 ± 0,03	33,6 ± 5,6

Tabla 1 - Resultados obtenidos durante los ensayos batch de degradación de tolueno

La última columna representa el consumo específico de tolueno calculado a partir de la eliminación total del tolueno y la generación total de biomasa en el último día de ensayo.

- **Producción de PHA**

Al finalizar los 7 días de ensayo, la concentración de nitrógeno en los cultivos fue de 133,3 ± 6,0 mg L⁻¹. En consecuencia, los cultivos no lograron consumir suficiente nitrógeno para

lograr la limitación de nitrógeno necesaria para la síntesis de PHA. Esto se debió principalmente a la moderada concentración de carbono suministrada durante la experimentación. No obstante, los análisis de PHA revelaron una cantidad basal producida en todos los ensayos. Esto pudo deberse a que la limitación en carbono también puede ser suficiente para la acumulación de PHA, así como los efectos que los compuestos BTEX, como el tolueno, pueden ejercer sobre la maquinaria celular (Zhang et al., 2022). En términos volumétricos, la mayor concentración de PHA se alcanzó en el cultivo suplementado con 7 g m^{-3} de tolueno, registrando un valor de $12,6 \pm 6,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 7). Sin embargo, al analizar la producción de PHA por gramo de biomasa, el mayor rendimiento se observó con 54 g m^{-3} de tolueno, alcanzando $30,77 \pm 3,1 \text{ mg gSST}^{-1}$, lo que representa un $3,08 \pm 0,0\%$ (Figura 8). No obstante, este elevado contenido específico de PHA se debió principalmente a la baja concentración de biomasa en dichos cultivos, más que a una producción absoluta de PHA mayor. Excluyendo los dos cultivos afectados por la inhibición provocada por el tolueno (28 y 54 g m^{-3}), la mayor concentración de PHA se obtuvo en el cultivo con 7 g m^{-3} de tolueno, obteniendo un $2,75 \pm 0,02\%$.

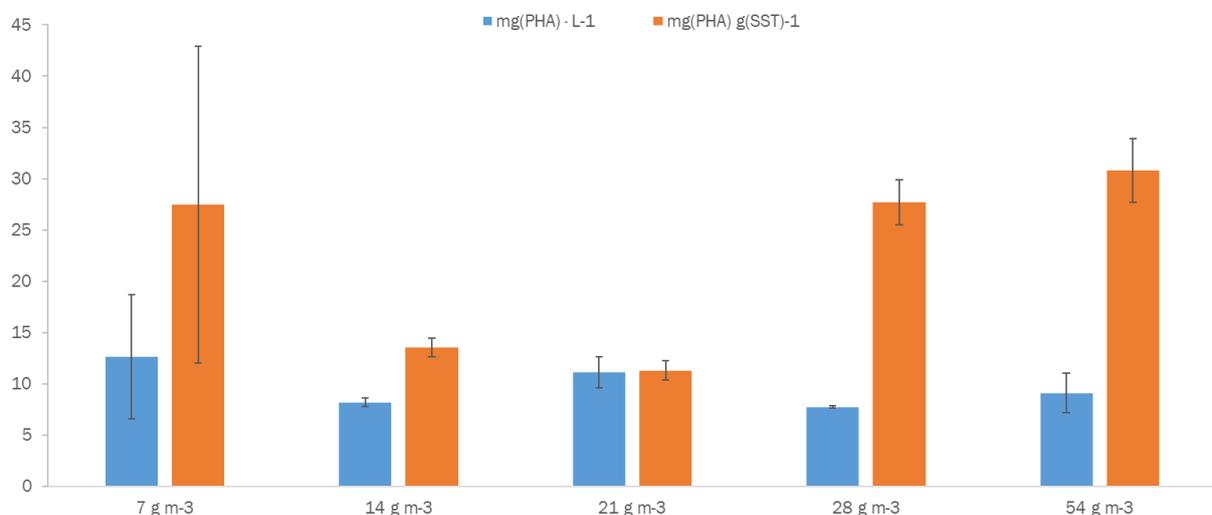


Figura 7- Producción de PHA volumétrica y por gramo de biomasa obtenida en los ensayos batch

Por otro lado, el análisis de la eficiencia en la conversión de tolueno a PHA reveló que los ensayos con menor concentración de tolueno favorecieron una mayor producción de PHA por gramo de tolueno. En concreto, se obtuvieron valores del $36,3 \pm 17,5\%$, $12,5 \pm 2,1\%$, $10,7 \pm 1,4\%$, $5,6 \pm 0,1$ y $4,4 \pm 0,9\%$ de producción de PHA por gramo de tolueno para las concentraciones de 7, 14, 21, 28 y 54 g m^{-3} , respectivamente (Figura 8).

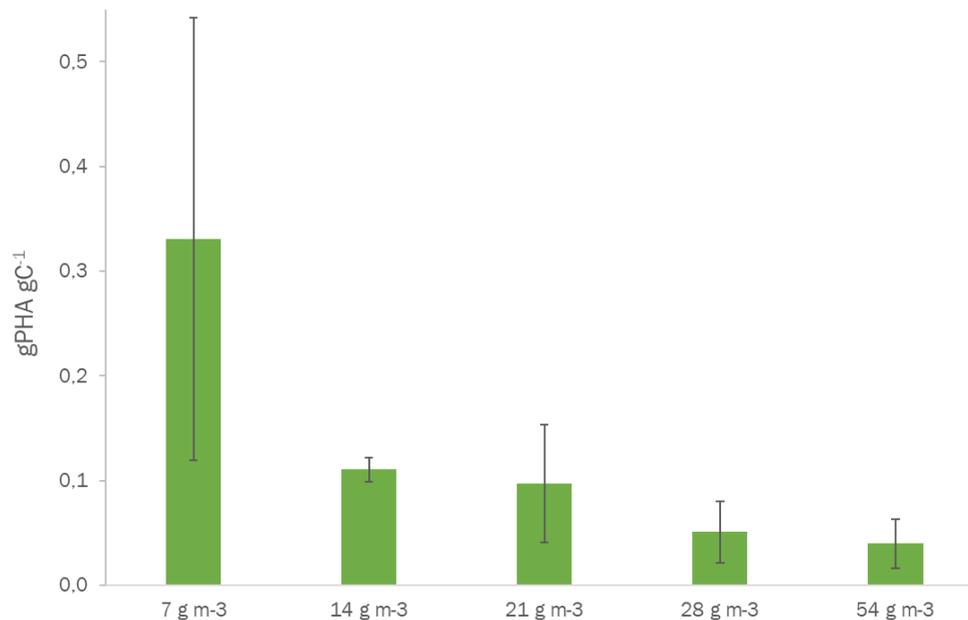


Figura 8 - Producción de PHA por gramo de carbono

Si bien en estudios previos, como el de Rond'ošová et al. (2022), reportaron rendimientos de hasta 49% de PHB bajo condiciones óptimas utilizando glucosa como fuente de carbono, los resultados obtenidos en este estudio, aunque con concentraciones significativamente inferiores, deben interpretarse desde una perspectiva diferente ya que permite utilizar un contaminante como fuente de carbono. En cualquier caso, en dicho estudio se destaca la importancia de realizar una limitación de nitrógeno para maximizar la producción de PHB, logrando incrementos de hasta 3,8 veces respecto al medio no optimizado.

4.2 Ensayo en biorreactor airlift

Con el objetivo de promover la aplicabilidad de esta tecnología, se llevó a cabo un ensayo en un biorreactor airlift para evaluar la biorremediación de una corriente continua de aire contaminada con tolueno. El tolueno inyectado poseía una concentración inicial de 28,3 mg m⁻³ durante los primeros cuatro días,

siendo posteriormente reducida a 18,9 mg m⁻³ para los días restantes, con una duración total de la experimentación de 14 días. Las condiciones en el reactor de temperatura, presión de entrada y pH se mantuvieron constantes en 25 °C, 400 mbar y 7,07 ± 0,05.

- **Eficacia de eliminación de tolueno**

Durante la fase inicial del cultivo, la eficiencia de eliminación de tolueno experimentó un aumento progresivo característico de la fase de crecimiento exponencial, alcanzando una

eficiencia de eliminación de $58,7 \pm 0,0$ % en el día 2. Este comportamiento sugirió una adecuada adaptación del inóculo a las condiciones operativas del sistema. Sin embargo, posteriormente se observó un descenso de la capacidad de eliminación, probablemente debido a la inhibición generada por la toxicidad del tolueno, como se demostró en los ensayos batch. Esto motivó la reducción del caudal de inyección de tolueno a $0,2 \text{ mL h}^{-1}$, por ende, la concentración y la carga de entrada se redujeron a $3,62 \pm 0,8 \text{ g m}^{-3}$ y $43,5 \pm 9,6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, con la finalidad de evitar posibles efectos tóxicos del tolueno en el sistema. Tras este ajuste, la eficiencia de eliminación mantuvo un valor medio de $81,96 \pm 0,02\%$ durante la fase estacionaria. En consecuencia, el sistema mantuvo una concentración promedio de salida de $0,73 \pm 0,14 \text{ g m}^{-3}$ (Figura 9) y un consumo específico de $30,0 \pm 3,2 \text{ mg}_{\text{Tolueno}} \text{ g}_{\text{SST}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Si bien se obtuvo una alta capacidad de eliminación de $40,95 \pm 4,3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, no se logró obtener una corriente de salida prácticamente libre de tolueno. Esta limitación pudo atribuirse al bajo tiempo de residencia del gas, necesario para mantener el flujo airlift dentro del reactor. Por lo tanto, una concentración de tolueno de entrada más baja podría haber permitido alcanzar una eficiencia de eliminación completa. Sin embargo, las restricciones técnicas de la bomba de jeringa impidieron realizar un ajuste tan preciso en el sistema.

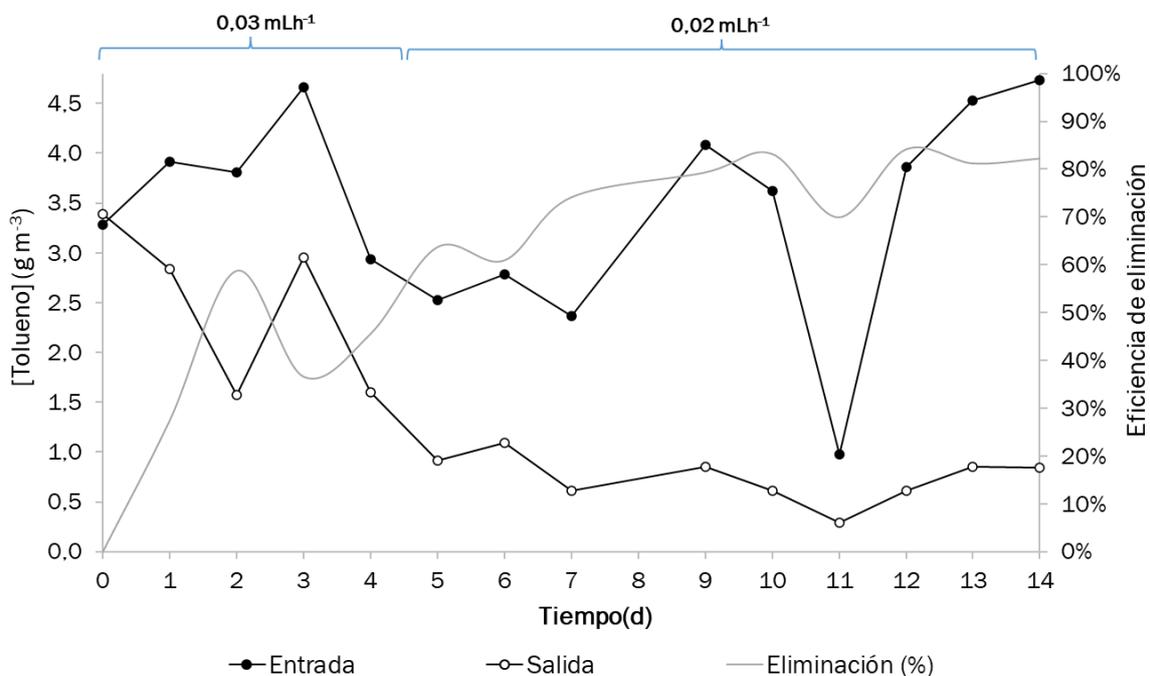


Figura 9 – Concentración de tolueno en la fase gas y rendimiento de eliminación de tolueno durante la experimentación en continuo en el reactor airlift.

En la Tabla 2 se recogen los datos más relevantes obtenidos durante el ensayo:

$[C_T]_{in}$ (g m ⁻³)	$[C_T]_{out}$ (g m ⁻³)	Carga diaria (g m ⁻³ h ⁻¹)	Carga eliminada (g m ⁻³ h ⁻¹)	Eliminación tolueno (%)	Consumo específico (mg _T ·g _{SS_T} ⁻¹ ·h ⁻¹)
3,6 ± 0,8	0,7 ± 0,14	50,0 ± 5,5	40,95 ± 4,3	81,96 ± 0,02	30,0 ± 3,2

Tabla 2- Resultados obtenidos durante la experimentación en continuo en el reactor airlift

La eficiencia de eliminación de tolueno en sistemas de biofiltración ha sido evaluada en diversos trabajos. Por ejemplo, se reportó una eficiencia de eliminación del $75,8 \pm 7,0\%$ en un biofiltro operado con una carga de $21,27 \pm 3,3$ g m⁻³ h⁻¹ de tolueno, bajo un caudal de aire de 2 L min⁻¹, empleando *Pseudomonas putida* durante 20 días (Ghasemi et al., 2020). Como sucedió en esta investigación, estos resultados sugieren que caudales de aire elevados pueden dificultar la obtención de eficiencias de eliminación cercanas al 100%, posiblemente debido a una limitación en la transferencia del contaminante al medio de cultivo.

- **Producción de CO₂ y mineralización**

La concentración de CO₂ medida en la salida del reactor constituye un parámetro fundamental para la evaluación de la actividad microbiana durante la biodegradación de tolueno. Tal y como se muestra en la Figura 5, se observó un incremento progresivo en la producción de CO₂ desde la inoculación del sistema, evidenciando la mineralización de tolueno a CO₂ por el cultivo de *C. necator*. Durante el estado estacionario, la concentración de CO₂ en la salida del reactor fue de $4,08 \pm 0,14$ g m⁻³, lo que se traduce en una generación de CO₂ de $36,0 \pm 1,2$ mg_{CO2} g_{biomasa}⁻¹ h⁻¹.

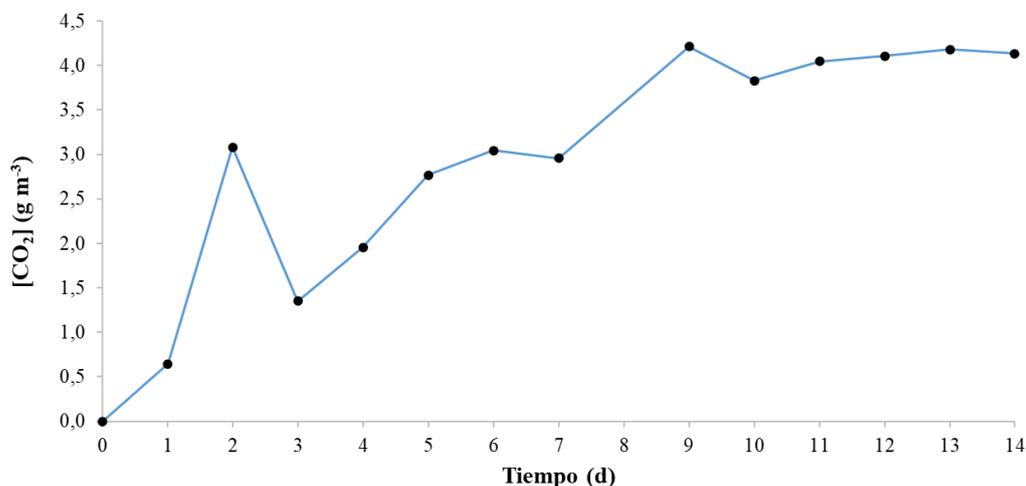


Figura 10- Evolución de la concentración de CO₂ a la salida del reactor



Valores comparables se han observado en estudios de *Pseudomonas putida F1* durante la biodegradación de concentraciones de 2 – 250 g m⁻³ de tolueno, obteniéndose una producción de CO₂ de 79,6 ± 12,9 mg_{CO2} g_{biomasa}⁻¹ h⁻¹ (Bordel et al., 2007). Por su parte, la mineralización permite cuantificar la fracción de carbono orgánico que es transformada en compuestos inorgánicos, principalmente CO₂. Durante la fase estacionaria, aproximadamente el 36,1 ± 0,3 % del tolueno consumido fue convertido en CO₂, lo que refleja su participación directa en la respiración celular. El resto del carbono es por tanto destinado a otros procesos metabólicos, como la síntesis de biomoléculas, incluyendo polihidroxialcanoatos (PHA). La tasa de mineralización puede variar considerablemente en función de la fuente de carbono, el cultivo y las condiciones operacionales y ambientales. No obstante, suelen reportarse valores similares durante la degradación de tolueno. Por ejemplo, una comunidad microbiana mixta (bacterias y hongos) en un biofiltro alimentado con tolueno mantuvo una mineralización del 50% con una ratio de producción de 2,15 g CO₂ g tolueno⁻¹ (G. W. Li et al., 2002).

- **Producción de biomasa**

Si bien el cultivo siguió una curva de crecimiento típica durante la operación, una proporción significativa de la biomasa permaneció adherida a las paredes del cilindro exterior constituyendo un biofilm. La agregación de comunidades microbianas en biofilm suele suceder ante condiciones de estrés, como la exposición prolongada al tolueno (Di Lorenzo et al., 2005). No obstante, esto también pudo verse influenciado por el tipo de material empleado en la construcción del reactor. En consecuencia, la determinación de la concentración de biomasa a partir de la medición de los SST o de la densidad óptica fue poco precisa, obteniéndose un valor promedio de DO de 0,039 ± 0,019 (Figura 11).

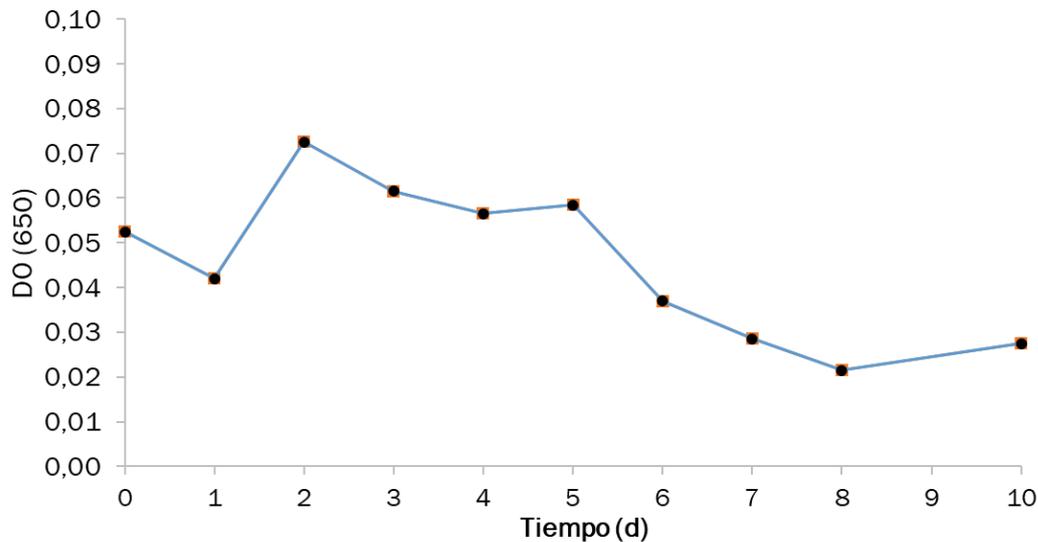


Figura 11- Evolución de la densidad óptica (DO) durante el ensayo

Ante esta limitación y empleando la ecuación 4 para estimar la concentración teórica de SST a partir de la producción de CO₂, se obtuvo una concentración promedio de SST_{TEÓRICOS} en la fase estacionaria de $1,37 \pm 0,02$ g L⁻¹, alcanzando un máximo de $1,41$ g L⁻¹ en el día 9.

Sin embargo, otros estudios han demostrado concentraciones de biomasa considerablemente superiores, hasta 5 g L⁻¹, capaces de obtener una eficiencia de eliminación del 90% de tolueno en un fotobiorreactor airlift empleando *Pseudomonas putida* DSM-6899 como cultivo. Si bien la concentración de entrada de tolueno fue relativamente similar a la de esta investigación, $6,2 \pm 0,7$ g m⁻³, la carga de entrada fue considerablemente superior, 369 ± 45 g m⁻³ · h⁻¹, lo que supone hasta 8 veces más que nuestro biorreactor (Lebrero et al., 2016). Por lo tanto, la concentración de biomasa obtenida en este ensayo pudo ser inferior debido a la carga de tolueno suministrada.

- **Análisis de la fase líquida**

En la Figura 11 se muestra la evolución del carbono orgánico total, el carbono inorgánico, el nitrógeno total y el nitrógeno total eliminado, distribuidos en 4 fases correspondientes a las diferentes tasas de dilución del líquido, 0,02-0,1 d⁻¹, e intercambio de medio de cultivo:

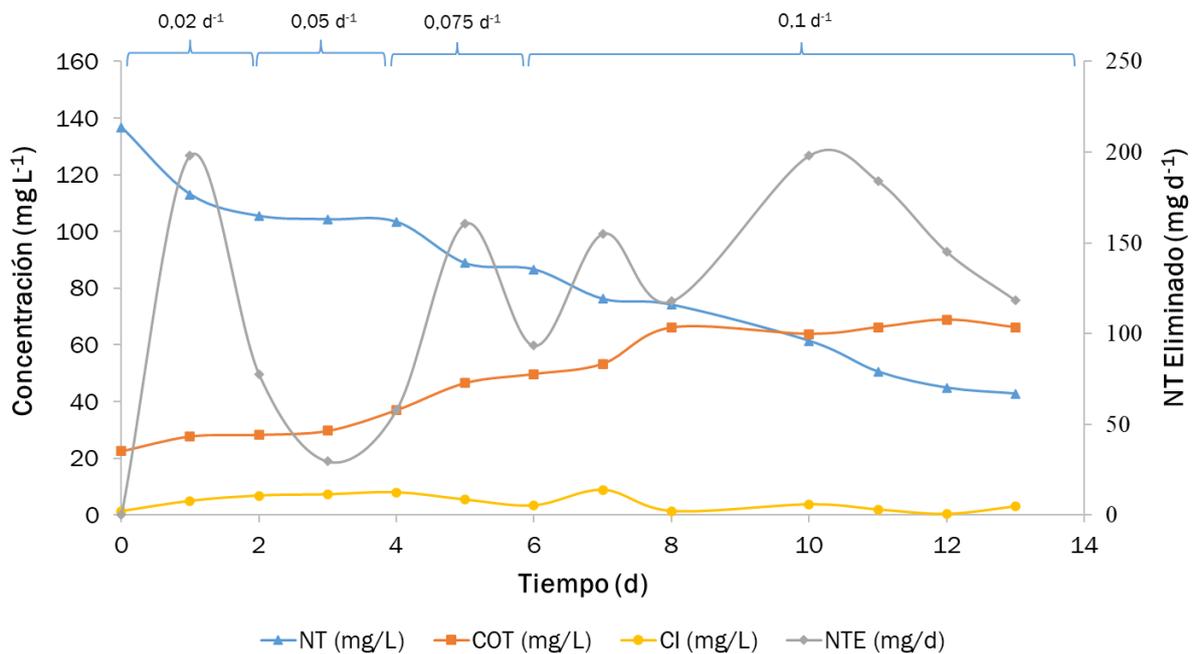


Figura 12- Evolución de COT, CI, NT y NTE durante la experimentación

○ **Carbono orgánico total (COT)**

Durante la experimentación, si bien la concentración de COT aumentó de $22,6 \text{ mg L}^{-1}$ hasta un máximo de $69,2 \text{ mg L}^{-1}$, no se alcanzaron valores superiores a 100 mg L^{-1} que habitualmente se relacionan con estrés celular o toxicidad (Ruiz, 2014), de forma que la tasa de dilución progresiva permitió mantener el COT bajo límites seguros para la operación.

○ **Carbono inorgánico (CI)**

La concentración de carbono inorgánico permaneció muy reducida a lo largo de todo el experimento, con un valor promedio de $4,3 \pm 2,77 \text{ mg L}^{-1}$, lo que sugiere que la mayoría del CO_2 se desorbe hacia la fase gas.

○ **Nitrógeno total (NT) y nitrógeno total eliminado (NTE)**

Durante el transcurso del ensayo, la concentración de NT disminuyó significativamente de $136,8 \text{ mg L}^{-1}$, al inicio de la operación, a $42,9 \text{ mg L}^{-1}$ al finalizar. Esta disminución indicó un consumo activo de nitrógeno por parte de *C. necator* y que la tasa de dilución progresiva garantizó en todo momento el suministro de nitrógeno al reactor, evitando periodos de limitación.



Investigaciones previas han evaluado el efecto de distintas concentraciones de nitrógeno sobre la capacidad de eliminación de tolueno en un biofiltro que emplea compost como material filtrante. En particular Delhoménie et al. (2001) utilizaron una concentración de entrada de tolueno de $1,7 \text{ g m}^{-3}$, con un caudal de operación de $1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Los resultados mostraron que a concentraciones iguales o superiores a $2 \text{ g N} \cdot \text{L}^{-1}$ permitieron alcanzar eficacias de eliminación de tolueno cercanas al 95%. Estos resultados resaltan la importancia de una adecuada suplementación de nitrógeno para optimizar el rendimiento del sistema.

- **Producción de PHA**

Debido a la formación de biofilm en el reactor, no fue posible cuantificar de manera precisa la producción de PHA en el reactor. La estrategia de limitación de nitrógeno aplicada no se llegó a implementar ya que el cultivo no se encontraba en estado planctónico, lo que dificultó el control sobre la disponibilidad de nutrientes y la recuperación de biomasa para el análisis cuantitativo. No obstante, mediante análisis de los cromatogramas obtenidos mediante espectrometría de masas, se logró detectar la presencia de PHB en el reactor, confirmando que, a pesar de las limitaciones metodológicas, la síntesis de este biopolímero tuvo lugar bajo las condiciones experimentales empleadas.



5. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado el alto potencial de *Cupriavidus necator* para la biodegradación de tolueno y la producción de PHB en cultivos batch. A concentraciones moderadas de tolueno, se alcanzaron eficacias de eliminación >99%, mientras que concentraciones superiores a 28 g m^{-3} provocaron un efecto inhibitorio en el crecimiento celular, así como la disminución de la eficiencia del sistema, reduciéndose hasta un $18,5 \pm 1,6\%$. Además, el cultivo fue capaz de sintetizar PHB utilizando tolueno como única fuente de carbono, validando su uso en procesos de biodegradación con valor añadido. Concretamente, la mayor concentración de PHA se obtuvo en el cultivo con 7 g m^{-3} de tolueno, obteniendo un $2,75 \pm 0,02\%$.

En el biorreactor airlift se obtuvo una capacidad de eliminación de $41,0 \pm 4,3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, representando un $81,96 \pm 0,02\%$, lo que confirma su viabilidad para tratar volúmenes moderados de contaminante. Sin embargo, no se pudo cuantificar de manera precisa la producción de PHA en el reactor debido a la formación de biofilm en él, únicamente se pudo detectar presencia de PHB mediante análisis cualitativos.

Estos resultados subrayan la importancia de evaluar el sistema en condiciones de baja carga y operación en continuo, limitando además el nitrógeno en el medio para potenciar la acumulación de PHA. Asimismo, en un trabajo futuro se podría evaluar una configuración alternativa del sistema con dos biorreactores airlift interconectados: uno orientado a la inoculación y crecimiento de *C. necator* con suficientes nutrientes orientado a la eliminación eficiente de tolueno, y una segunda etapa bajo condiciones de limitación de nutrientes para maximizar la acumulación de PHB.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 62, Issue 8, pp. 1596–1605). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Berezina, N., Yada, B., & Lefebvre, R. (2015). From organic pollutants to bioplastics: Insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*, 32(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.09.003>
- Bravo, H., Sosa, R., Bueno, E., & Gonz, L. (2002). Concentrations of benzene and toluene in the atmosphere of the southwestern area at the Mexico City Metropolitan Zone. In *Atmospheric Environment* (Vol. 36).
- Carolina, R. P. (2020). *Intoxicación por tolueno*. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152020000200053#B1
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chary, N. S., & Fernandez-Alba, A. R. (2012). Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental waters. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 32, pp. 60–75). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.011>
- Delhoménie, M. C., Bibeau, L., Gendron, J., Brzezinski, R., & Heitz, M. (2001). Toluene removal by biofiltration: Influence of the nitrogen concentration on operational parameters. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40(23), 5405–5414. <https://doi.org/10.1021/ie0011270>
- Di Lorenzo, A., Varcamonti, M., Parascandola, P., Vignola, R., Bernardi, A., Saceddu, P., Sisto, R., & de Alteriis, E. (2005). Characterization and performance of a toluene-degrading biofilm developed on pumice stones. *Microbial Cell Factories*, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-4>
- Dialld Bio Energy. (n.d.). *Tecnologías para tratamiento de aire: Biofiltros y biolavadores*. Retrieved May 16, 2025, from <https://blog.dialld.com/tecnologias-para-tratamiento-de-aire-biofiltros-y-biolavadores/>
- Dobre, T., Paîrvulescu, O. C., Iavorschi, G., Stroescu, M., & Stoica, A. (2014). Volatile organic compounds removal from gas streams by adsorption onto activated carbon. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(9), 3622–3628. <https://doi.org/10.1021/ie402504u>
- Félix Fabián Cortés Conde, Diego Rubio Fernández, & Édisson Mateo Gómez Espinosa. (2013). *Análisis comparativo de modelos hidrodinámicos y cinéticos para fotobiorreactores airlift*.
- García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, G., Antonio, J., & López, C. (2012). *SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO*.
- Genano. (2019). *Opciones de tecnología para la eliminación de COV*. <https://www.genano.com/es/infobase/opciones-de-tecnologia-para-la-eliminacion-de-cov>



- Getino, L., Martín, J. L., & Chamizo-Ampudia, A. (2024). A Review of Polyhydroxyalkanoates: Characterization, Production, and Application from Waste. In *Microorganisms* (Vol. 12, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102028>
- González, J. L., Pell, A., López-Mesas, M., & Valiente, M. (2017). Simultaneous determination of BTEX and their metabolites using solid-phase microextraction followed by HPLC or GC/MS: An application in teeth as environmental biomarkers. *Science of the Total Environment*, 603–604, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.267>
- González-Martín, J., Cantera, S., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2024). Indoor air VOCs biofiltration by bioactive coating packed bed bioreactors. *Journal of Environmental Management*, 349. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119362>
- INSST. (2007). *TOLUENO DOCUMENTACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DEL TOLUENO*. <https://www.insst.es/documents/94886/290254/DLEP+39.pdf/10f0339d-d2c9-47fd-8328-a502541f03e5?version=1.0&t=1528396299582>
- Jang, J. H., Kim, Y., Roh, T. Y., & Park, J. K. (2016). Degradation of toluene and acetic acid using cell-free enzyme system from single cell-strain. *Korean Chemical Engineering Research*, 54(5), 665–670. <https://doi.org/10.9713/kcer.2016.54.5.665>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005a). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005b). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Kumar Vikrant, R. S. S. (2016). *Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges 3.5.1.2 Airlift bioreactors*. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/airlift-bioreactors>
- Lan, H., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2020). Miniaturised air sampling techniques for analysis of volatile organic compounds in air. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 126). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115873>
- Lau, W. W. Y., Shiran, Y., Bailey, R. M., Cook, E., Stuchtey, M. R., Koskella, J., Velis, C. A., Godfrey, L., Boucher, J., Murphy, M. B., Thompson, R. C., Jankowska, E., Castillo, A. C., Pilditch, T. D., Dixon, B., Koerselman, L., Kosior, E., Favoino, E., Gutberlet, J., ... Palardy, J. E. (2020). *Evaluating scenarios toward zero plastic pollution*. <https://www.science.org>
- Li, G., Chen, K., Wei, Y., Zeng, J., Yang, Y., He, F., Li, H., & Ouyang, P. (2022). Mass Transfer, Gas Holdup, and Kinetic Models of Batch and Continuous Fermentation in a Novel Rectangular Dynamic Membrane Airlift Bioreactor. *Engineering*, 13, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.025>
- Li, L., Xu, X., Wang, W., Lau, R., & Wang, C. H. (2022). Hydrodynamics and mass transfer of concentric-tube internal loop airlift reactors: A review. In *Bioresource*



- Technology* (Vol. 359). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127451>
- Mamaghani, A. H., Haghghat, F., & Lee, C. S. (2017). Photocatalytic oxidation technology for indoor environment air purification: The state-of-the-art. In *Applied Catalysis B: Environmental* (Vol. 203, pp. 247–269). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.10.037>
 - Mathur, A. K., & Majumder, C. B. (2010). *Kinetics Modelling of the Biodegradation of Benzene, Toluene and Phenol as Single Substrate and Mixed Substrate by Using Pseudomonas putida*.
 - Morlino, M. S., Serna García, R., Savio, F., Zampieri, G., Morosinotto, T., Treu, L., & Campanaro, S. (2023). Cupriavidus necator as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. In *Biotechnology Advances* (Vol. 69). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>
 - Murindababisha, D., Yusuf, A., Kow, K. W., Sun, Y., Pan, R., Ren, Y., Chen, G. Z., Li, J., Wang, C., & He, J. (2025). Low-temperature catalytic oxidation of toluene using CeO₂@MIL-101(Fe): Stability against water and SO₂. *Process Safety and Environmental Protection*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2025.107005>
 - Parales, R. E., Ditty, J. L., & Harwood, C. S. (2000). Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 9). <https://journals.asm.org/journal/aem>
 - Pei, J., Yin, Y., Liu, J., & Dai, X. (2020). An eight-city study of volatile organic compounds in Chinese residences: Compounds, concentrations, and characteristics. *Science of the Total Environment*, 698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134137>
 - Rondošová, S., Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M., & Miertuš, S. (2022). Optimization of Growth Conditions to Enhance PHA Production by Cupriavidus necator. *Fermentation*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/fermentation8090451>
 - Ruiz, F. R. (2014). *Comportamiento ambiental de tensioactivos comerciales: Biodegradabilidad, toxicidad y ozonización*.
 - Van Tran, V., Park, D., & Lee, Y. C. (2020). Indoor air pollution, related human diseases, and recent trends in the control and improvement of indoor air quality. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082927>
 - Vergara-Fernández, A. O., Quiroz, E. F., Aroca, G. E., & Alarcón Pulido, N. A. (2008). Biological treatment of contaminated air with toluene in an airlift reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue4-fulltext-10>
 - Wang, Y., Ding, L., Shi, Q., Liu, S., Qian, L., Yu, Z., Wang, H., Lei, J., Gao, Z., Long, H., & Charles Xu, C. (2022). Volatile organic compounds (VOC) emissions control in iron ore sintering process: Recent progress and future development. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 448). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137601>
 - Wu, Y., Liu, Y., Kamyab, H., Rajasimman, M., Rajamohan, N., Ngo, G. H., & Xia, C. (2023). Physico-chemical and biological remediation techniques for the elimination



- of endocrine-disrupting hazardous chemicals. *Environmental Research*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116363>
- Xi, J., Hu, H. Y., & Qian, Y. (2006). Effect of operating conditions on long-term performance of a biofilter treating gaseous toluene: Biomass accumulation and stable-run time estimation. *Biochemical Engineering Journal*, 31(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.07.002>
 - Xu, P., Wei, Y., Cheng, N., Li, S., Li, W., Guo, T., & Wang, X. (2019). Evaluation on the removal performance of dichloromethane and toluene from waste gases using an airlift packing reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.081>
 - 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. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 435). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134825>
 - Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T. H., Loh, K. C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2022). A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>

ANEXOS

ANEXO I – Curvas de calibración

- Curva de calibrado de tolueno

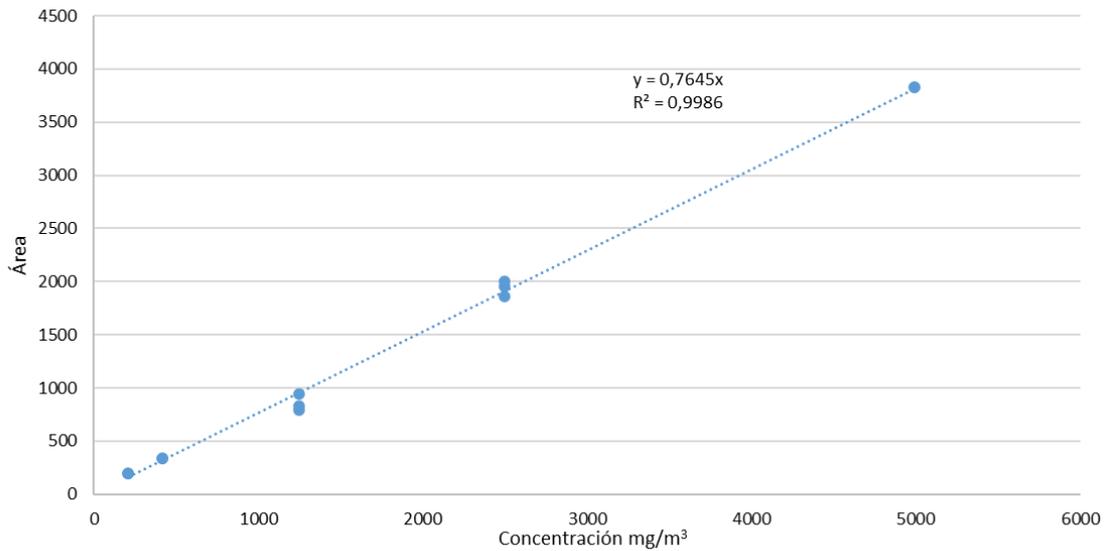


Figura 13 - Curva de calibración de tolueno

- Curva de calibrado de CO₂

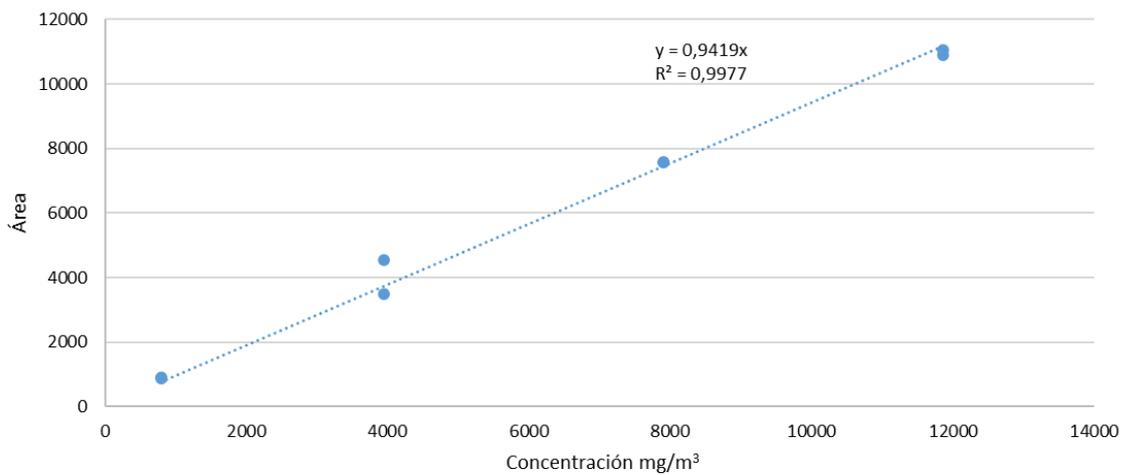


Figura 14 - Curva de calibración del CO₂



- Curva de biomasa

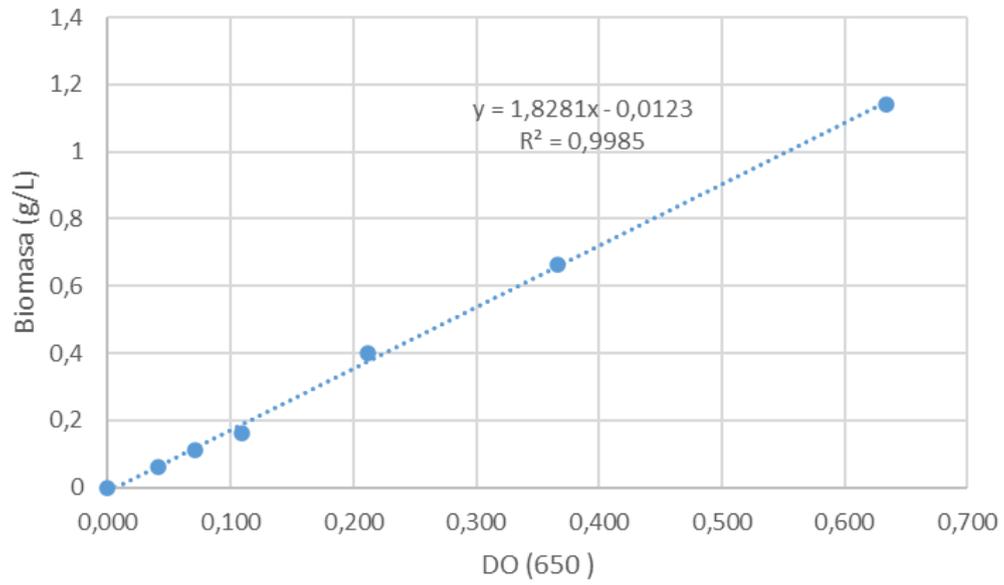


Figura 15- Curva de biomasa vs DO