



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Enfoque biotecnológico para la valorización de emisiones: Conversión biológica de estireno a polihidroxicanoatos en biorreactores de partición

Tesis que presenta

Victor Alfonso Alonso Campos

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Director de tesis:

Dra. Sonia Lorena Arriaga García

Comité tutorial:

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García (IPICYT-DCA)

Dr. Guillermo Quijano Govantes (UNAM-Instituto de Ingeniería)

Dr. Aitor Aizpuru (UMAR)

San Luis Potosí, S. L. P., noviembre de 2020

CARTA DE APROBACIÓN DE TESIS

La tesis “**Enfoque biotecnológico para la valorización de emisiones: Conversión biológica de estireno a polihidroxicanoatos en biorreactores de partición**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Victor Alfonso Alonso Campos** y aprobada el **día de mes de año** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Sonia Lorena Arriaga García
Director de la tesis

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Guillermo Quijano Govantes
Miembro del Comité Tutorial

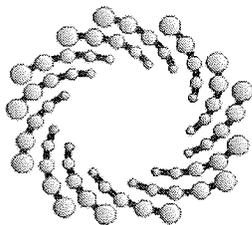
Dr. Aitor Aizpuru
Miembro del Comité Tutorial



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental I y II, así como en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Sonia Lorena Arriaga García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT931123) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 089 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 27 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Presidenta	IPICYT
Dra. Sonia Lorena Arriaga García	Secretaria	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Victor Alfonso Alonso Campos

sobre la Tesis intitulada:

Enfoque biotecnológico para la valorización de emisiones: Conversión biológica de estireno a polihidroxiclcanoatos en biorreactores de partición

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Sonia Lorena Arriaga García

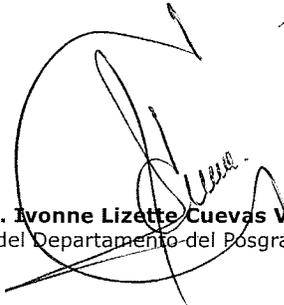
El Jurado, después de deliberar, determinó

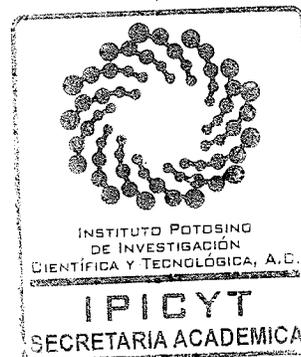
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 10:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de noviembre de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



DEDICATORIAS

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., específicamente, a la División de Ciencias Ambientales, por admitirme a su posgrado y por la calidad de sus servicios académicos y administrativos.

A la Dra. Sonia Arriaga García, por ser mi directora de tesis de maestría y por brindarme mucho aprendizaje en esta etapa académica.

A la Dra. Berenice Celis, Dr. Guillermo Quijano y Dr. Aitor Aizpuru por el seguimiento en el desarrollo de mi tesis de maestría y por sus valiosas aportaciones para mejorar la misma.

A la M.C. Mariana Candia por compartir sus conocimientos, experiencias y estrategias de trabajo, así como por auxiliarme cuando requería ayuda en el laboratorio y en el uso de equipos.

A la M. C. Itzel Covarrubias por su compañerismo dentro del grupo de trabajo y por orientarme cuando surgían algunas dudas experimentales.

Al Dr. Armín Hernández por ser un gran compañero y compartir sus conocimientos, experiencias y consejos sobre el quehacer científico.

A mis compañeras de generación de maestría, especialmente a Paola Arjona, Rosaura Alfaro y Lorena Rodríguez, por su amistad y compañerismo durante mi estancia en San Luis Potosí y en el IPICYT. De igual manera, a otros compañeros de maestría y doctorado de la DCA, quienes en algún momento me apoyaron o quienes me brindaron su amistad y compañerismo ¡Gracias!

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	II
Créditos institucionales	III
Acta de examen	IV
Dedicatorias	V
Agradecimientos	VI
Lista de tablas	IX
Lista de figuras	X
Anexos	XII
Resumen	XIII
Abstract	XIV
I. INTRODUCCIÓN	15
II. ESTADO DEL ARTE	18
2.1 Contaminación por compuestos orgánicos volátiles	18
2.2 Tecnologías para la eliminación de COV en efluentes gaseosos	19
2.2.1 Biorreactores de partición para la eliminación de COV	22
2.2.1.1 Líquidos iónicos	25
2.3 Valorización de COV en la producción de polihidroxialcanoatos	27
2.4 Estireno	32
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38
V. HIPÓTESIS	39
VI. METODOLOGÍA	40
6.1 Propagación y crecimiento de la cepa	40
6.1.1 Propagación de la cepa en medio nutritivo	40
6.1.2 Cinética de crecimiento de la cepa en medio nutritivo	41
6.1.3 Preparación de inóculos	41

6.1.4 Concentración mínima inhibitoria de estireno para <i>P. putida</i> S12	42
6.1.5 Parámetros cinéticos de la cepa utilizando estireno como sustrato	43
6.2 Evaluación de fases no acuosas	46
6.2.1 Coeficientes de partición	46
6.2.2 Biodegradabilidad: Producción de CO ₂	47
6.2.3 Inhibición de <i>P. putida</i> S12 en el consumo de sustrato	48
6.2.4 Toxicidad: Efecto en la viabilidad celular	49
6.3 Producción de PHA en lote con y sin fase no acuosa	49
6.4 Mediciones analíticas	51
6.4.1 Biomasa celular	51
6.4.2 Nitrógeno amoniacal	52
6.4.3 CO ₂ y estireno en fase gaseosa	52
6.4.4 Viabilidad celular	53
6.4.5 Polihidroxicanoatos	53
VII. Resultados	55
7.1 Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>P. putida</i> S12 utilizando estireno como sustrato	55
7.2 Selección de la fase no acuosa	58
7.2.1 Criterio de afinidad por el estireno	58
7.2.2 Criterio de biodegradabilidad	61
7.2.3 Criterio de inhibición	63
7.2.4 Criterio de toxicidad	65
7.2.5 Selección	66
7.3 Efecto de la fase no acuosa en la producción en lote de PHA a partir de estireno como sustrato	67
VIII. CONCLUSIONES	71
IX. PERSPECTIVAS	72
X. LITERATURA CITADA	73
XI. ANEXOS	88

LISTA DE TABLAS

1. Efectos adversos en seres vivos ante la exposición crónica de algunos COV en el ambiente	18
2. Efecto de la adición de una fase no acuosa en la capacidad de eliminación y eficiencia de remoción para el tratamiento de COV hidrofóbicos.	22
3. Comparación de los coeficientes de partición de diferentes COV en fases no acuosas convencionales y líquidos iónicos	26
4. Microorganismos que degradan COV y producen PHA	31
5. Microorganismos que degradan estireno	34
6. Acumulación de PHA por diferentes cepas utilizando estireno como fuente de carbono	36
7. Concentraciones de estireno evaluadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria.	43
8. Concentraciones iniciales de estireno en el espacio de cabeza para la determinación de parámetros cinéticos de <i>P. putida</i> S12	44
9. Diluciones de una suspensión de biomasa celular para la curva de calibración	52
10. Parámetros cinéticos de microorganismos que utilizan estireno y otros compuestos aromáticos como sustratos en condiciones óptimas de crecimiento	56
11. Reparto en el equilibrio de la concentración de estireno en el medio líquido y en el espacio de cabeza	59
12. Prueba de T student de la proporción de células vivas de <i>P. putida</i> S12 expuesta a aceite de silicona y líquido iónico	66

LISTA DE FIGURAS

1. Aplicación de tecnologías con procesos fisicoquímicos y biológicos para el tratamiento de emisiones gaseosas según el flujo del efluente y concentración del contaminante (Kennes y Vega, 2001).	20
2. Representación de un biorreactor de partición para el tratamiento de COV hidrofóbicos.	21
3. Estructura química del líquido iónico Tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([C ₆ mim][FAP]).	27
4. Aplicaciones de los PHA en diferentes sectores industriales.	30
5. Gráfica para obtener el coeficiente de partición	46
6. Gráficas que ejemplifican los criterios de biodegradabilidad de la fase no acuosa	47
7. Gráficas que ejemplifican los criterios de inhibición de la fase no acuosa	48
8. Cinéticas de crecimiento de <i>P. putida</i> S12 a diferentes concentraciones de estireno con ajuste al modelo Gompertz (izquierda; los símbolos representan datos experimentales) y las velocidades específicas de crecimiento de cada cinética en función de la concentración inicial de estireno (derecha).	55
9. Biodegradabilidad del aceite de silicona por <i>P. putida</i> S12	63
10. Biodegradabilidad del líquido iónico por <i>P. putida</i> S12	63
11. Inhibición de <i>P. putida</i> S12 en el consumo de estireno por exposición con el aceite de silicona al 5% v/v.	64
12. Inhibición de <i>P. putida</i> S12 en el consumo de estireno por exposición con el líquido iónico al 5% v/v.	64
13. Viabilidad celular de <i>P. putida</i> S12 expuesta a aceite de silicona y líquido iónico	65
14. Cinéticas de producción de PHA por <i>P. putida</i> S12 sin y con aceite de silicona al 5% v/v	68

15. Imágenes de microscopía de fluorescencia de *P. putida* S12 con tinción de rojo Nilo. 1: antes de la producción de PHA; 2: al final de la producción de PHA sin aceite de silicona; 3: al final de la producción de PHA con aceite de silicona; a: fluorescencia; b: contraste de interferencia diferencial (DIC; siglas en inglés); c: fluorescencia con DIC.

70

ANEXOS

1. Cinética de crecimiento de <i>P. putida</i> S12 en medio nutritivo	88
2. Concentración mínima inhibitoria de estireno para <i>P. putida</i> S12	88
3. Cinéticas de crecimiento de <i>P. putida</i> S12 a 140 y 180 rpm	89
4 Método gráfico para la obtención del coeficiente de partición del estireno en el aceite de silicona y el líquido iónico puros y en mezcla al 5% v/v con medio mineral.	89
5. Curva de calibración de densidad óptica a 600 nm	90
6. Curva de calibración para la medición de amonio	90
7. Curva de calibración para la medición de estireno y CO ₂	91

RESUMEN

El estireno es utilizado en procesos para fabricar plástico reforzado, caucho sintético y resinas, de los cuales una parte del estireno se volatiliza y libera a la atmósfera. En México, la legislación no incentiva el tratamiento de emisiones de estireno. Es por ello por lo que esta investigación propone valorizar emisiones de estireno por vía biológica para obtener productos de alto valor agregado. Sin embargo, la baja solubilidad del estireno en los medios acuosos donde los microorganismos crecen es una limitante. Para superar esto, se evaluó el uso de biorreactores de partición que consisten en adicionar una fase no acuosa hidrofóbica que funcione como vector de transferencia de masa. Estos sistemas han demostrado mejorar la velocidad de biodegradación de contaminantes gaseosos hidrofóbicos, aunque su uso para la conversión de este tipo de contaminantes a biopolímeros aún no ha sido probado. Por esta razón, en este estudio se evaluó el aceite de silicona y un líquido iónico como fases no acuosas y se seleccionó la cepa *Pseudomonas putida* S12 para la conversión de estireno a polihidroxialcanoatos (PHA), un biopolímero de interés comercial. Después de realizar pruebas de afinidad al estireno, biodegradabilidad, efecto inhibitorio y toxicidad de las fases no acuosas al 5% v/v en medio mineral, se encontró que la mezcla con líquido iónico absorbía 6.3 veces más estireno que la mezcla con aceite de silicona según los coeficientes de partición ($H_{est/MM+LI}=0.0032$; $H_{est/MM+AS}=0.0189$; 28 °C) y que ambas sustancias no fueron biodegradables por *P. putida* S12. Sin embargo, el líquido iónico fue inhibitorio y tóxico para *P. putida* S12 en contraste con el aceite de silicona. Así, se estableció que el aceite de silicona era la mejor fase no acuosa y se evaluó la producción de PHA en lote con y sin esta. Los resultados mostraron que el tiempo de producción de PHA se redujo en 40% cuando se adicionó 5% v/v de aceite de silicona. Esto concluye que el uso de biorreactores de partición es buena alternativa para valorizar emisiones de estireno a PHA. No obstante, se necesitan más investigaciones de esta tecnología para demostrar su factibilidad a gran escala.

Palabras clave: estireno, biorreactores de partición, aceite de silicona, líquidos iónicos

ABSTRACT

Styrene is used to manufacture reinforced plastics, synthetic rubbers, and resins. In Mexico, waste styrene emissions are released to atmosphere entirely. In order to promote sustainable processes to treat industrial emissions in Mexico, this study proposes valorizing styrene emissions using biological processes to produce high added value products, such as polyhydroxyalkanoates (PHA). However, solubility of styrene in aqueous media, where the microorganisms grow, is low. To overcome this limitation, this work proposes to use two-phase partitioning bioreactors, which combine aqueous medium with a hydrophobic non-aqueous phase. This strategy has been successful in the biodegradation of hydrophobic gaseous pollutants but, two-phase partitioning bioreactors efficiency has not been proved in the conversion of this type of pollutants to biopolymers. In order to test the assumptions detailed before, two non-aqueous phase such as silicon oil and an ionic liquid and the strain *Pseudomonas putida* S12 were selected. This strain has been reported to consume styrene and produce PHA, high added value biopolymers. After carrying out affinity to target compound, biodegradability, inhibition and toxicity tests to choose the best non-aqueous phase in 5% v/v with mineral medium to consume styrene and produce PHA, it was found that the mixture with ionic liquid absorbed 7.5 times more styrene than mixture with silicon oil according to partition coefficient ($H_{sty/IL}=0.0030$; $H_{sty/SO}=0.0226$; 28 °C) and both silicon oil and the ionic liquid were non-biodegradable by *P. putida* S12. However, the ionic liquid was inhibitory and toxic for *P. putida* S12 in contrast to silicon oil. Then, it was concluded that silicon oil is the best non-aqueous phase for the two-phase partitioning bioreactors experiments and kinetic experiments were performed with and without silicon oil. Results show that styrene production time of PHA was reduced until 40% when silicon oil was added (5% v/v). Finally, the use of two-phase partitioning bioreactors is a good alternative to valorize emissions of hydrophobic gaseous pollutants like styrene to produce high valuable products such as PHA. However, investigations of this technology to show its feasibility in large scale are needed.

Key words: styrene, two-phase partitioning bioreactors, silicon oil, ionic liquids

1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones industriales de compuestos orgánicos volátiles (COV) son un problema de contaminación atmosférica importante, ya que su presencia provoca efectos adversos en la salud de los seres vivos y promueve la formación de contaminantes atmosféricos secundarios como el ozono troposférico y los aerosoles. Entre estos COV, el estireno es de gran relevancia debido a que es utilizado como materia prima por la industria química para la fabricación de plásticos reforzados, caucho sintético y resinas. Durante estos procesos, cierta cantidad del estireno se volatiliza y es emitido al ambiente. En general, estas actividades industriales utilizan 15 millones de toneladas de estireno por año, de los cuales aproximadamente el 20% es residual (Tan *et al.* 2015). En el mejor de los escenarios, el 60% del estireno residual es reciclado y el 20% es liberado al ambiente exterior, pero en países como México, casi el 100% del estireno residual es liberado al medio ambiente (CCA, 2007; DOF, 2014).

Para eliminar el estireno de las emisiones de origen industrial, se utilizan procesos fisicoquímicos, biológicos, o ambos. Los procesos biológicos han mostrado ventajas sobre los procesos fisicoquímicos por ser menos costosos y adecuados para tratar efluentes con un alto flujo y baja concentración de contaminante (*i.e.* corrientes diluidas; ver Figura 1). A pesar de ello, cuando se quieren tratar contaminantes gaseosos hidrofóbicos como el estireno, se presentan dos limitaciones. La primera limitación consiste en que el contaminante gaseoso tiene una baja solubilidad en el medio acuoso en donde se encuentran los microorganismos encargados de biodegradar el contaminante. La segunda limitación se presenta cuando se tratan altas concentraciones de COV en biorreactores, puesto que puede ocurrir la intoxicación o inhibición de los microorganismos ($>10 \text{ g/m}^3$; Kennes y Vega, 2001). Con la finalidad de resolver estas limitaciones, se ha propuesto el uso de biorreactores de partición. Estos consisten en utilizar una fase no acuosa hidrofóbica que se mezcla con el medio acuoso. En la fase acuosa los nutrientes se encuentran disueltos y crecen los microorganismos, mientras que en la fase no acuosa, gran

parte del estireno es absorbido, actuando como un reservorio. Una vez que el estireno es absorbido en la fase no acuosa, es dosificado paulatinamente hacia la fase acuosa debido a un gradiente de concentración. La adición de la fase no acuosa a los reactores de partición mejora el transporte de masa de estireno y puede reducir el riesgo de que los microorganismos se intoxiquen o inhiban con altas concentraciones de COV.

Diversos estudios han concluido que el aceite de silicona es la fase no acuosa que muestra las mejores características para la biodegradación de COV en biorreactores de partición. Aun así, existen restricciones para su uso a gran escala debido a que forma espuma, se adhiere a las partes internas del reactor y presenta baja afinidad por algunos COV (Dumont *et al.* 2011). En el caso específico del estireno, el aceite de silicona ha mostrado buena afinidad comparado con otros COV menos hidrofóbicos (Patel *et al.*, 2017). Recientemente se han propuesto a los líquidos iónicos como fases no acuosas muy prometedoras para absorber COV relativamente hidrofóbicos, como el tolueno (Muñoz *et al.* 2012). Al respecto, se ha concluido que los líquidos iónicos pueden absorber hasta 3 veces más cantidad de COV que el aceite de silicona (ver Tabla 3). En el presente trabajo se decidió evaluar un líquido iónico formado por un catión de imidazolio y un anión de fluorofosfato para absorber vapores de estireno y compararlo con la absorción en aceite de silicona. Este líquido iónico se seleccionó porque ha sido reportado como una sustancia afín a compuestos hidrofóbicos, lo cual es potencialmente adecuado para la absorción de estireno (Ignat'ev *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2009; Ge y Lee, 2015). Además, este líquido iónico no ha sido probado en procesos biológicos, por lo que existe un gran interés de conocer su interacción con los microorganismos durante la biodegradación de estireno, ya que algunos reportes afirman que algunos líquidos iónicos pueden ser inhibitorios, otros líquidos iónicos no son inhibitorios o los microorganismos pueden superar la inhibición si se someten a un proceso de aclimatación.

Aunque la investigación sobre la biodegradación de estireno en reactores de partición ha mostrado valiosos resultados, su implementación a escala industrial en México es escasa, debido a que la inversión para la infraestructura, operación y mantenimiento de esta tecnología es alta y no genera ganancias económicas. Sin embargo, existen microorganismos que degradan el estireno y tienen la capacidad de convertirlo en polihidroxialcanoatos (PHA) bajo condiciones de limitación de nutrientes (e.g. N, P, etc.). Este biopolímero es un producto de alto valor agregado especialmente para la industria biomédica, debido a su naturaleza biodegradable y biocompatible, por lo que su comercialización puede generar ganancias económicas a las industrias que emiten vapores de estireno. Por lo tanto, con esta alternativa, las industrias emisoras de estireno podrían tener una opción más rentable para llevar a cabo el tratamiento biológico de este contaminante.

Por todo lo anterior, este trabajo tiene como objetivo la valorización de las emisiones de estireno residuales generadas industrialmente a partir de la conversión del estireno a PHA en biorreactores de partición a través de *Pseudomonas putida* S12, evaluando el uso de aceite de silicona y líquidos iónicos como fases no acuosas.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Contaminación por compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son moléculas a base de carbono que se evaporan rápidamente a temperatura ambiente, debido a que, en esta condición, su punto de ebullición es menor a 100 °C y su presión de vapor es mayor a 0.13 mmHg (Uragami, 2014). Los COV comprenden una amplia variedad de grupos químicos tales como isoprenoides, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas, éteres, ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, etc. (Kesselmeier *et al.*, 2002).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos clasifica a los COV como contaminantes del aire tóxicos y peligrosos que causan un efecto perjudicial en la salud humana y de otros seres vivos (Ayoko, 2004; Pérez-Rial *et al.*, 2010).

Tabla 1. Efectos adversos en seres vivos ante la exposición crónica de algunos COV en el ambiente

Compuesto	Efecto	C _{min} (ppm)	DL (mg/kg d)
Cloroformo	Hepatitis	0.0003**	0.01**
Fenol	Pérdida progresiva de peso (anorexia)	0.000006**	0.6**
Tetracloruro de carbono	Necrosis centrizonal	0.00004**	0.0007**
Benceno	Anemia y Leucemia	0.00003*	0.004*
Estireno	Supresión del sistema nervioso central	0.001*	0.2*
Tolueno	Insuficiencia respiratoria	0.005*	0.08*

C_{min} = Concentración mínima para que los efectos sean observados.

DL = Dosis mínima para que los efectos sean observados.

* Efecto observado en humanos.

** Efecto observado en ratas.

Elaborado a partir de: U.S. Environmental Protection Agency (2017)

Como se puede observar en la Tabla 1, estos contaminantes provocan enfermedades en el sistema nervioso, respiratorio y circulatorio, así como mutaciones y genotoxicidad (Zhang y Smith, 2003). Además, los COV están involucrados en reacciones fotoquímicas en la atmósfera que producen contaminantes secundarios como ozono troposférico y aerosoles, los cuales también tienen un efecto adverso en la salud (Manahan, 2000).

Los COV son emitidos a la atmósfera por fuentes biogénicas y antropogénicas. Las fuentes de emisión biogénicas incluyen la vegetación, suelos, volcanes e incendios naturales (Vallero, 2014). Por su parte, las fuentes de emisión antropogénicas involucran actividades industriales y no industriales en donde se realizan procesos de combustión incompleta y se utilizan solventes orgánicos (He *et al.*, 2015).

Los COV emitidos a la atmósfera pueden transportarse hacia otras matrices ambientales como el agua y el suelo a través de la precipitación, deposición seca, reacciones fotoquímicas, formación de material particulado y consumo directo por las plantas (Kim y Lenz, 2001, Fowler, 2002, Atkinson y Arey, 2003, Pöschl, 2005, Sato *et al.*, 2006).

2.2 Tecnologías para la eliminación de COV en efluentes gaseosos

La contaminación por COV es un problema de salud pública que debe ser remediado. Las soluciones propuestas para ello comprenden la eliminación de los COV desde las fuentes de emisión industriales utilizando procesos fisicoquímicos, biológicos o ambos (ver Figura 1). Al respecto, los procesos fisicoquímicos son empleados para el tratamiento de efluentes con un alto flujo y alta concentración de COV. Dentro de ellos se destacan la condensación, incineración, adsorción, absorción, sistemas de membranas y fotocatalisis. Por su parte, los procesos biológicos se recomiendan para el tratamiento de efluentes con un alto flujo y baja concentración de COV (*i.e.* corrientes diluidas; Jung y Park, 2005). Estos procesos permiten la degradación de los COV debido a que se aprovecha la capacidad

metabólica de los microorganismos para utilizar los COV como fuente de carbono y/o energía (Mutafov *et al.*, 2004).

Los criterios para discernir entre cual de las tecnologías existentes es más adecuada para la eliminación de COV son: características fisicoquímicas intrínsecas del contaminante, características del efluente gaseoso, eficiencia de remoción deseada, recuperación del contaminante y costos de inversión inicial, mantenimiento y operación (Jantschak *et al.*, 2004). Sin embargo, numerosos estudios han reportado que los procesos biológicos muestran ventajas sobre los procesos fisicoquímicos, debido a que tienen un menor costo y pueden operarse a temperatura y presión ambiente (Aldric y Thonart, 2008).

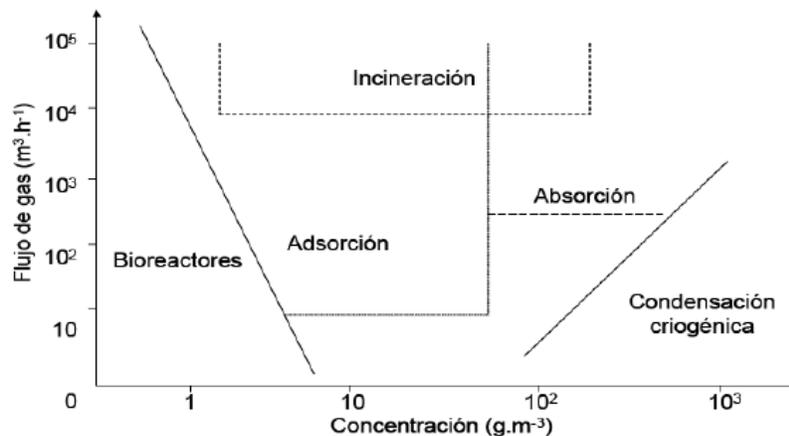


Figura 1. Aplicación de tecnologías con procesos fisicoquímicos y biológicos para el tratamiento de emisiones gaseosas según el flujo del efluente y concentración del contaminante (Kennes y Vega, 2001).

Las tecnologías que involucran procesos biológicos son amplias y la diferencia entre cada una de ellas consiste en la configuración del reactor y las condiciones de operación, que dependen del contaminante a eliminar, la escala de operación y los microorganismos que serán empleados.

En general, los biofiltros son la configuración de reactor más utilizada para la biodegradación de COV presentes en efluentes gaseosos de origen industrial. En

este tipo de reactor se tiene un lecho empacado de material inerte orgánico o inorgánico (e.g. grava, arena, vermiculita, etc.), sobre el cual los microorganismos forman una biopelícula. El mecanismo consiste en hacer pasar una corriente de aire contaminada de forma ascendente o descendente a través del lecho empacado para que los COV sean sorbidos por la biopelícula, y por lo tanto, sean consumidos por los microorganismos (Jiménez y Villegas, 2005; Mudliar *et al.*, 2010). Los biolavadores son otra configuración de reactor que se utiliza ampliamente para el mismo propósito. En este sistema, se tiene una fase líquida en la que se lleva a cabo la biodegradación, debido a que los COV son absorbidos y los microorganismos se encuentran como biopelículas suspendidas (Bajpai, 2014).

Existen dos limitaciones principales en el uso de procesos biológicos para la eliminación de COV en efluentes gaseosos (Daugulis, 2001; Sempere *et al.*, 2011). La primera consiste en que la mayoría de los COV son hidrofóbicos, por lo que su absorción en medios acuosos es muy baja. La segunda limitación implica que los COV son inhibitorios o tóxicos para los microorganismos a altas concentraciones. Para superar estas limitaciones se ha propuesto el uso de biorreactores de partición utilizando fases no acuosas como vectores de transferencia de masa. Lo anterior, ayudaría a extender el umbral de aplicación de los procesos biológicos para tratar COV a concentraciones más elevadas que 10 g/m^3 (Figura 1).

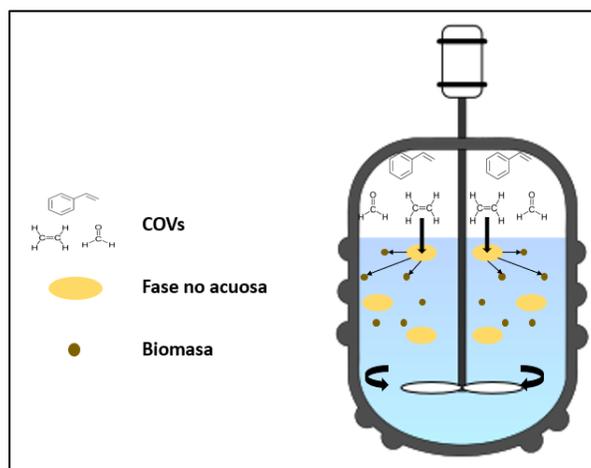


Figura 2. Representación de un biorreactor de partición para el tratamiento de COV hidrofóbicos.

2.2.1 Biorreactores de partición para la eliminación de COV

Los biorreactores de partición son reactores que consisten en añadir una fase no acuosa para que actúe como reservorio del contaminante hidrofóbico (Muñoz *et al.*, 2012). El contaminante que se encuentra en la fase gaseosa se absorberá en gran proporción en la fase no acuosa. Posteriormente, a través de un gradiente de concentración, el contaminante se transferirá de manera gradual hacia el medio acuoso, donde se encuentran los microorganismos. De esta manera, se aumenta la velocidad de transferencia de masa, y por lo tanto, la velocidad de consumo del contaminante por los microorganismos (Figura 2). Además, este mecanismo también reduce el riesgo de que los microorganismos sean inhibidos o intoxicados por los contaminantes, ya que la fase no acuosa actúa como un reservorio de estos, lo que provoca que las concentraciones en el medio acuoso no sean altas.

Tabla 2. Efecto de la adición de una fase no acuosa en la capacidad de eliminación y eficiencia de remoción para el tratamiento de COV hidrofóbicos.

COV	NAP	Sin fase no acuosa		Con fase no acuosa		Referencia
		CE	ER	CE	ER	
Benceno	Hexadecano	10.2-44.3	7-31	133	95	Davidson y Daugulis (2003)
Hexano	Aceite de silicona	7	12	135	70	Muñoz <i>et al.</i> (2006)
Hexano	Aceite de silicona	50	-	120	67	Arriaga <i>et al.</i> (2006)
α -pineno	Aceite de silicona	-	30-40	608	99	Montes <i>et al.</i> (2012)
Diclorometano	Aceite de silicona	160	-	200-350	-	Bailón <i>et al.</i> (2008)
Estireno	Aceite de silicona	137	-	426	-	René <i>et al.</i> (2011)
Estireno	Aceite de silicona	17.7	41	30.8	71	San-Valero <i>et al.</i> (2017)

CE = Capacidad de eliminación (g/m³h); ER = Eficiencia de remoción (%)

Diversos autores han reportado un incremento de hasta 20 veces en la capacidad de eliminación y la eficiencia de eliminación cuando se utilizan biorreactores de partición para el tratamiento de COV hidrofóbicos (Tabla 2). Esto quiere decir, que

la adición de una fase no acuosa como el aceite de silicona puede reducir el tiempo de degradación de un contaminante hidrofóbico y aumentar el consumo del sustrato puesto que hay una mayor solubilidad de este en el medio líquido.

Para mejorar la eficiencia de los biorreactores de partición, la selección de una adecuada configuración de reactor y fase no acuosa es relevante.

La configuración del biorreactor de partición influye en la eficiencia con la que se lleva a cabo la biodegradación, así como en el costo de operación y mantenimiento a nivel industrial (Bajpai, 2014). Al respecto, se han realizado diversos estudios que evalúan el potencial de diferentes configuraciones de reactor para ser aplicados a gran escala. Los tanques agitados operados en lote y en continuo a escala laboratorio han sido los primeros sistemas en ser evaluados para la degradación de COV en un biorreactor de partición. En este contexto, se han obtenido eficiencias y capacidades de biodegradación alrededor de 97% y 500 g/m³h, respectivamente, lo cual es alto respecto a cuando no se usan fases no acuosas y otras configuraciones como los reactores de lecho empacado o lecho escurrido (Aalam *et al.*, 1993; Osswald *et al.*, 1996; René *et al.*, 2011; San-Valero *et al.*, 2011). Sin embargo, se considera que un biorreactor de partición con configuración de tanque agitado no es viable escalarlo a nivel industrial puesto que se requiere una gran cantidad de fase no acuosa, lo cual incrementa el costo, y además son sistemas poco resilientes a las altas y variadas cargas de contaminante en el efluente (San-Valero *et al.*, 2017). Por lo anterior, muchas investigaciones recientes se han enfocado en evaluar otras configuraciones más fácilmente escalables para operar un biorreactor de partición. Por ejemplo, Parnian *et al.* (2016) y San-Valero *et al.* (2017) han propuesto utilizar biofiltros percoladores con aceite de silicona como fase no acuosa para tratar vapores de estireno. Al respecto, han encontrado que la eficiencia de remoción fue aproximadamente 40% más alta que cuando no se agrega fase no acuosa. Adicionalmente, se obtuvo que la carga de entrada crítica fue dos veces mayor que la obtenida en un biofiltro percolador convencional.

Por otra parte, la fase no acuosa en los biorreactores de partición debe cumplir ciertos requerimientos como (Quijano *et al.*, 2010): ser biocompatible, no ser biodegradable, tener alta afinidad con el compuesto objetivo, tener baja tendencia a formar emulsiones, no ser tóxico para los microorganismos, estar disponible en grandes cantidades, tener bajo costo, ser inmisible en agua, tener baja presión de vapor, tener baja viscosidad, poseer una densidad diferente a la del agua, ser inodoro y tener buenas características hidrodinámicas.

Las fases no acuosas más estudiadas para los biorreactores de partición son solventes orgánicos como el n-hexadecano, perfluorocarbonos y aceites de silicona (polidimetilsiloxanos), los cuales han mostrado altos incrementos en el transporte de masa de los COV (Quijano *et al.*, 2009; Rocha-Ríos *et al.*, 2011). Además de las fases no acuosas líquidas, también se han probado polímeros sólidos que exhiben una alta afinidad a los COV. Sin embargo, su uso en biorreactores de partición reduce las eficiencias de biodegradación, mientras que para las fases no acuosas líquidas, estas eficiencias siempre son mayores (Hernández *et al.*, 2010). Esto se debe a que las fases no acuosas sólidas tienen una baja área interfacial, baja difusividad y son altamente humectables, lo que limita la transferencia de masa (Ruthiya *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2007).

Aunque se han evaluado diferentes fases no acuosas en biorreactores de partición para la biodegradación de COV, aún hay ciertas características de ellas que restringen su uso a nivel industrial. Por ejemplo, los perfluorocarbonos son altamente volátiles y los n-hexadecanos son biodegradables por los microorganismos (Arriaga *et al.*, 2006; Toft *et al.*, 2006). Al respecto, muchos autores han coincidido con el hecho de que, hasta ahora, el aceite de silicona es la única fase no acuosa que cumple con la mayoría de los requerimientos para que la degradación de COV sea efectiva en biorreactores de partición, aunque aún existen problemas operacionales como la formación de espuma y la adhesión a las partes internas del reactor (Dumont *et al.*, 2011).

Actualmente, los líquidos iónicos se están evaluando como una alternativa al aceite de silicona. Los líquidos iónicos resultan prometedores debido a que muchos de ellos han mostrado una alta afinidad y absorción por los COV, pueden ser reciclados y no son biodegradables (Muñoz *et al.*, 2012). Sin embargo, son sustancias altamente costosas, pueden resultar tóxicas o inhibitorias para los microorganismos y algunos son solubles en agua (Muñoz *et al.*, 2012). Por esta razón se están explorando diferentes líquidos iónicos que cumplan con la mayoría de los requerimientos mencionados anteriormente para ser utilizados en biorreactores de partición (Quijano *et al.*, 2011).

2.2.1.1 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos son sales orgánicas fundidas que poseen puntos de fusión igual o menores a 100 °C y existen como líquidos a temperaturas relativamente bajas (Karunanithi y Farahipour, 2016). Estas sustancias son denominadas “solventes verdes” debido a su potencial para sustituir los solventes orgánicos volátiles utilizados en la industria, los cuales son una fuente importante de contaminantes atmosféricos. Esto es posible debido a que los líquidos iónicos tienen una despreciable presión de vapor a temperaturas menores de 400 °C, así como una alta termoestabilidad (Quijano *et al.*, 2011). Sin embargo, si los líquidos iónicos fueran vertidos accidentalmente en ecosistemas terrestres o acuáticos, podrían causar un efecto tóxico en la biota que ahí habita, extendiendo la problemática hasta los humanos, ya que no son biodegradables (Oliveira *et al.*, 2016). En este sentido, es importante reducir este riesgo con la recuperación y correcta disposición de los líquidos iónicos utilizados.

Desde su descubrimiento en 1914, los líquidos iónicos han sido evaluados para diferentes aplicaciones potenciales en la industria, de las cuales se pueden destacar: electrolitos de baterías, pretratamiento de biomasa para la producción de biocombustibles, medio colector de energía térmica, medio de reacción para síntesis

química, captura y secuestro de CO₂, propelentes, separación de compuestos aromáticos y alifáticos, etc. (Karunanithi y Farahipour, 2016).

En el área biotecnológica, ha crecido el interés de utilizar los líquidos iónicos como fases no acuosas en reactores de partición para la biodegradación de contaminantes de naturaleza hidrofóbica, especialmente COV (Tabla 3). Por ejemplo: Baumann *et al.* (2005) probaron diferentes líquidos iónicos de fosfonio para la biodegradación de fenol en un biorreactor de partición; Quijano *et al.* (2013) evaluaron el efecto de los líquidos iónicos en la absorción y biodegradación de una mezcla de COV utilizando un biorreactor de partición inoculado con lodo activado y Nguyen *et al.* (2017) utilizaron un líquido iónico hidrofóbico como fase no acuosa para la biodegradación de tolueno en un biorreactor de partición. De estos estudios, se puede concluir que algunos líquidos iónicos tienen una igual o mayor capacidad para absorber ciertos tipos de COV comparados con fases no acuosas convencionales como el aceite de silicona y el n-hexadecano, por lo que tienen un alto potencial para ser evaluados en biorreactores de partición.

Tabla 3. Comparación de los coeficientes de partición de diferentes COV en fases no acuosas convencionales y líquidos iónicos

COV	Fase no acuosa convencional		Líquido iónico		Referencia
	Nombre	P _{ac/NAP}	Nombre	P _{ac/IL}	
Tolueno	Aceite de silicona	0.00064	[C4mim][NTf2]	0.00061	Quijano et al. (2011)
			[Octlq][NTf2]	0.00022	Rodríguez et al. (2018)
			[AllylEt25][NTf2]	0.000356	Rodríguez et al. (2018)
Dimetildisulfuro	Aceite de silicona	0.00093	[C4mim][PF6]	0.0013	Quijano et al. (2011)
			[C4mim][NTf2]	0.00125	Quijano et al. (2013)
Dimetilsulfuro	Hexadecano	0.0088	[C4mim][NTf2]	0.009	Quijano et al. (2011)

P_{ac/NAP} = coeficiente de partición fase acuosa/fase no acuosa (adimensional)
P_{ac/IL} = coeficiente de partición fase acuosa/líquido iónico (adimensional)

En este trabajo se seleccionó el líquido iónico Tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio compuesto por un catión de tipo imidazolio y un anión de fluorofosfato (Figura 3). La razón de esto es que es un líquido iónico que presenta una alta estabilidad térmica y es potencialmente adecuado para la absorción de hidrocarburos aromáticos, como el estireno (Ignat'ev *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2009; Ge y Lee, 2015). Además, no ha sido probado en procesos biológicos, por lo que se quiere explorar su uso como fase no acuosa en biorreactores de partición.

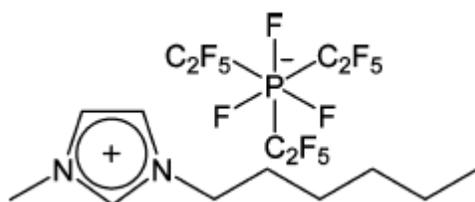


Figura 3. Estructura química del líquido iónico Tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([C₆mim][FAP]).

2.3 Valorización de COV en la producción de polihidroxicanoatos

Los COV pueden ser biodegradados hasta una mineralización parcial o completa. Sin embargo, esto resulta poco atractivo para el sector industrial, debido a que es una alta inversión que no genera ganancias económicas, aunado a que no hay un interés de tratar los efluentes gaseosos por parte de los empresarios, debido a la escasa legislación que hay al respecto en países como México. Por esta razón, se ha propuesto utilizar el concepto de biorrefinería para la valorización de COV de origen industrial. Este concepto consiste en la utilización de materias primas renovables, que pueden ser residuos, para la obtención de productos y subproductos de alto valor agregado tales como biocombustibles, biopolímeros, compuestos de interés cosmético o farmacéutico, etc (Ohara, 2003). En la actualidad, la materia prima renovable más utilizada es la biomasa proveniente de fuentes agroindustriales. Sin embargo, se ha visto que algunos COV y otros compuestos presentes en efluentes gaseosos industriales pueden ser utilizados como sustrato para la obtención de productos de alto valor agregado (Mooney *et al.*, 2006; Kusumawardhani *et al.*, 2018). Por ejemplo, Cantero *et al.* (2018)

evaluaron la producción de ectoína, polihidroxicanoatos (PHA) y exopolisacáridos acoplado al tratamiento biológico de emisiones diluidas de CH₄; Rojas-Llanes (2009) estudió la biotransformación de monoterpenos (geraniol y α -pineno) a verbenona, la cual es una sustancia que se encuentra de manera natural en las plantas, utilizada para el control de plagas de escarabajo; Hori *et al.*, (2009) reportaron que una cepa novedosa (*Rhodococcus aetherivorans* IAR1) tiene la capacidad de sintetizar PHA a partir de la biodegradación de tolueno; Abubackar *et al.* (2010) llevaron a cabo la bioconversión de gas de síntesis (CO₂, CO, H₂) a ácidos grasos y alcoholes; Ruiz-Valencia *et al.* (2019) evaluaron la bioconversión de CO₂ a formato, el cual es un precursor para la producción de metanol; Tan *et al.* (2015) probaron nuevas cepas bacterianas que fueron capaces de convertir el estireno a PHA, determinando que la cepa *Pseudomonas putida* NBUS12 fue la que obtuvo una mayor acumulación del biopolímero (32% p/p) De esta manera, emplear el concepto de biorrefinería para el tratamiento biológico de efluentes gaseosos puede ayudar a la mitigación de estos contaminantes a través de procesos más sustentables.

Como antecedente a este estudio, en nuestro grupo de investigación se hizo un estudio de la biodegradación de vapores de metanol en biofiltros de lecho empacado acoplada a la producción de endoquitinasa Ech42 utilizando una cepa mutante de *Pichia pastoris* (Arriaga *et al.*, 2012; Palomo-Briones *et al.*, 2015). La carga de entrada de metanol fue de 1465 g/m³h y se obtuvo una capacidad de eliminación máxima de 1320 g/m³h. Del lixiviado del biofiltro se obtuvo 2369 μ g/h de proteína extracelular con una actividad de endoquitinasa de 123 U/L. Los resultados de esta investigación fueron prometedores para la valorización de vapores de metanol a partir de la producción de proteínas recombinantes. Este hecho da la pauta para aprovechar tal conocimiento y obtener otros compuestos de interés industrial, como los PHA, que son el objeto de estudio del presente trabajo, utilizando estireno como fuente de carbono y biorreactores de partición como estrategia de producción.

Los PHA son poliésteres producidos de manera intracelular por microorganismos procariotas (eubacteria y arquea), bajo condiciones donde la fuente de carbono está

en exceso y los nutrientes (nitrógeno o fósforo) son limitantes (García *et al.*, 1999). Son considerados como material de reserva de carbono y energía para los microorganismos (Kessler y Witholt, 2001). Usualmente, estos polímeros tienen un peso molecular entre 10-1000 kDa, aunque se han reportado cadenas de poli[3-hidroxi butirato] (PHB) de hasta 20,000 kDa (Kusaka *et al.*, 1997; Kim y Lenz, 2001). Esto depende de la especie de microorganismos que produzca el polímero, de las condiciones del cultivo (*e.g.* pH), así como del tipo y concentración de la fuente de carbono (Anderson *et al.*, 1992).

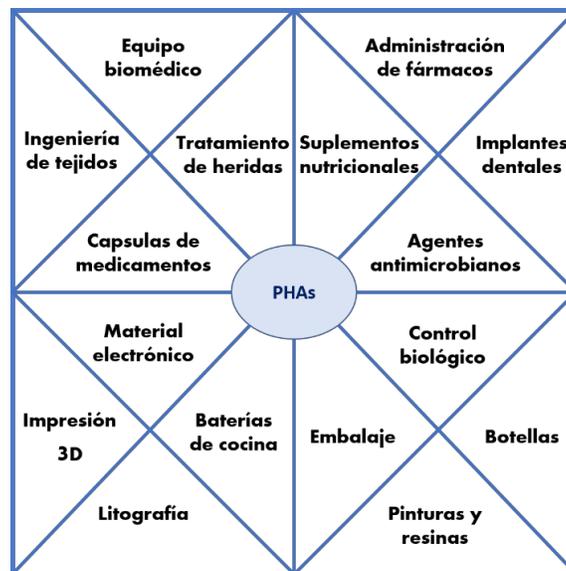
El primer PHA identificado fue el PHB, el cual se obtuvo partir de la fermentación de ácido β -oxibutirico por *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Posteriormente, se publicó la existencia de otras unidades monoméricas (*i.e.* ácidos hidroxialcanoicos) de PHA, como el 3-hidroxi valerato y el 3-hidroxi hexanoato, las cuales fueron detectadas en lodos de agua residual (Wallen y Rohwedder, 1974). En la actualidad, se conocen más de 150 monómeros de PHA producidos por más de 90 especies de microorganismos (Steinbüchel, 2001).

Los PHA son clasificados según el número de carbonos que posea su unidad monomérica: los PHA de cadena corta incluyen monómeros conformados con 3 a 5 átomos de carbonos; los PHA de cadena media tienen monómeros constituidos a de 6 a 14 átomos de carbono; y los PHA de cadena larga presentan monómeros que parten de 15 átomos de carbono en adelante. Esta diferencia en la longitud de los monómeros influye en las propiedades del polímero en general, tales como la hidrofobicidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y grado de cristalinidad (Kalia, 2019).

En la actualidad, los PHA se emplean principalmente en la medicina como micro y nano esferas para la administración controlada de fármacos, manejo de heridas, dispositivos del sistema cardiovascular, ortopedia, etc. (Chen *et al.*, 2005; Kalia, 2019). El éxito que tienen los PHA en la medicina se debe a su naturaleza biocompatible, es decir, no se genera ningún compuesto tóxico durante su

degradación en el organismo (Castilho *et al.*, 2009). Además, su costo respecto a los biopolímeros más empleados en la industria biomédica es igual o menor, por lo que es altamente competitivo en el mercado. Por ejemplo, el poli (ácido láctico) tiene un costo que oscila de 3 a 10 \$USD/kg, mientras que los PHA varían de 5 a 15 \$USD/kg (Fu *et al.* 2014; Giaroli y Maggioni, 2015).

Los PHA también son polímeros prometedores para sustituir los plásticos derivados del petróleo. Esto es porque los PHA pueden ser biodegradados, al punto de alcanzar una mineralización completa (CO₂ y H₂O), por una amplia gama de microorganismos distribuidos en la naturaleza (Lee, 1996). Sin embargo, su aplicación a gran escala está limitada porque los costos para producirlos son más altos que los costos para la producción de plásticos derivados del petróleo. Un kilogramo de plástico convencional tiene un costo menor a un dólar, lo cual es mucho menor que el costo de los PHA (Fu *et al.*, 2014). La principal causa del elevado precio de los PHA es el costo del sustrato que actúa como fuente de carbono. Por esta razón, diversos autores proponen que el uso de residuos industriales puede ser una alternativa para reducir el precio de los PHA, con la finalidad de que sea más competitivo en el mercado (Castilho *et al.*, 2009).



Elaborado a partir de: Kalia (2019)

Figura 4. Aplicaciones de los PHA en diferentes sectores industriales.

Los PHA cuentan con muchas otras posibles aplicaciones, que se están evaluando para ser desarrolladas a gran escala. Dentro de las aplicaciones más importantes se destacan el tratamiento de heridas, implantes dentales, ingeniería de tejidos, fabricación de embalaje, entre otros que se encuentran resumidos en la Figura 4.

La bioconversión de COV a PHA puede ser llevada a cabo por ciertos grupos de microorganismos que requieren condiciones de estrés inducido por la limitación de nutrientes. Al respecto, las especies del género *Pseudomonas* han mostrado un buen desempeño para ello. En la Tabla 4 se resumen algunos microorganismos que cuentan con esta capacidad metabólica.

Tabla 4. Microorganismos que degradan COV y producen PHA

Microorganismo	PHA	Fuente de Carbono	Referencia
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b PP358	PHB	Tricloroetileno	Fitch <i>et al.</i> (1996)
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	mcl-PHA	Octadecano	Sabirova <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	mcl-PHA	Tolueno, p-xileno	Nikodinovic <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	mcl-PHA	Tolueno, benceno,	Nikodinovic <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas putida</i> CA-3	mcl-PHA	Estireno, ácido fenilacetico	Ward <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 29347	PHA	Alcanos (C ₈ -C ₁₂)	Lageveen <i>et al.</i> (1988)

Los biorreactores de partición pueden ser potencialmente adecuados para llevar a cabo la bioconversión de COV a PHA. Esto se debe a que el transporte de masa es mayor, y por lo tanto, el consumo y la producción de PHA también son altos. Por ejemplo, Zúñiga-Peña (2010) realizó un estudio en donde evaluó la bioconversión de metano a PHA en biorreactores de partición utilizando una cepa microbiana pura (*Methylobacterium organophilum*) y aceite de silicona como fase no acuosa (Zuñiga-Peña, 2010). Como resultado, la bioconversión de metano a PHA fue favorecido por

la adición del aceite de silicona. Esto da indicios de que el uso de biorreactores de partición para la producción de PHA a partir de compuestos gaseosos hidrofóbicos, como son algunos COV, puede ser potencialmente adecuado.

2.4 Estireno

El estireno (C_8H_8), también conocido como vinil benceno, es un hidrocarburo cíclico que se estructura de un solo anillo bencénico y un grupo eteno, cuyo peso molecular es de 104.15 g/mol (Luttrell y Willis, 2011). En su forma pura, este compuesto es un líquido aceitoso incoloro o amarillento que se evapora fácilmente y presenta un olor dulce (ATSDR, 2010).

Las principales fuentes de emisión del estireno son antropogénicas, mientras que las fuentes biogénicas contribuyen en menor medida. Al respecto, el estireno es emitido por actividades industriales como la manufactura de plásticos, resinas y cauchos, así como por el uso de solventes en la industria automotriz y farmacéutica (Alexander, 1998). De igual manera, el tráfico vehicular emite importantes cantidades de estireno, derivado de la combustión incompleta de la gasolina (Henderson y Speit, 2005). Por otra parte, el uso de productos domésticos de limpieza e higiene personal es una importante fuente no industrial de estireno, y aporta niveles altos de concentración de este contaminante en ambientes de interiores (ATSDR, 2010).

Entre los COV, el estireno es uno de los contaminantes más abundantes en la mezcla de gases, y también es uno de los que causa más problemas de salud a la población, principalmente a aquella que pasa la mayor parte de su tiempo diario en ambientes de interiores (e.g. escuelas, oficinas, casa, hospitales, etc.) o que trabaja en la industria del plástico y resinas (Rueff *et al.*, 2009). Esta población entra en contacto con el estireno principalmente por la inhalación de vapores, aunque también puede ser por ingestión de agua y alimentos. Sin embargo, se han reportado bajos niveles de concentración en estos últimos medios (Parod, 2014).

La inhalación de vapores de estireno conlleva principalmente a enfermedades respiratorias con diferentes efectos según el grado de exposición: irritación de la mucosa nasal y del tracto respiratorio superior, incremento de secreción nasal, cambios pulmonares obstructivos, inhibición del sistema oculomotor vestibular, desempeño deteriorado en pruebas de equilibrio y coordinación, disminución de la capacidad para la discriminación de colores, pérdida de la audición, etc. (Stewart *et al.*, 1968; Kishi *et al.*, 2001; Śliwińska-Kowalska *et al.*, 2003).

El estireno es considerado un contaminante importante para ser eliminado de los efluentes gaseosos. En general, las tecnologías que involucran procesos biológicos se han destacado para conseguir tal objetivo. En este sentido, los biofiltros son la principal configuración de reactor que ha sido implementado a nivel industrial (Mooney *et al.*, 2006). Esto se debe a que los biofiltros han demostrado ser una tecnología efectiva y económica con requerimientos mínimos de energía y baja producción de residuos. Al respecto, los biofiltros percoladores son los que han tenido un mayor auge, porque son, hasta ahora, la configuración más eficiente para operar un biorreactor de partición a gran escala (Jang *et al.*, 2005).

Debido a su naturaleza moderadamente hidrófoba, el estireno tiene una baja solubilidad en medios acuosos. Esto implica, que en los procesos biológicos, en donde los microorganismos se encuentran suspendidos en medios acuosos, una fracción de los vapores de estireno permanecen en el espacio de cabeza y otra fracción en el líquido. Adicionalmente, a través del tiempo, la transferencia del estireno desde el espacio de cabeza hacia el medio líquido va ocurriendo conforme el estireno disuelto se va degradando. Lo anterior indica, que la velocidad en el que ocurre este transporte de masa está limitada por la solubilidad del estireno en el medio líquido. Por esta razón, estudios recientes han evaluado el uso de biorreactores de partición con aceite de silicona para mejorar la biodegradación de estireno. Estas investigaciones han reportado que la adición de aceite de silicona puede incrementar hasta 20 veces la capacidad de eliminación. Por ejemplo: San-Valero *et al.* (2017) registraron un incremento de la capacidad de eliminación de

17.7 a 30.8 g/m³h en un biofiltro percolador utilizando un inóculo de lodos activados y 5% v/v de aceite de silicona. Rene *et al.* (2011a) obtuvieron un aumento de la capacidad de eliminación de 137 a 426 g/m³h en un tanque agitado operado en continuo con 10% v/v de aceite de silicona utilizando al hongo *Sporothrix variecibatus* como inóculo. Zamir *et al.* (2015) reportaron un incremento de la capacidad de eliminación de 70 a 110 g/m³h en un biofiltro percolador utilizando 5% v/v de aceite de silicona como fase no acuosa y un inóculo de *Ralstonia eutropha*; Rene *et al.* (2011b) determinaron un aumento de la capacidad de eliminación de 172.8 a 670 g/m³h en un biofiltro percolador utilizando el hongo *S. variecibatus* como inóculo y 2% v/v de aceite de silicona como fase no acuosa. De estos estudios se puede concluir que la biodegradación de estireno por hongos y bacterias puede ser mejorada en biorreactores de partición utilizando 2, 5 y 10 % v/v de aceite de silicona como fase no acuosa.

Tabla 5. Microorganismos que degradan estireno

Clase	Género	Especies	Referencia
Bacteria			
Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Itoh <i>et al.</i> (1996)
	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. vaccae</i>	Burback y Perry (1993)
	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. pyridinovorans</i>	Jung y Park (2005)
		<i>R. opacus</i> <i>R. jostii</i>	Oelschlagel <i>et al.</i> (2012) Patrauchan <i>et al.</i> (2007)
α-Proteobacteria	<i>Methylosinus</i>	<i>M. trichosporium</i>	Higgins <i>et al.</i> (1979)
β-Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. europaea</i>	Keener y Arp (1994)
γ-Proteobacteria	<i>Methylococcus</i>	<i>M. capsullatus</i>	Colby <i>et al.</i> (1977)
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>	Baggi <i>et al.</i> (1983)
<i>P. aeruginosa</i>		Rustemov <i>et al.</i> (1992)	
<i>P. putida</i>		Ikura <i>et al.</i> (1997)	
<i>P. mendocina</i>			
Hongos			
Eurotiomycetos	<i>Exophiala</i>	<i>E. jeanselmei</i>	Cox <i>et al.</i> (1993)
	<i>Penicillium</i>	<i>P. simplicissimum</i>	de Jong <i>et al.</i> (1990)
Sordariomycetes	<i>Sporothrix</i>	<i>S. variecibatus</i>	René <i>et al.</i> (2010)

La biodegradación de estireno puede ser llevada a cabo por una variedad de microorganismos, especialmente por especies del género *Pseudomonas*, dentro de las cuales se destacan a *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina* y *P. aeruginosa* (O'Leary *et al.*, 2002).

En la actualidad, se han encontrado otros géneros de bacterias que tienen la capacidad de degradar estireno, e incluso, una variedad de hongos ha sido reportado para el mismo propósito (Tabla 5).

Algunos de los microorganismos que degradan el estireno tienen la capacidad de llevar a cabo su bioconversión a PHA bajo condiciones limitantes de nutrientes. En estudios recientes, se han reportado nuevas cepas aisladas de la naturaleza, que tienen esta capacidad metabólica y se han comparado entre sí (Tabla 6). Por ejemplo: Arshad *et al.* (2017) aislaron diferentes cepas de *Enterobacter* spp. de un suelo contaminado por hidrocarburos, las cuales fueron capaces de acumular PHAs a partir de la utilización de estireno como única fuente de carbono; Goff *et al.* (2007) implementó una estrategia de alimentación de la fuente de nitrógeno en un reactor de tanque agitado para mejorar la producción de PHA a partir de estireno; Tan *et al.* (2015) evaluó la bioconversión de estireno a PHA a partir de una nueva cepa aislada (*P. putida* NBUS12) obteniendo una acumulación del 32% de la biomasa celular en peso seco. Algunos autores mencionan, que este porcentaje de acumulación es potencialmente adecuado para que el proceso sea económicamente viable (Zúñiga *et al.* 2011). No obstante, un balance global que incluya costos de tratamiento, operación y mantenimiento es necesario para asegurar tal afirmación, por lo que puede ser relativo.

El uso de cepas puras para el tratamiento biológico de efluentes biológicos a gran escala presenta la limitación de que son procesos más costosos. Esto es, porque se requieren sistemas de filtración de aire en la entrada para mantener corrientes estériles y sin impurezas, para evitar la colonización del soporte con microorganismos externos que puedan competir con la cepa pura. Esta situación

finalmente aumentaría el riesgo de que la cepa sea desplazada por otros microorganismos y que los rendimientos de la biodegradación disminuyan. A pesar de ello, cuando se quiere producir algún producto de valor agregado en específico como los PHA, el uso de cepas puras podría resultar más conveniente. Además, si el efluente gaseoso presenta una proporción mayor al 90% del contaminante objetivo, la posibilidad de que ocurra un desplazamiento sería mucho menor, pues la fuente de carbono sería muy específica, sobre todo, tomando en cuenta que los COV no son un sustrato que puedan ser degradados con facilidad por muchos microorganismos y que muchos microorganismos no son tolerantes a estos compuestos. Este sería el escenario si se consideran las emisiones de la fabricación de plásticos, resinas y caucho sintético, en donde el compuesto en mayor proporción es el estireno. En este estudio, todo el trabajo se llevará a cabo en condiciones estériles y con estireno como única fuente de carbono para la prueba de concepto. Sin embargo, se tiene la perspectiva de que en un trabajo futuro se evalúen escenarios con una composición real de la corriente de entrada y sin esterilidad, para conocer el efecto de esto en la población de la cepa original y el rendimiento en la conversión de estireno a PHA en biorreactores de partición.

Tabla 6. Acumulación de polihidroxialcanoatos por diferentes cepas utilizando estireno como fuente de carbono.

Microorganismo	Escala	PHA (p/p)	Referencia
<i>Enterobacter</i> spp.	Laboratorio	30.6	Arshad <i>et al.</i> (2017)
<i>Pseudomonas putida</i> NBUS12	Laboratorio	32	Tan <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas putida</i> CA-3	Tanque agitado	30	Goff <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas putida</i> S12	Laboratorio	20	Tobin y O'Connor (2005)

3. JUSTIFICACIÓN

El estireno es un contaminante emitido en abundancia por la industria química durante la fabricación de plástico reforzado, caucho sintético y resinas. Estas actividades industriales utilizan 15 millones de toneladas de estireno por año, de las cuales, aproximadamente el 20 % es residual (Tan *et al.* 2015). En el mejor de los escenarios, el 60% del estireno residual es reciclado y el 20% es liberado al medio ambiente, pero en países como México, casi el 100% es liberado. La eliminación de este contaminante es importante debido a que puede causar enfermedades en el sistema respiratorio y el sistema nervioso central, además de que ha sido reconocido como un posible carcinógeno. Para ello, los procesos biológicos han mostrado ser una buena alternativa puesto que son menos costosos y más amigables con el medio ambiente comparado con otras tecnologías. A pesar del constante desarrollo de estos sistemas de tratamiento, su aplicación a gran escala en países como México se ha visto limitada por la incipiente legislación para regular el tratamiento de efluentes gaseosos industriales y por la nula ganancia económica que reciben los empresarios que realizan las inversiones. Por esta razón, en este trabajo se propone que en lugar de llevar a cabo una biodegradación convencional, en donde el estireno se convierte principalmente en CO₂, agua y biomasa, las emisiones residuales de estireno sean utilizadas como sustrato para la generación de productos de alto valor agregado, tales como los polihidroxicanoatos, los cuales son un grupo de biopolímeros competitivos en el mercado y con una amplia gama de aplicaciones en la industria biomédica. Con la finalidad de aumentar la transferencia de masa del estireno a la fase líquida y reducir el riesgo de intoxicación o inhibición de los microorganismos con el estireno, se utilizarán biorreactores de partición en lote. Para ello se evaluará un líquido iónico compuesto por un catión de imidazolio y un anión de fluorofosfato y se comparará con el aceite de silicona para conocer cuál es la fase no acuosa más adecuada. El líquido iónico que se utilizará ha sido reportado como una sustancia muy afín a los COV hidrofóbicos y su interacción en procesos biológicos no ha sido evaluada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Valorizar las emisiones de estireno a partir de la conversión biológica de estireno a polihidroxicanoatos por *Pseudomonas putida* S12 en reactores de partición, evaluando el uso de aceite de silicona y líquidos iónicos como fases no acuosas.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar los coeficientes de partición del estireno en el aceite de silicona, el líquido iónico y sus mezclas con medio mineral al 5% v/v para conocer su afinidad por el compuesto objetivo.
- Determinar la biodegradabilidad, efecto inhibitorio y toxicidad del aceite de silicona y líquido iónico para evaluar si su interacción con *P. putida* S12 es perjudicial.
- Evaluar el efecto de la adición de una fase no acuosa en la bioconversión de estireno a polihidroxicanoatos en un reactor de partición en lote.

5. HIPÓTESIS

Debido a que el estireno es hidrofóbico, la adición de fases no acuosas hidrofóbicas como el aceite de silicona y el líquido iónico seleccionados en este estudio, aumentará el transporte de estireno desde el espacio de cabeza hacia el medio líquido en donde se encuentren los microorganismos.

Si la adición de fases no acuosas reduce el tiempo de biodegradación del estireno, esto también reducirá el tiempo de producción de polihidroxialcanoatos cuando la cepa seleccionada se encuentre bajo un factor de estrés, específicamente, limitación de la fuente de nitrógeno.

6. METODOLOGÍA

Todos los procedimientos que a continuación se describen y que requieren la manipulación de la cepa seleccionada, fueron llevados a cabo en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación con algún microorganismo diferente. Para ello, el material de laboratorio y los medios de cultivo se esterilizaban en una autoclave a 121 °C por 20 minutos y se utilizaba una campana de flujo laminar para poner en marcha los procedimientos, así como los experimentos.

6.1 Propagación y crecimiento de la cepa

La cepa bacteriana que se utilizó corresponde a *Pseudomonas putida* S12 y se obtuvo del cepario American Type Culture Collection (ATCC ® 700801™). Se seleccionó esta cepa porque ha sido reportada como degradadora de estireno y acumuladora de polihidroxicanoatos, así como tolerante a los solventes orgánicos (Mooney *et al.*, 2006; Garikipati y Peeples, 2015; Crabo *et al.*, 2017).

6.1.1 Propagación de la cepa en medio nutritivo

El medio nutritivo usado tiene una composición por litro de: 5 g de extracto de carne, 10 g de peptona y 5 g de NaCl, con un pH de 7 ± 0.2 ajustado con NaOH o HCl 2M.

La cepa se propagó con el siguiente procedimiento: 1) El liofilizado se reactivó con 0.5 mL de medio nutritivo; 2) La suspensión formada se transfirió a un tubo cónico con 5 mL de medio nutritivo y 3) Se hizo un estriado de la suspensión sobre una caja de Petri que contenía agar bacteriológico (15 g/L) y medio nutritivo a un pH de 7 ± 0.2 . Después de esto se llevó a incubar a 28 °C por 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, la caja de Petri con la cepa fue almacenada en un refrigerador a 6 °C aproximadamente.

Cada mes se sembraba una nueva caja de Petri de la misma composición para conservar la cepa activa durante la ejecución de todos los experimentos subsecuentes. Para ello, se tomaba una colonia de la caja de Petri, se suspendía en un tubo cónico que contenía 5 mL de medio nutritivo y se llevaba a incubar a 28 °C y 140 rpm por 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se hacía un estriado de la suspensión sobre una nueva caja de Petri, se llevaba a incubar a 28 °C por 24 horas y luego se almacenaba en el refrigerado a 6 °C aproximadamente.

6.1.2 Cinética de crecimiento de la cepa en medio nutritivo

Se realizó una cinética de crecimiento con la cepa en medio nutritivo para conocer la duración de la fase exponencial y así establecer el periodo de incubación del preinóculo para garantizar que una gran cantidad de células se encontraran activas en los experimentos subsecuentes. Para ello, se prepararon 10 tubos cónicos de 15 mL por duplicado, los cuales contenían 5 mL de medio nutritivo. A cada uno de los tubos se les suspendió una colonia de la cepa contenida en la caja de Petri y se llevaron a incubar a 28 °C y 140 rpm. Se determinó la concentración de biomasa celular (g/L) para cada 4 horas hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Como resultado se obtuvo una duración de la fase exponencial de 20 horas (ver ANEXO 11.1).

6.1.3 Preparación de inóculos

La preparación de los inóculos fue importante para la realización de todos los experimentos y siempre se llevó a cabo con el procedimiento que a continuación se describe.

Preinóculo

De la caja de Petri que contenía la cepa, se tomaba una colonia, se suspendía en un tubo cónico con 5 mL de medio nutritivo y se llevaba a incubar a 28 °C y 140 rpm

por aproximadamente 10 horas. Se tomaba en cuenta este tiempo porque, siguiendo la cinética de crecimiento de la cepa en medio nutritivo, la mitad de la etapa exponencial era alcanzada en este tiempo, lo que garantizaba una gran cantidad de células vivas activas.

Inóculo

Transcurrido el periodo de incubación del preinóculo, la biomasa se centrifugaba a 3.7 x1000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se decantaba y la biomasa era lavada con agua destilada estéril. La biomasa era nuevamente recuperada por centrifugación para ser suspendida en una botella de vidrio con capacidad de 1 L que contenía 200 mL de medio de cultivo estéril. Una vez que se obtenía esta suspensión con una concentración de biomasa aproximada de 0.1 g/L, se procedía a realizar la inoculación en los experimentos para tener concentraciones iniciales de biomasa de 0.035 a 0.04 g/L.

Se utilizó un medio de cultivo específico para *P. putida* S12 reportado por Nijkamp *et al.* (2007). Su composición por litro fue de: 4.7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.88 g de K_2HPO_4 , 1.63 g de NaH_2PO_4 y 20 mL de medio mineral, con un pH de 7 ± 0.2 ajustado con NaOH o HCl 4N.

El medio mineral tuvo una composición por litro de: 10 g de $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g de EDTA, 0.2 g de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g de $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.01 g de $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

6.1.4 Concentración mínima inhibitoria de estireno para *P. putida* S12

Se hizo un ensayo para determinar una aproximación de la concentración mínima inhibitoria de estireno para la cepa *P. putida* S12. Este ensayo consistió en la preparación de 7 botellas serológicas de 60 mL que contenían 9 mL de medio

mineral y 6 mL de inóculo. Cada una de las botellas fue tapada con válvulas mininert y suministrada con un volumen de estireno diferente (Tabla 7). También se preparó un control que contenía tanto medio mineral como inóculo, pero sin la adición de estireno.

Tabla 7. Concentraciones de estireno evaluadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Estireno	
Volumen (μL)	Concentración en fase gas (g/m³)
1	20
3	61
4	81
6	121
9	182
12	242

Una vez preparado el ensayo, se llevó a incubar a 28 °C y 140 rpm por 48 horas. Terminado el periodo de incubación, se determinó la biomasa total producida.

La concentración mínima inhibitoria correspondió a aquella con la cual, la concentración de biomasa ya no incrementó respecto a las botellas que contenían menor concentración inicial de estireno.

Cabe destacar, que el valor obtenido es una aproximación al valor real, puesto que para conocer este último se tendrían que hacer muchas pruebas con intervalos más pequeños de volúmenes de estireno, lo cual resulta poco práctico.

6.1.5 Parámetros cinéticos de la cepa utilizando estireno como sustrato

Antes de comenzar con los experimentos relacionados a la obtención de los parámetros cinéticos de *P. putida* S12, se determinó la velocidad de agitación adecuada para garantizar que no exista limitación por transporte de masa del estireno desde la fase gas hacia la fase líquida, y por lo tanto, que el proceso solo

esté limitado por la reacción biológica. De esta manera, se pueden obtener los parámetros cinéticos reales. Para ello, se llevaron a cabo dos cinéticas de crecimiento al mismo tiempo, pero con diferente velocidad de agitación (140 y 180 rpm). Cada cinética fue realizada por duplicado en botellas serológicas de 20 mL con válvulas mininert que contenían 3 mL de medio mineral y 2 mL de inóculo. Se inyectó 1 μL de estireno a cada botella para una concentración inicial en el espacio de cabeza de 60.6 g/m^3 y se tuvo una concentración inicial de biomasa de 0.04 g/L . Se incubó a 28 °C con sus respectivas velocidades de agitación y se midió cada dos horas el CO_2 y estireno del espacio de cabeza hasta que se alcanzara la fase estacionaria. De este experimento se encontró que el incremento de la velocidad de agitación de 140 a 180 rpm no modificó la velocidad de consumo del estireno (ver ANEXO 11.3), por lo que se decidió utilizar 140 rpm para las cinéticas subsecuentes.

Siguiendo con la obtención de los parámetros cinéticos de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato, la velocidad específica máxima de crecimiento ($\hat{\mu}$) y la constante de saturación (K_s) se determinaron considerando una cinética de tipo Monod. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento simultaneas por duplicado, con la cepa y una misma concentración inicial de biomasa (0.035 g/L), a diferentes concentraciones de estireno (Tabla 8). Estas concentraciones fueron elegidas de acuerdo con la concentración mínima inhibitoria para la cepa como marco de referencia (ver ANEXO 11.2).

Tabla 8. Concentraciones iniciales de estireno en el espacio de cabeza para la determinación de parámetros cinéticos de *P. putida* S12.

Experimento	Volumen (μL)	Concentración (g/m^3)
A	0.5	10.1
B	1	20.2
C	2	40.4
D	3	60.6
E	4	80.8

Para cada cinética se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con 9 mL de medio de cultivo y 6 mL de inóculo. Todas las botellas fueron cerradas con válvulas

mininert para la inyección de estireno. Una vez suministradas con el estireno, las botellas se llevaron a incubar a 28 °C y 140 rpm. Se midió el estireno y el CO₂ en el espacio de cabeza cada dos horas, y se congeló el medio líquido cada dos horas para la posterior determinación de la concentración de biomasa celular. Todo esto hasta que se alcanzara la fase estacionaria. Cabe destacar que para cada tiempo de medición en las cinéticas, se obtuvieron las mediciones de una sola botella sacrificable. Para cada cinética se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) utilizando el modelo de Gompertz que describe un crecimiento sigmoideal (Arriaga, 2005). Con los datos obtenidos, se realizó una gráfica relacionando la concentración de estireno en el espacio de cabeza en el eje de las abscisas con μ en el eje de las ordenadas, determinando así la $\hat{\mu}$ y la K_s .

Después de determinar la $\hat{\mu}$ y la K_s , se calculó el rendimiento ($Y_{x/s}$) y la velocidad específica máxima de utilización de sustrato (\hat{q}) utilizando las ecuaciones 1 y 2.

Ecuación 1:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

Donde:

$Y_{x/s}$ = Rendimiento de biomasa por unidad de sustrato (g_x/g_s)

X_f = Concentración de biomasa final (g/L)

X_0 = Concentración de biomasa inicial (g/L)

S_0 = Concentración de sustrato inicial (g/m³)

S_f = Concentración de sustrato final (g/m³)

Ecuación 2:

$$\hat{q} = \frac{\hat{\mu}}{Y_{x/s}}$$

Donde:

\hat{q} = Velocidad específica máxima de utilización de sustrato (g_s/g_xh)

$\hat{\mu}$ = Velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹)

$Y_{x/s}$ = Rendimiento de biomasa por unidad de sustrato (g_x/g_s)

6.2 Evaluación de fases no acuosas

Los procedimientos que a continuación se describen se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones para aceite de silicona y líquido iónico por separado. Se hizo de esta forma, para evaluar y contrastar las características de estas sustancias como fases no acuosas y seleccionar la más adecuada para los experimentos subsecuentes.

6.2.1 Coeficientes de partición

La determinación del coeficiente de partición se hizo para el medio mineral, una mezcla de medio mineral con fase no acuosa y la fase no acuosa sola sin mezclar. Para ello se utilizaron botellas serológicas de 20 mL con válvulas mininert, con las cuales se hicieron tres ensayos diferentes: 1) 4 mL de medio mineral, 2) 4 mL de medio mineral con 5% v/v de fase no acuosa (0.2 mL) y 3) 0.5 mL de fase no acuosa. Cada ensayo se hizo por triplicado para diferentes volúmenes de estireno (1, 4, 7 y 10 μL) y se incubó a 28 °C y 140 rpm por 72 horas. Se midió el estireno en la fase gas después de que transcurriera el periodo de incubación, considerando que para este tiempo la concentración de estireno en el espacio de cabeza y el medio líquido se encontraban en equilibrio. La concentración de estireno en el medio líquido se calculó a través de un balance de masa tomando en cuenta la concentración inicial. Se graficó la concentración de estireno en el medio líquido y el espacio de cabeza para obtener una línea recta (Figura 5), de la cual se obtuvo la pendiente, siendo este valor el coeficiente de partición adimensional.

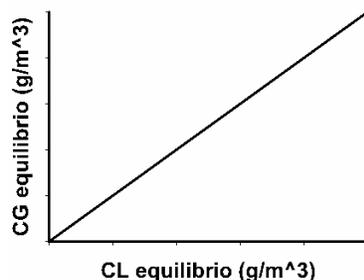


Figura 5. Gráfica para obtener el coeficiente de partición

6.2.2 Biodegradabilidad: Producción de CO₂

Las pruebas de biodegradabilidad de las fases no acuosas se llevaron a cabo en botellas serológicas de 20 mL con válvulas mininert. Se hizo un ensayo por triplicado agregando 5 mL en total de líquido conformado por 3 mL de medio mineral, 1.75 mL de inóculo y 5% v/v de fase no acuosa (0.25 mL); y otro ensayo por triplicado como control de la respiración endógena agregando 3.25 mL de medio mineral y 1.75 mL de inóculo. De igual manera, un último ensayo fue llevado a cabo como prueba testigo para garantizar que el inóculo se encontrara activo durante el experimento, para lo cual, se agregaron 3.25 mL de medio mineral, 1.75 mL del inóculo y 1 µL de estireno como sustrato. Todas las botellas se incubaron a 28 °C y 140 rpm. Se midió la concentración del CO₂ y estireno en el espacio de cabeza a través del tiempo por 30 días para graficar la producción de CO₂ contra el tiempo. Se comparó la producción de CO₂ entre ensayos, con el criterio de que, si el ensayo que contiene la fase no acuosa tiene una igual producción de CO₂ que el control de respiración endógena, entonces la fase no acuosa evaluada no es biodegradable, y si por el contrario, la producción de CO₂ es mayor que el control, entonces es biodegradable (Figura 6).

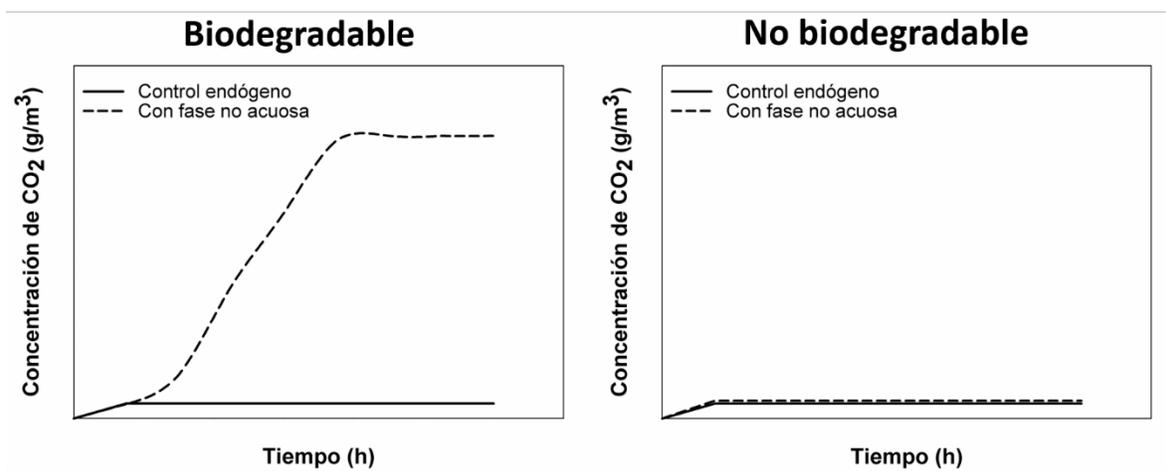


Figura 6. Gráficas que ejemplifican los criterios de biodegradabilidad de la fase no acuosa

6.2.3 Inhibición de *P. putida* S12 en el consumo de estireno

La prueba de inhibición se realizó en botellas serológicas de 20 mL con válvulas mininert. Se hicieron tres ensayos por triplicado agregando 5 mL en total de líquido. En el primer ensayo se agregaron 3 mL de medio mineral, 1.75 mL del inóculo, 5% v/v del fase no acuosa (0.25 mL) y 1 μ L de estireno; en el segundo ensayo (prueba testigo) se agregaron 3.25 mL de medio mineral, 1.75 mL del inóculo y 1 μ L de estireno; y en el tercer ensayo se agregaron 3.25 mL de medio mineral y 1.75 mL del inóculo, sin ninguna fuente de carbono, por lo que representa un experimento control de respiración endógena. En cada ensayo se midió la concentración de CO₂ y estireno en el espacio de cabeza a través del tiempo hasta alcanzar la fase estacionaria. Se compararon los graficas obtenidas en los ensayos con estireno respecto al control, con el criterio de que, si la producción de CO₂ es mayor, entonces la fase no acuosa evaluada no es inhibitoria, y si la producción es menor, entonces es inhibitoria (Figura 7).

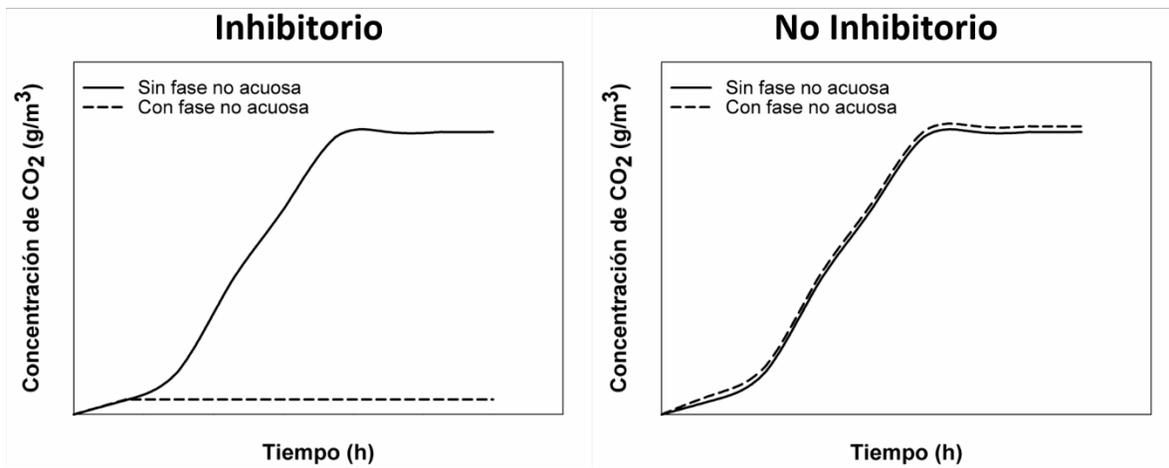


Figura 7. Gráficas que ejemplifican los criterios de inhibición de la fase no acuosa

6.2.4 Toxicidad: Efecto en la viabilidad celular

Esta prueba consistió en exponer a la cepa *P. putida* S12 a cada una de las fases no acuosas por separado y evaluar si la viabilidad celular se reducía respecto a un control que no tenía fase no acuosa. Para ello, se preparó un ensayo para cada fase no acuosa utilizando medio mineral, inóculo y fase no acuosa al 5% v/v, sin la adición de una fuente de carbono. Estos ensayos se incubaron a 28 °C y 140 rpm por 24 horas. Después de este tiempo, se tomaron alícuotas de 1 mL del medio acuoso en donde se encontraba dispersa la biomasa celular, y se cuantificó la cantidad de células muertas, vivas y dañadas por citometría de flujo y con un kit de viabilidad celular.

Para esta técnica se utilizaron el naranja de tiazol y el yoduro de propidio como fluorocromos, los cuales tiñen ADN y membrana celular respectivamente. Debido a que el naranja de tiazol no puede permear la membrana celular, el ADN no puede ser teñido, pero si la membrana celular se rompiera entonces el ADN sería teñido porque se encontraría expuesto. En este sentido, las células que mostraron fluorescencia con este fluorocromo fueron consideradas como muertas. Por su parte, las células que mostraron fluorescencia solo con el yoduro de propidio, fueron consideradas como vivas. En el caso de las células que mostraron fluorescencias con ambos fluorocromos, fueron considerados como dañadas, debido a que la membrana celular se encuentra parcialmente afectada dejando al ADN expuesto, por lo que se tiñen ambas estructuras.

6.3 Producción de PHA en lote con y sin fase no acuosa

Etapa 1: Crecimiento de biomasa

Se tomaron algunas colonias de la caja de Petri para inocular 500 mL de medio nutritivo. Se incubó por 3 días a 28 °C y 140 rpm. Transcurrido este tiempo la biomasa fue recuperada por centrifugación a 3700 rpm por 15 minutos y se

suspendió en medio nutritivo fresco. Se llevó a incubar bajo las mismas condiciones anteriores por 3 días. Finalizando este periodo, la biomasa fue recuperada y lavada con agua destilada estéril. Posteriormente, se suspendió en 400 mL de medio de cultivo con 0.97 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que corresponde a una limitación de nitrógeno del 80 % con respecto al medio de cultivo específico utilizado para el crecimiento óptimo de *P. putida* S12.

Etapa 2: Producción de PHA

Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con válvulas mininert y se prepararon dos ensayos: 1) sin fase no acuosa y 2) con fase no acuosa. El primer ensayo fue inoculado con 15 mL. El segundo ensayo fue inoculado con 14.25 mL y se le agregó 0.75 mL de fase no acuosa (5 % v/v). Ambos ensayos fueron inyectados con 3 μL de estireno para una concentración inicial en el espacio de cabeza de 60.6 g/m³ y tuvieron una concentración inicial de biomasa de 0.2 g/L. Adicionalmente, se tuvo un control de respiración endógena con y sin fase no acuosa. Para seguir la cinética, el estireno y CO₂ se midieron cada dos horas en el espacio de cabeza hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez hecho esto en cada intervalo de tiempo, el medio líquido se llevó a congelar a -60 °C para analizar posteriormente la concentración de biomasa, concentración de nitrógeno y PHA.

Para constatar que la limitación de nitrógeno indujo la acumulación de PHA, se utilizó microscopía de fluorescencia con rojo Nilo como colorante. Al respecto, se hizo la tinción con este colorante debido a que es útil para teñir inclusiones lipídicas como los PHA (Greenspan *et al.*, 1985). Para esto, se tomaron alícuotas de 2 mL de biomasa suspendida al inicio y al final de la producción en lote de PHAs tanto en el experimento con fase no acuosa como en el experimento sin fase no acuosa. A cada alícuota se le agregaron 2 gotas de una solución de rojo Nilo (0.25 mg/mL en DMSO) y se agitó vigorosamente. Después de la agitación, la muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado dos veces con una solución 10 mM de MgCl₂ para eliminar el exceso de rojo Nilo. El

pellet fue suspendido en la solución de $MgCl_2$ teniendo un volumen final de 1 mL. De cada suspensión se colocó aproximadamente 5 μL en un portaobjeto y se le colocó encima un cubreobjeto, teniendo lista la muestra para ver en el microscopio de fluorescencia. Al respecto, se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager.M2 con un objetivo EC Plan-Neofluar 100x/1.30 oil M27. El conjunto de filtros empleados consistió en un filtro de excitación de 530-585 nm, un divisor de haz de 600 nm y un filtro de emisión de 615-4095 nm. El tiempo de exposición fue de 2s. Para captar las imágenes se utilizó una cámara AxioCam MR3_2.

6.4 Mediciones analíticas

6.4.1 Biomasa celular

La biomasa celular expresada en concentración (g/L) se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) en un espectrofotómetro UV-visible JENWAY modelo 6715. Para establecer la relación directa entre la absorbancia y la concentración de biomasa celular se realizó una curva de calibración de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre que contenía biomasa celular suspendida y concentrada (1.1 g/L; medido por gravimetría), se realizaron diferentes diluciones en medio mineral (Tabla 9) y se midió la OD_{600} . Después se recuperó la biomasa por centrifugación (3 700 rpm por 15 minutos) y se determinó el peso seco constante. Con estos valores se calculó la concentración de biomasa celular para relacionarla directamente con la OD_{600} . Finalmente, se graficó la concentración de biomasa en el eje de las X y la OD_{600} en el eje de las Y para obtener una línea recta (ver ANEXO 11.5).

Tabla 9. Diluciones de una suspensión de biomasa celular para la curva de calibración

Volumen de solución madre (mL)	Volumen de medio de cultivo (mL)
1	9
2	8
3	7
4	6
5	5
6	4
7	3

6.4.2 Nitrógeno amoniacal

Por otro lado, el nitrógeno amoniacal se determinó con el método colorimétrico del indofenol descrito por APHA (2005) y se analizó en un espectrofotómetro UV-vis JENWAY modelo 6715 a una longitud de onda de 640 nm. Para ello, se realizó una curva de calibración con estándares de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con un rango de concentraciones de 1.1 – 9.9 mg/L (ver ANEXO 11.6).

6.4.3 CO_2 y estireno en fase gaseosa

Por su parte, el estireno y el CO_2 fueron medidos a través de un cromatógrafo de gases Thermo Scientific TRACE 1300 equipado con una columna de polaridad intermedia BD-624, un detector de ionización de flama (FID) y un detector de conductividad térmica (TCD). Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas acarreador a 3.5 mL/min y a una presión de operación de 28.4 kPa. Las temperaturas de operación para el FID fueron 180, 100 y 180°C para el inyector, la columna y el detector, respectivamente. Las temperaturas de operación para el TCD fueron 180, 100 y 250°C para el inyector, la columna y el detector, respectivamente. Para establecer una relación directa entre el área bajo la curva obtenida en la medición del equipo y la concentración de estireno y CO_2 en el espacio de cabeza, se realizaron curvas de calibración (Ver ANEXO 11.7).

6.4.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada en término de células vivas, muertas y dañadas según la fluorescencia emitida por los fluorocromos al teñir ciertos componentes celulares. Esto se midió a través de un citómetro de flujo BD FACSCalibur (modelo 342975, EE. UU.). Este equipo cuenta con un láser de diodo de 635 nm y un láser azul de 458 nm con un combinador de rayos. Adicional a las señales de dispersión que detectaban granularidad en relación con el tamaño, se incorporaron una señal fluorescente verde (530 nm-FL1), una señal fluorescente amarilla (585 nm-FL2) y una señal fluorescente roja (670 nm-FL3). Los detectores del citómetro de flujo se configuraron con amplificación logarítmica y los ajustes de voltaje de ganancia fueron E00 para el detector de dispersión directa, 350nm para el detector de dispersión lateral, 600nm para el detector de fluorescencia verde, 550nm para el detector de fluorescencia amarilla y 650nm para el detector de fluorescencia roja. Para procesar las muestras, se tomó una alícuota homogénea de 500 μ L, se mezcló con 5 μ L de naranja de tiazol a 0.002 mM y 5 μ L de yoduro de propidio a 0.1 mM y se dejó reposar durante 5 minutos para que ocurriera la tinción. Después de este tiempo, se añadió 25 μ L de suspensión fluorescente de perlas de conteo, con las cuáles se pudieron hacer los cálculos subsecuentes de concentración de células vivas, muertas y dañadas. Las muestras se midieron inmediatamente después de la tinción y se leyeron a una velocidad de flujo alta hasta alcanzar 300-600 recuentos por segundo, llegando a un límite objetivo de 10 000 células para la adquisición de la base de datos. Se utilizó el software Cell Quest Pro para analizar los datos.

6.4.5 Polihidroxicanoatos

Para la cuantificación de los PHA (Bassas Galiá, 2017), primero se procedió a la extracción de los lípidos del citoplasma celular. Para ello, cada muestra de 15 mL fue centrifugada para recuperar la biomasa celular. Esta biomasa se secó en un horno de convección por 24 horas a 60 °C. A partir de esta biomasa, se realizó una

extracción de lípidos utilizando diclorometano como solvente. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y el extracto fue sometido a una temperatura de 60 °C a baño maría en una placa de calentamiento para eliminar la mayor parte del solvente residual. Para separar los PHA del extracto, estos fueron precipitados utilizando metanol frío (-20 °C). El precipitado se sometió a 60 °C a baño maría en una placa de calentamiento para eliminar el solvente residual. Finalmente, se obtuvo el peso seco de los PHA, con lo que se realizaron los siguientes cálculos:

Ecuación 3:

$$\%PHA = \frac{PHAs}{X} \times 100$$

Donde:

%PHA = Porcentaje en peso de PHAs por unidad de biomasa celular (%)

PHAs = Cantidad en masa de polihidroxicanoatos (g)

X = Cantidad en masa de biomasa celular (g)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de los parámetros cinéticos de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento celular de *P. putida* S12 a diferentes concentraciones de estireno como sustrato para obtener los parámetros cinéticos.

En la Figura 8 se puede observar que conforme la concentración de estireno en el espacio de cabeza es mayor, el crecimiento celular se incrementa de manera exponencial. Sin embargo, cuando se sobrepasa la concentración de 60.6 g/m^3 a 80.8 g/m^3 , la $\hat{\mu}$ no aumenta su valor y llega a ser constante. Esto indica que a tal concentración el crecimiento ya no está limitado por sustrato, sino por la reacción biológica de la cepa, la cual ha alcanzado la $\hat{\mu}$. Por otra parte, después de esta concentración (*i.e.* 80.8 g/m^3), el estireno causa inhibición en el crecimiento de la cepa, de acuerdo con la concentración mínima inhibitoria determinada previamente (ver ANEXO 11.2).

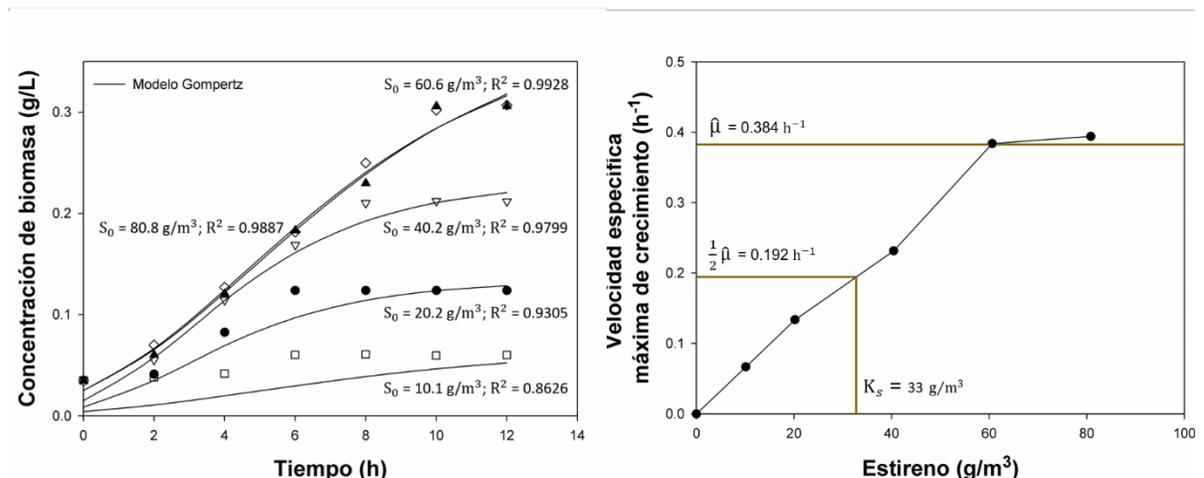


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *P. putida* S12 a diferentes concentraciones de estireno con ajuste al modelo Gompertz (izquierda; los símbolos representan datos experimentales) y las velocidades específicas de crecimiento de cada cinética en función de la concentración inicial de estireno (derecha).

De cada cinética, se obtuvo la μ utilizando el modelo Gompertz que describe un crecimiento sigmoideal. Estos valores fueron graficados respecto a la concentración de estireno inicial en el espacio de cabeza como se representa en la Figura 8. De esta gráfica, se obtuvo que la $\hat{\mu}$ es de 0.384 h^{-1} y la K_s es igual a 33 g/m^3 . Con estos datos se calcularon la $Y_{x/s}$ y la \hat{q} , cuyos valores son de 0.00445 g/g y 86.3 g/gh , respectivamente.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de microorganismos que utilizan estireno y otros compuestos aromáticos como sustratos en condiciones óptimas de crecimiento.

Sustrato	Microorganismo	$\hat{\mu}$ (h^{-1})	K_s (g/m^3)	$^a Y_{x/s}$ (g/g)	$^b \hat{q}$ (g/gh)	Referencia
Estireno	<i>Pseudomonas putida</i> S12	0.384	33	0.00445	86.29	Este estudio
	<i>Exophiala jeanselmei</i>	1.26	0.1	-	-	Cox et al. (1993)
	<i>Pseudomonas putida</i> E-93486	0.118	5.984	0.913	-	Gaszczak et al. (2012)
	<i>Exophiala oligosperma</i>	0.16	7.381	-	-	Rene et al. (2012)
	<i>Rhodococcus pyridinovorans</i> PYJ-1	-	128.8	-	0.21	Jung y Park (2005)
	<i>Pseudomonas putida</i> WJ	0.282	23.57	-	-	JianMing et al. (2014)
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PTCC 1767	-	7.549	-	4.235	Arabjafari et al. (2016)
	Lodo activado	0.016	3.49	0.696	-	Jorio et al. (2005)
	Lodo activado	0.1581	25.91	1.19	-	Hazrati et al. (2015)
	Lodo activado	0.1601	13.8	-	160.13	Babae et al. (2010)
Benceno	<i>Pseudomonas putida</i> PPO1	-	3.4	-	0.675	Oh et al. (1994)
	<i>Comamonas</i> sp.	0.0068	50.63	-	-	Jiang et al. (2015)
Tolueno	<i>Pseudomonas putida</i> PPO1	-	15.1	-	1.125	Oh et al. (1994)
	<i>Pseudomonas putida</i> 54G	-	0.465	-	18.9	Mirpuri et al. (2000)
Alquil benceno	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.18	18.9	0.55	0.165	Veiga et al. (1999)
	<i>Bacillus</i> sp.	0.12	18	0.38	0.163	Veiga et al. (1999)
Etil benceno	<i>Pseudomonas putida</i> F1	0.26	1.5	-	-	Trigeros et al. (2010)
	<i>Comamonas</i> sp.	0.0064	49.35	-	-	Jiang et al. (2015)

^a $Y_{x/s}$ en g de biomasa/g de sustrato

^b \hat{q} en g de sustrato consumido por g de biomasa por hora

En la Tabla 10 se resumen algunos parámetros cinéticos determinados por otros autores para bacterias y hongos utilizando estireno y otros COVs como sustratos. Comparando esta información con los datos obtenidos en esta investigación se tiene lo siguiente:

1) El valor de la μ de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato es mayor que lo reportado por JianMing *et al.* (2014) para *P. putida* WJ y por Gaszczak *et al.* (2012) para *P. putida* E-93486, las cuales fueron obtenidas del aislamiento de lodos activados provenientes de una planta de caucho y de un cepario (VTT Culture Collections, Finlandia), respectivamente. Esto indica que la capacidad de una misma especie de microorganismo para degradar un sustrato es dependiente de la cepa, lo cual ocurre porque las condiciones en las que se encuentran los microorganismos varían del lugar de donde se aíslan, y por lo tanto, la aclimatación a ciertos factores ambientales es distinta. Por otra parte, se puede observar que la μ de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato es hasta 3 veces mayor que la obtenida con hongos y otras bacterias que degradan estireno, 24 veces mayor que algunos consorcios de lodos activados aclimatados para degradar estireno y 56 veces mayor que otras cepas y especies de microorganismos que degradan otros compuestos aromáticos (Tabla 10). Todo lo anterior indica que el crecimiento de *P. putida* S12 con estireno como sustrato es relativamente más rápido que el de otros microorganismos que consumen estireno u otros compuestos aromáticos.

2) El valor de la K_s de *P. putida* S12 utilizando estireno como única fuente de carbono es relativamente más alta que las reportadas para otras cepas de *P. putida* (JianMing *et al.*, 2014; Gaszczak *et al.*, 2012) y para otros microorganismos que también degradan estireno, con excepción de lo reportado por Jung y Park (2005) para *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 (129 g/m³). Lo anterior indica que la afinidad al estireno que tiene la cepa en este estudio es entre 1 y 30 veces menor que la afinidad mostrada por otras cepas para este sustrato, y 4 veces mayor que en el estudio de Jung y Park (2005).

3) El $Y_{x/s}$ de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato es hasta 267 veces menor que lo reportado para otras cepas de *P. putida* (JianMing *et al.*, 2014; Gaszczak *et al.*, 2012) y otros microorganismos que degradan estireno. Esto indica que la cepa en estudio tiene un muy bajo rendimiento de biomasa, aun cuando consume casi 100% del sustrato, por lo tanto, se sugiere que una gran parte del estireno consumido es destinado a energía y mantenimiento, y no a síntesis celular. En este sentido, existen reportes de cepas de *P. putida* (e.g. *P. putida* F1; George *et al.*, 2011) que tienen la capacidad de consumir estireno solo como fuente de energía y no, como fuente de carbono, o en algunos casos, esto último es casi despreciable, como podría estar ocurriendo con la cepa en estudio.

4) El valor de la \hat{q} de *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato es mucho mayor que lo reportado para otros microorganismos que degradan estireno, y a su vez, es relativamente menor que lo reportado para lodos activados. Esto quiere decir, que la cepa en estudio tiene una capacidad de consumir rápidamente el estireno comparado con cultivos puros, pero comparando con un consorcio como los lodos activados, este último tiene un mayor potencial puesto que al ser un consorcio microbiano los procesos de cooperación pueden ayudar a un mejor desempeño en la biodegradación de algunos sustratos.

7.2 Selección de la fase no acuosa

7.2.1 Criterio de afinidad por el estireno

El coeficiente de partición es un valor que da información sobre cómo se reparte una sustancia entre dos fases distintas. En este caso, se tuvo una fase gaseosa y una fase líquida. Siguiendo la Ecuación 4 que describe el coeficiente de partición, se tiene que mientras más pequeño sea dicho valor, mayor será la proporción que será repartida a la fase líquida.

Se determinaron los coeficientes de partición del estireno en el medio mineral, aceite de silicona, líquido iónico, una mezcla de medio mineral con aceite de silicona al 5% v/v y una mezcla de medio mineral con líquido iónico al 5% v/v.

Ecuación 4:

$$m^b_H = C_{H^g}/C_{H^s}$$

Donde:

m^b_H = Coeficiente de partición adimensional

C_{H^g} = Concentración del estireno en la fase gas en el equilibrio (g/L)

C_{H^s} = Concentración del estireno en la fase líquida en el equilibrio (g/L)

En la Tabla 11 se resume el reparto en el equilibrio de la concentración de estireno en el líquido y en el espacio de cabeza, expresado en porcentajes, así como los coeficientes de partición obtenidos por método gráfico (ver ANEXO 11.4). Como se puede observar la adición de una fase no acuosa al medio mineral, ya sea aceite de silicona o líquido iónico, incrementó casi al doble la absorción de estireno en el medio líquido. Esto se debe a que tanto el aceite de silicona y el líquido iónico son sustancias de naturaleza hidrofóbica que tienen una buena afinidad para absorber compuestos aromáticos, como el estireno, a diferencia de medios acuosos, en donde la absorción del estireno es relativamente menor, ya que es un compuesto de naturaleza moderadamente hidrofóbica que presenta una baja solubilidad en agua (300 mg/L; Mooney *et al.*, 2006).

Tabla 11. Reparto en el equilibrio de la concentración de estireno en el medio líquido y en el espacio de cabeza.

Ensayo	Reparto		Coeficiente de partición (adimensional)
	Medio líquido (%)	Espacio de cabeza (%)	
Medio mineral	55.80 – 66.51	33.49 – 44.20	0.7090 ± 0.05727
Aceite de silicona	95.78 – 97.92	2.08 – 4.22	0.0226 ± 0.00014
Líquido iónico	98.95 – 99.71	0.81 – 1.05	0.0030 ± 0.00015
Medio mineral + aceite de silicona	97.03 – 98.19	1.81 – 2.97	0.0189 ± 0.00007
Medio mineral + líquido iónico	99.59 – 99.88	0.12 – 0.41	0.0032 ± 0.00042

Lo anterior coincide con los valores obtenidos del coeficiente de partición para cada ensayo. Como se puede observar, el medio mineral mostró el valor más alto (0.7090 ± 0.05727) que indica un menor reparto de la concentración de estireno inicial hacia el medio líquido. Este resultado puede variar según la composición del medio mineral. Por ejemplo Cox *et al.* (1994) y Babae *et al.* (2010) reportaron coeficientes de partición de estireno con valores de 0.16 y 0.002 para un medio mineral empleado en el crecimiento de *Exophiala jeanselmei* y lodos activados, respectivamente. Por su parte, tanto el aceite de silicona como el líquido iónico, ya sea solos o en mezcla al 5% v/v con medio mineral, mostraron valores de coeficiente de partición similares, lo cual puede atribuirse a que bajo las mismas condiciones, la proporción de fases no acuosas mezcladas en medio mineral es suficiente para absorber el estireno de la misma manera que cuando las fases no acuosas no son mezcladas. Adicionalmente, estos valores son relativamente más bajos que el medio mineral sin mezclar, indicando que la adición de aceite de silicona y líquido iónico al medio mineral incrementa hasta 38 y 222 veces la absorción del medio líquido por el estireno, respectivamente.

El valor del coeficiente de partición del estireno obtenido en este estudio para el aceite de silicona mezclado en medio mineral al 5% v/v (0.0189 ± 0.00007), es similar a lo reportado por Dumont y Andres (2012) para una mezcla de aceite de silicona ($\nu = 5$ cP) en agua al 2% v/v (0.0186). Esto podría indicar que, tal vez, sea posible utilizar menor proporción de aceite de silicona para tener la misma absorción de estireno, lo que se reflejaría en un beneficio económico a gran escala. Por otra parte, Dumont y Andres (2012) reportan valores del coeficiente de partición de estireno en aceite de silicona mezclados en agua al 10 (0.0043) y 20% v/v (0.0022), en donde la afinidad por el estireno se incrementa hasta 8.5 veces. Esto sugiere que un incremento en la proporción del aceite de silicona en medios acuosos puede incrementar la afinidad del estireno al medio líquido, aunque habría que evaluar si este incremento es significativo y viable económicamente para un sistema a gran escala. La variación de la proporción del aceite de silicona en el medio mineral no fue objeto de este estudio, porque la mayoría de las investigaciones de biorreactores

de partición que utilizan aceite de silicona como fase no acuosa, reportan como óptimo el 5% v/v, sin embargo, esto puede ser diferente de acuerdo con el COV objetivo, por lo que sería interesante hacer esta evaluación en futuras investigaciones que continúen con el presente estudio.

El valor del coeficiente de partición del estireno en el líquido iónico mezclado en medio mineral al 5%v/v (0.0032 ± 0.00042) es similar a lo reportado para diferentes líquidos iónicos de base imidazolio que absorben COV (ver Tabla 3). Al respecto, algunos autores reportan que los líquidos iónicos de base imidazolio tienen una alta afinidad a compuestos aromáticos, como el estireno, aunque su selectividad varía con la longitud de la cadena alquílica (Salar-García *et al.*, 2017).

El valor del coeficiente de partición del estireno que se obtuvo en este estudio para el líquido iónico mezclado en medio mineral al 5% v/v ($H_{IL/MM} = 0.0030 \pm 0.00015$) es 6.3 veces mayor que el obtenido para la mezcla de aceite silicona en medio mineral al mismo porcentaje ($H_{AS/MM} = 0.0189 \pm 0.00007$). Esto quiere decir, que el estireno es mas soluble en el liquido iónico que en el aceite de silicona, por lo que en términos de afinidad, el líquido iónico resulta más prometedor como fase no acuosa porque representa un mayor incremento en la transferencia de masa del estireno desde el espacio de cabeza hacia la fase líquida. No obstante, aún hay que evaluar la biodegradabilidad, efecto inhibitorio y toxicidad de las sustancias para llegar a una conclusión.

7.2.2 Criterio de biodegradabilidad

La biodegradabilidad del aceite de silicona y del líquido iónico por *P. putida* S12, se evaluó mediante la producción de CO₂ en el espacio de cabeza durante 30 días. Para ello, se contó con un control de la respiración endógena y un blanco de la degradación del estireno por el mismo inóculo, para garantizar que existiera actividad metabólica. Como se puede observar en las Figuras 9 y 10, el CO₂ medido en el espacio de cabeza cuando la cepa estuvo en contacto con ambas fases no

acuosas, fue prácticamente igual al CO₂ proveniente de la respiración endógena de *P. putida* S12, lo que quiere decir que el microorganismo fue incapaz de degradar las fases no acuosas. Esto coincide con muchos estudios que confirman que ambas fases no acuosas son no biodegradables para la mayoría de los microorganismos.

Para el caso del aceite de silicona, varios estudios han demostrado que no es biodegradable, porque no es asimilado por los microorganismos ni siquiera parcialmente, ya que no se han detectado subproductos de degradación de esta sustancia cuando se suministra a consorcios o cepas de microorganismos (Darracq *et al.*, 2010).

En el caso de los líquidos iónicos, algunos estudios reportan su posible biodegradación. Sin embargo, esto solo se ha demostrado en líquidos iónicos con cationes diferentes al imidazolio (Gathergood *et al.*, 2006) o con cationes imidazolio en un caso extraordinario cuando se utilizaron hongos filamentosos (*Fusarium* sp.; Esquivel-Viveros *et al.*, 2009). Aunque esto último, ha sido puesto en duda por Quijano *et al.* (2011) con el argumento de que no se hicieron pruebas de biosorción que garanticen la inexistencia de una adherencia del líquido iónico en la superficie de los microorganismos en lugar de la biodegradación. Por su parte, los líquidos iónicos que tiene catión imidazolio, como el que se utilizó en este estudio, solo tienen una biodegradación de la cadena alquílica del catión cuando es mayor a 2 carbonos, lo que contribuye a menos del 1% de biodegradabilidad (Gathergood *et al.*, 2006; (Harjani *et al.*, 2009). La dificultad de los microorganismos para biodegradar líquidos iónicos con catión imidazolio se debe principalmente a que los anillos están conformados por amonios cuaternarios y al impedimento estérico que tiene la conformación del catión con el anión (Docherty *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2016).

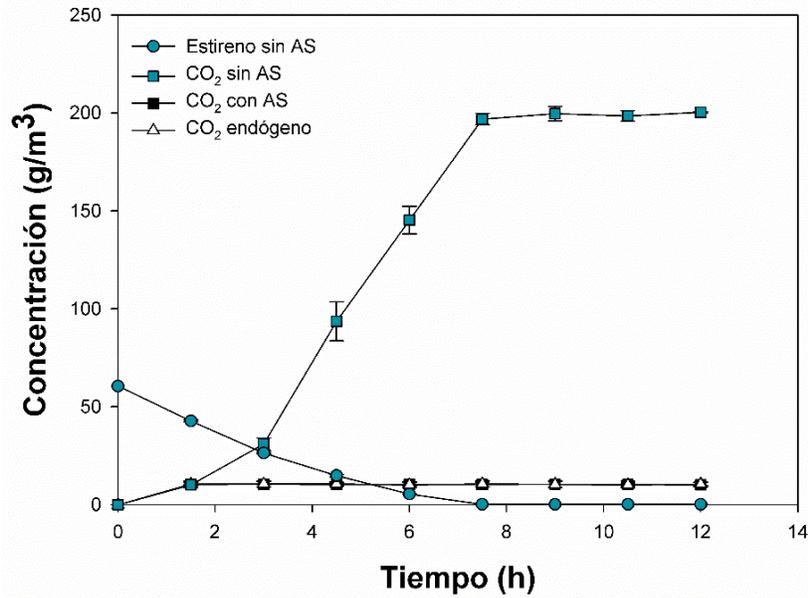


Figura 9. Biodegradabilidad del aceite de silicona por *P. putida* S12

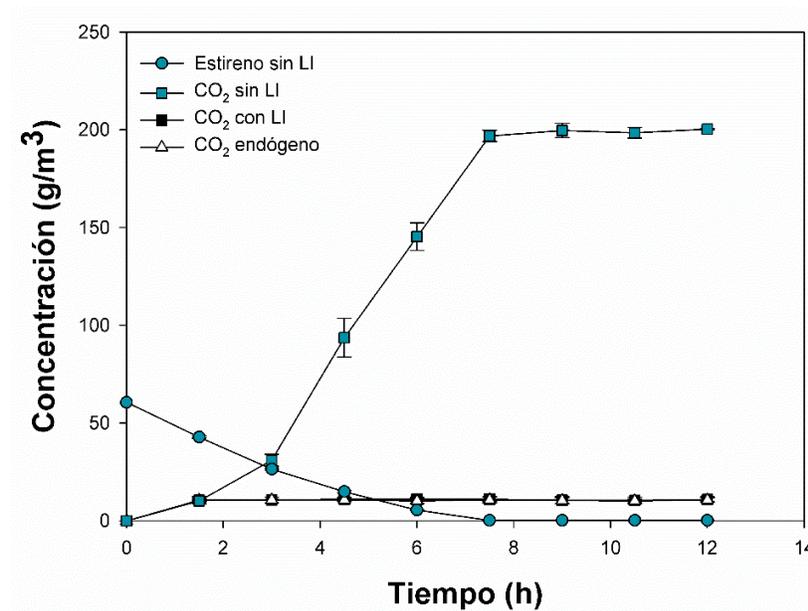


Figura 10. Biodegradabilidad del líquido iónico por *P. putida* S12

7.2.3 Criterio de inhibición

Se evaluó el efecto inhibitorio de cada fase no acuosa en el consumo de estireno por *P. putida* S12.

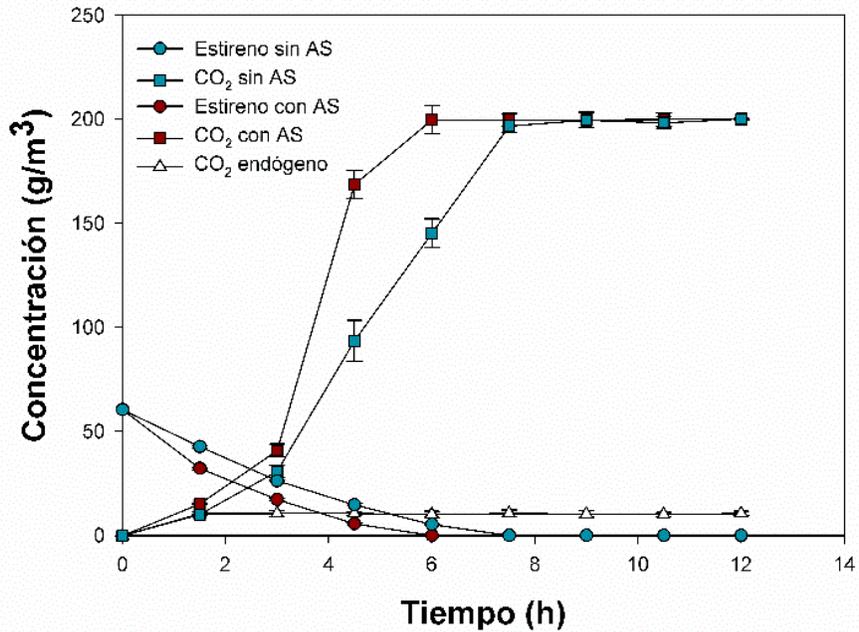


Figura 11. Inhibición de *Pseudomonas putida* S12 durante la biodegradación de estireno por exposición con el aceite de silicona al 5% v/v.

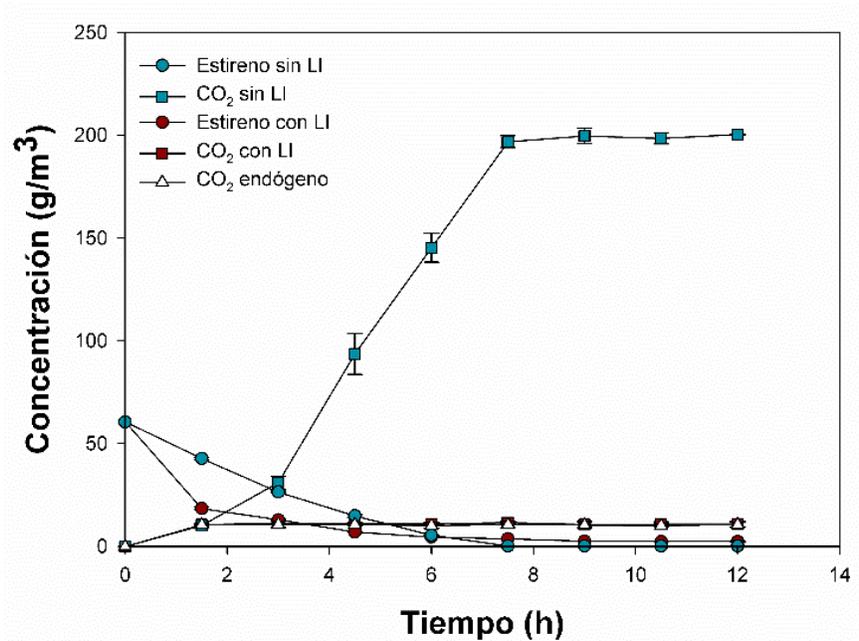


Figura 12. Inhibición de *Pseudomonas putida* S12 durante la biodegradación de estireno por exposición con el líquido iónico al 5% v/v.

Como se observa en la Figura 11, la biodegradación del estireno en presencia del aceite de silicona se lleva a cabo incluso más rápido que la biodegradación en el

control. Por su parte, en la Figura 12 se observa que la biodegradación de estireno en presencia de líquido iónico no se llevó a cabo en 12 horas. Cabe destacar que el experimento fue extendido hasta 30 días para saber si había una fase lag prolongada o un proceso de aclimatación. Al respecto, el estireno no fue consumido en ese lapso, por lo tanto, el líquido iónico causó la inhibición de *P. putida* S12 en el consumo de estireno.

7.2.4 Criterio de toxicidad

La prueba de toxicidad consistió en evaluar la viabilidad de las células al ser expuestas a las fases no acuosas por un periodo de incubación, comparando con un control (sin fase no acuosa). Como resultado, se puede observar en la Figura 13 que la proporción de células vivas, muertas y dañadas cuando se expone la cepa al aceite de silicona es similar al control. En contraste, la proporción de células vivas, muertas y dañadas cuando la cepa se expone al líquido iónico es significativamente menor que lo obtenido para el aceite de silicona y el control (Tabla 12), por lo que ocurrió una disminución de la viabilidad celular de *P. putida* S12 en contacto con el líquido iónico.

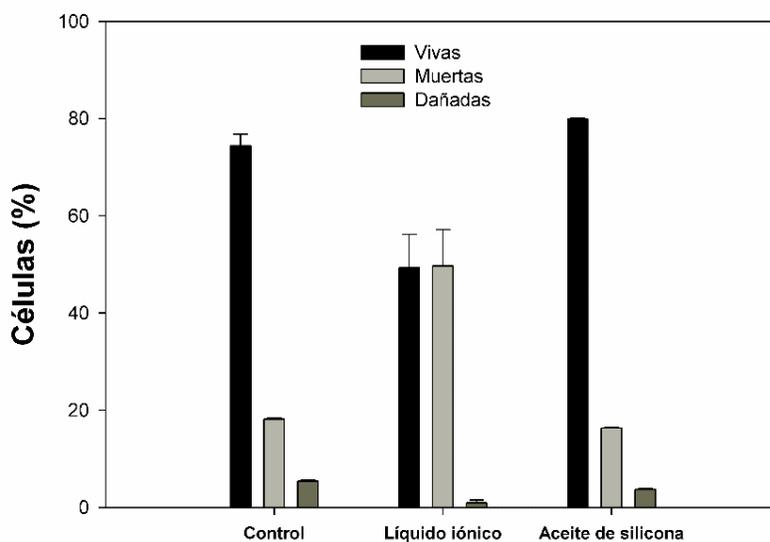


Figura 13. Viabilidad celular de *P. putida* S12 expuesta a aceite de silicona y líquido iónico

Tabla 12. Prueba de T student de la proporción de células vivas de *P. putida* S12 expuesta a aceite de silicona y líquido iónico.

FNA	Vivas (%)		Muertas (%)		Dañadas (%)		Valor T	Valor p
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD		
Control	74.42	2.38	18.17	0.205	5.4	0.255	24.44	0.026
IL	49.31	6.90	49.71	7.48	0.975	0.587	-0.06	0.962
AS	79.91	0.226	16.36	0.091	3.73	0.1273	30.33	0.021

$\alpha = 0.05$; nivel de confianza = 95 %

Letras iguales = no hay diferencia significativa

Letras diferentes = hay diferencias significativas

FNA = Fase no acuosa; IL = Líquido iónico; AS = aceite de silicona

Con base en los resultados de las pruebas anteriores, se puede decir que el aceite de silicona no es biodegradable, inhibitorio ni tóxico para *P. putida* S12. En contraste, el líquido iónico, que tampoco es biodegradable, si causa inhibición y toxicidad para *P. putida* S12. Este hecho se ha reportado por varios autores, especialmente para líquidos iónicos de base imidazolio, (Gathergood *et al.*, 2006). Adicionalmente, esta toxicidad no es exclusiva para microorganismos, también se han hecho pruebas en células vegetales, animales y humanas, teniendo resultados positivos, por lo que hay que evitar la liberación de estas sustancias hacia el ambiente, recuperándola y reutilizándola en los procesos en los que sean utilizadas (García *et al.*, 2004; Thi-Phuong *et al.*, 2010).

7.2.5 Selección

Considerando los criterios de afinidad por el estireno, biodegradabilidad, inhibición y toxicidad se tiene que, aunque el líquido iónico tiene una mayor capacidad para absorber estireno y no es biodegradable, el aceite de silicona además de no ser biodegradable, tampoco es inhibitorio ni tóxico para *P. putida* S12, por lo que se eligió este último como fase no acuosa para los experimentos de producción de PHA.

7.3 Efecto de la fase no acuosa en la producción en lote de PHA a partir de estireno como sustrato

Se evaluó el efecto de la adición de aceite de silicona al 5% v/v en la producción de PHA por *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato. En la Figura 14 se encuentran dos gráficas. La primera representa la cinética de producción de PHA sin aceite de silicona y la segunda representa cuando se adiciona aceite de silicona al 5% v/v. Como podemos observar en ambas gráficas, la reducción de la concentración de la fuente de nitrógeno en un 80% respecto a la concentración establecida para el crecimiento, indujo la acumulación de PHA para la cepa seleccionada. Este efecto ya era esperado puesto que muchas investigaciones utilizan esta limitación de nitrógeno en sus cepas para inducir la acumulación de PHA (e.g. Liu *et al.*, 2013). La máxima acumulación de PHA en la biomasa sin aceite de silicona se alcanzó en 10 horas y fue de 15.73 % p/p, mientras que con la adición del aceite de silicona al 5% v/v, la máxima acumulación de PHA se alcanzó en 6 horas y fue del 15.75 % p/p. Como se puede observar, los porcentajes de acumulación de PHA obtenidos sin y con aceite de silicona son similares, por lo que el efecto más apreciable al adicionar el aceite de silicona es que el tiempo de producción de una misma cantidad de PHA se reduce en 40%. Esto quiere decir, que el aceite de silicona no solo reduce el tiempo de biodegradación del estireno, sino que también reduce el tiempo de producción de PHA cuando se induce una desviación de la ruta metabólica de degradación a través de la limitación en la concentración de la fuente de nitrógeno. Lo anterior es debido a la afinidad que tiene el estireno por el aceite de silicona y porque esta fase no acuosa funciona como un vector de transferencia, como ha sido demostrado en diversos estudios (Kraakman *et al.*, 2011).

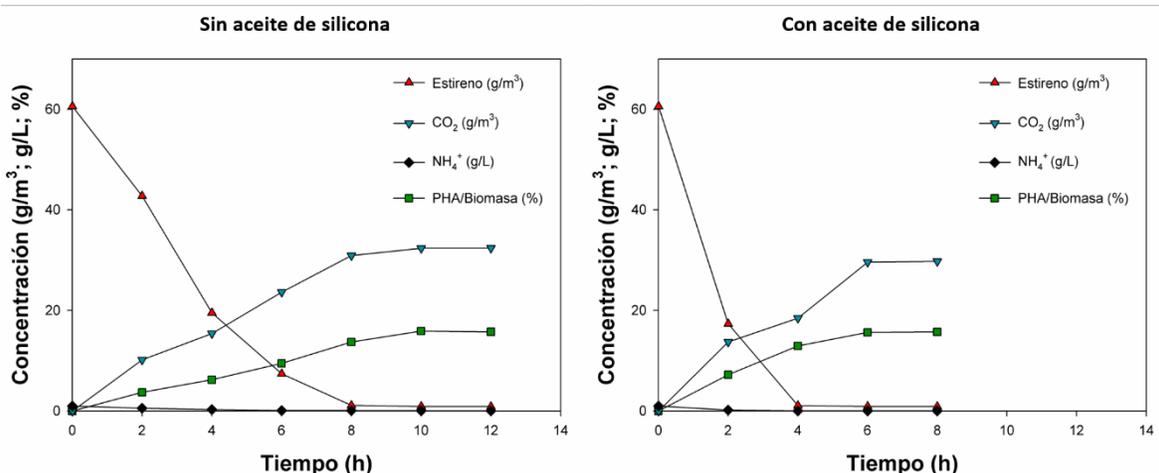


Figura 14. Cinéticas de producción de PHA por *P. putida* S12 sin y con aceite de silicona al 5% v/v.

Por otra parte, los porcentajes de acumulación de PHA sin y con aceite de silicona, corresponden a la mitad de lo que se acumula por otros microorganismos y cepas reportados en algunas investigaciones en donde también se ha utilizado el estireno como sustrato (Arshad *et al.* 2017; Tan *et al.* 2015). No obstante, los valores obtenidos en este estudio son cercanos a lo reportado por otros autores para la misma cepa (*i.e.* 14-20% p/p; Tobin y O'Connor, 2005; Tan *et al.*, 2015). La variación del porcentaje de acumulación de PHA en este estudio respecto a otros microorganismos y cepas puede estar relacionada a las características intrínsecas de la cepa, el medio de cultivo y la concentración del sustrato. Este último factor es de suma importancia a considerar, puesto que una variación en la concentración de sustrato puede originar diferentes porcentajes de PHA acumulados. En este sentido, la manera para conocer la máxima capacidad de acumulación de PHAs es llevar a cabo una producción en lote alimentado hasta que el porcentaje se vuelva constante (Albuquerque *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio no se hizo esta evaluación y queda como perspectiva para la continuidad de la investigación.

Por otro lado, en la Figura 15 podemos observar imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia utilizando rojo Nilo como colorante. La imagen 1a corresponde a la fluorescencia de las células teñidas que fueron colectadas justo

antes de iniciar con la producción de PHAs. En ella se puede observar que la fluorescencia es relativamente baja y poco apreciable, indicando que no hay gránulos intracelulares que observar y que aquello que tiene fluorescencia pueden ser algunos lípidos de componentes celulares. Al respecto, Greenspan *et al.* (1985) menciona que la intensidad de fluorescencia por rojo Nilo para componentes lipídicos que forman comúnmente las células bacterianas es muy baja, despreciable o casi nula. La imagen 2a corresponde a la fluorescencia de las células teñidas que fueron colectadas al final de la producción de PHAs sin la adición de aceite de silicona. En este caso, se puede observar un aumento de la intensidad de la fluorescencia respecto a la imagen 1a, por lo que se confirma la acumulación de gránulos intracelulares. La imagen 3a corresponde a la fluorescencia de células teñidas que fueron colectadas al final de la producción de PHAs con la adición de aceite de silicona al 5% v/v. En ella podemos observar que la intensidad de fluorescencia es mayor que la imagen 1a, lo que indica que si hubo una acumulación de gránulos intracelulares lipídicos. Aunque el rojo Nilo no es selectivo para PHAs (Brown *et al.*, 1992), se puede considerar que los gránulos intracelulares observados corresponden a PHAs, ya que se ha demostrado que *P. putida* S12 produce PHAs cuando utiliza estireno como única fuente de carbono y bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Tobin y O'Connor, 2005; Tan *et al.*, 2015). Para complementar esta información, es necesario caracterizar el biopolímero a través de espectroscopía de infrarrojo, lo cual no se pudo realizar en este estudio pero prevalece como perspectiva para el seguimiento de la investigación.

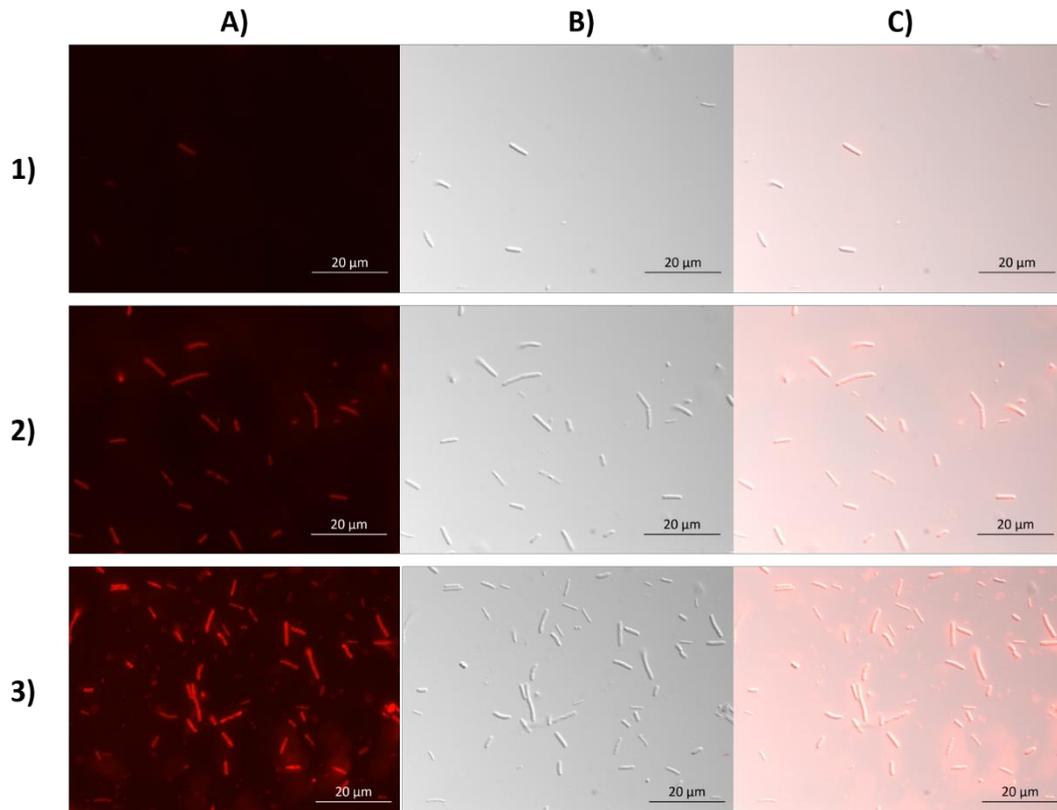


Figura 15. Imágenes de microscopía de fluorescencia de *P. putida* S12 con tinción de rojo Nilo. 1: antes de la producción de PHA; 2: al final de la producción de PHA sin aceite de silicona; 3: al final de la producción de PHA con aceite de silicona; a: fluorescencia; b: contraste de interferencia diferencial (DIC; siglas en inglés); c: fluorescencia con DIC.

8. CONCLUSIONES

El líquido iónico Tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de 1-hexil-3-imidazolio no es biodegradable por *P. putida* S12, pero resultó inhibitorio y tóxico para la cepa. Por lo tanto, se descartó su uso a pesar de que tuvo una mayor afinidad por el estireno que el aceite de silicona.

El aceite de silicona no fue biodegradable por *P. putida* S12 y no resultó inhibitorio ni tóxico para la cepa. Por lo tanto, se utilizó esta sustancia como fase no acuosa para la cinética de acumulación de polihidroxicanoatos, a pesar de que tuvo una menor afinidad por el estireno que el líquido iónico.

La adición de aceite de silicona reduce en 40% el tiempo de producción máxima de polihidroxicanoatos por *P. putida* S12, lo que implica un ahorro de gastos operativos.

Al seleccionar una fase no acuosa para el tratamiento biológico de compuestos orgánicos volátiles hidrofóbicos, no solo hay que considerar las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, sino que también hay que tomar en cuenta su interacción con el o los microorganismos que serán utilizados en el proceso.

A pesar de que se ha demostrado que existe un potencial en el uso de biorreactores de partición para la valorización de COV hidrofóbicos, aún hace falta más investigación para evaluar su factibilidad a gran escala.

9. PERSPECTIVAS

Variar las relaciones C/N, pH y el tipo de nutriente limitante para evaluar su efecto en el rendimiento de la acumulación de PHAs en *P. putida* S12 utilizando estireno como sustrato.

Evaluar la producción de PHA en biorreactores de partición con distintas configuraciones operados en lote alimentado y con diferentes cargas de entrada de estireno.

Realizar una caracterización más completa del PHA producido para elucidar sus posibles aplicaciones. Dentro de las caracterizaciones que se pueden realizar son: espectroscopía infrarroja (grupos funcionales, estructura química), cromatografía de permeación de gel (peso molecular), análisis termogravimétrico (estabilidad térmica) y cromatografía de gases acoplado a masas (composición monomérica).

10. LITERATURA CITADA

- Aalam, S., Pauss, A., & Lebeault, J. (1993). High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 696-699. doi:10.1007/BF00164452
- Albuquerque, M., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151, 66-76. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.070
- Aldric, J.-M., & Thonart, P. (2008). Performance evaluation of a water/silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to remove volatile organic compounds from gaseous effluents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1401-1408.
- Alexander, M. (1998). Environmental Fate and Effects of Styrene. En SIRC, *The SIRC Review. Research, Technology and Public Policy* (Vol. 6, pág. 58). Washington, D.C.
- Anderson, A., Williams, D., Taidi, B., Dawes, E., & Ewing, D. (1992). Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 93-102.
- APHA. (2005). *Standard methods for examination of water and wastewater*. Washington.
- Arabjafari, M., Fallah, N., Dadvar, M., & Nasernejad, B. (2016). Kinetic modelling of styrene biodegradation by *Rhodococcus Erythropolis* PTCC 1767: Effect of adaptation to styrene and initial biomass concentration. *Chemical Engineering Communications*, 204(2), 182-189.
- Ariaga, S., Serrano, M., & Barba de la Rosa, A. (2012). Methanol vapor biofiltration coupled with continuous production of recombinant endochitinase Ech42 by *Pichia Pastoris*. *Process Biochemistry*, 47, 2311-2316. doi:10.1016/j.procbio.2012.09.008
- Arriaga García, S. L. (2005). *Comparación del transporte y biodegradación del hexano entre bacterias y hongos con diferentes configuraciones de reactores*. Ciudad de México, México.
- Arriaga, S., Muñoz, R., Hernandez, S., Guieysse, B., & Revah, S. (2006). Gaseous hexane degradation by *Fusarium solani* in two liquid phase packed-bed and

- stirred-tank bioreactors. *Environmental Science and Technology*, 40, 2390-2395.
- Arshad, A., Ashraf, B., Ali, I., & Jamil, N. (2017). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from styrene by *Enterobacter* spp. isolated from polluted environment. *Frontiers in Biology*, 12(3), 210-218. doi:10.1007/s11515-017-1446-2
- Atkinson, R., & Arey, J. (2003). Atmospheric Degradation of Volatile Organic Compounds. *Chemical Reviews*, 103(12), 4605-4630.
- ATSDR. (2010). *Toxicological profile for styrene*.
- Ayoko, G. (2004). Volatile Organic Compounds in Indoor Environments. In P. Pluschke, *Air Pollution. The Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 4F, pp. 4605-4630). Berlín: Springer.
- Babae, R., Bonakdarpour, B., Nasernejad, B., & Fallah, N. (2010). Kinetics of styrene biodegradation in synthetic wastewaters using an industrial activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 184, 111-117.
- Baggi, G., Boga, M. M., Catelani, D., Galli, E., & Treccani, V. (1983). Styrene catabolism by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 141-147.
- Bailón, L., Nikolausz, M., Matthias, K., & Veiga, M. (2009). Removal of dichloromethane from waste gases in one- and two-liquid-phase stirred tank bioreactors and biotrickling filters. *Water Research*, 43, 11-20. doi:10.1016/j.watres.2008.09.031
- Bajpai, P. (2014). Biological Methods for the Elimination of Odorous Compounds. En P. Bajpai, *Biological Odour Treatment* (1ra ed., pág. 74). Springer. doi:10.1007/978-3-319-07539-6
- Bassas Galiá, M. (2017). Protocols for isolation and Analysis of Polyhydroxyalkanoates. En T. McGenity, K. Timmis, & B. Fernandez, *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (págs. 93-111). Springer.
- Baumann, M., Daugulis, A., & Jessop, P. (2005). Phosphonium ionic liquids for degradation of phenol in a two-phase partitioning bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 131-137. doi:10.1007/s00253-004-1768-2
- Brown, W., Sullivan, T., & Greenspan, P. (1992). Nile red staining of lysosomal phospholipid inclusions. *Histochemistry*, 97, 349-354.
- Burback, B. L., & Perry, J. (1993). Biodegradation and Biotransformation of Groundwater Pollutant Mixtures by *Mycobacterium vaccae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1025-1029.

- Cantera, S., Sánchez-Andrea, I., Lebrero, R., García-Encina, P., Stams, A., & Muñoz, R. (2018). Multi-production of high added market value metabolites from diluted methane emissions via methanotrophic extremophiles. *Bioresource Technology*, 401-407. doi:10.1016/j.biortech.2018.07.057
- Castilho, L., Mitchell, D., & Freire, D. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, 100, 5996-6009.
- CCA. (2007). *En balance: emisiones y transferencias de contaminantes en América del Norte en 2004*. Montreal: Comisión para la Cooperación Ambiental.
- Chen, G., Wu, Q., Wang, Y., & Zheng, Z. (2005). Application of microbial polyesters-polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Key Engineering Materials*, 437-440.
- Colby, J., Stirling, D., & Dalton, H. (1977). The soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsullatus* (Bath). *Biochemical Journal*, 165, 395-402.
- Cox, H., Houtman, J., Doddema, H., & Harder, W. (1993). Growth of the black yeast *Exophiala jeanselmei* on styrene and styrene-related compounds. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 372-376.
- Crabo, A., Singh, B., Nguyen, T., Emami, S., Gassner, G., & Sazinsky, M. (2017). Structure and biochemistry of phenylacetaldehyde dehydrogenase from the *Pseudomonas putida* S12 styrene catabolic pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*(616), 47-58.
- Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., Thomas, D., Dumont, E., . . . Le Cloirec, P. (2010). Silicon oil: An effective absorbent for the removal of hydrophobic volatile organic compounds. *Chemical Technology and Biotechnology*, 309-313. doi:10.1002/jctb.2331
- Daugulis, A. (2001). Two-phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics. *Trends in Biotechnology*, 19, 457-462.
- Davidson, C., & Daugulis, A. (2003). Addressing biofilter limitations: A two-phase partitioning bioreactor process for the treatment of benzene and toluene contaminated gas streams. *Biodegradation*, 415-421.
- de Jong, E., Beuling, E., van der Zwan, R., & de Bont, J. (1990). Degradation of veratryl alcohol by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 420-425.
- Docherty, K. M., Dixon, J. K., & Kulpa Jr., C. F. (2007). Biodegradability of imidazolium and pyridinium ionic liquids by an activated sludge microbial community. *Biodegradation*, 18, 481-493. doi:10.1007/s10532-006-9081-7

- DOF. (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-165-SEMARNAT-2013. Que establece la lista de sustancias sujetas a reporte para el registro de emisiones y transferencia de contaminantes. México.
- Dumont, E., & Andrés, Y. (2012). Styrene absorption in water/silicone oil mixtures. *Chemical Engineering Journal*, 81-90. doi:10.1016/j.cej.2012.06.028
- Dumont, E., Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., Thomas, D., . . . Le Cloirec, P. (2011). VOC absorption in a countercurrent packed-bed column using water/silicone oil mixtures: influence of silicone oil volume fraction. *Chemical Engineering Journal*, 168, 241-248.
- Esquivel-Viveros, A., Ponce-Vargas, F., Esponda-Aguilar, P., Prado-Barragán, L., Gutierrez-Rojas, M., Lye, G., & Huerta-Ochoa, S. (2009). Biodegradation of [bmim][PF6] using *Fusarium* sp. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 163-168.
- Fitch, M. W., Speitel, G., & Georgiou, G. (1996). Degradation of Trichloroethylene by Methanol-Grown Cultures of *Methylosinus trichosporium* OB3b PP358. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1124-1128.
- Fowler, D. (2002). Pollutant deposition and uptake by vegetation. En J. Bell, & M. Treshow, *Air Pollution and Plant Life* (2da ed., pág. 480). WILEY.
- Fu, J., Sharma, U., Sparling, R., Cicek, N., & Levin, D. (2014). Evaluation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* LS46 using biodiesel by-product streams. *Canadian Journal of Microbiology*, 60, 461-468.
- García, B., Olivera, E., Minambres, B., Fernandez-Valverde, M., Canedo, L., Prieto, M., . . . Luengo, J. (1999). Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 29228-29241.
- Garcia, M. T., Gathergood, N., & Scammells, P. J. (2004). Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chemistry*, 7, 9-14. doi:10.1039/b411922c
- Garikipati, S., & Peeples, T. (2015). Solvent resistance pumps of *Pseudomonas putida* S12: Applications in 1-naphthol production and biocatalyst engineering. *Journal of Biotechnology*(210), 91-99. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.419
- Gaszczak, A., Bartelmus, G., & Gren, I. (2012). Kinetics of styrene biodegradation by *Pseudomonas* sp. E-93486. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 565-573. doi:10.1007/s00253-011-3518-6

- Gathergood, N., Scammells, P. J., & García, M. (2006). Biodegradable ionic liquids Part III. The first readily biodegradable ionic liquids. *Green Chemistry*, 8, 156-160. doi:10.1039/b516206h
- Ge, D., & Lee, H. (2015). Ultra-hydrophobic ionic liquid 1-hexyl-3-methylimidazolium tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate supported hollow-fiber membrane liquid-liquid-liquid microextraction of chlorophenols. *Talanta*, 132, 132-136. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.074
- George, K. W., Kagle, J., Junker, L., Risen, A., & Hay, A. G. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* F1 on styrene requires increased catechol-2,3-dioxygenase activity, not a new hydrolase. *Microbiology*, 157, 89-98. doi:10.1099/mic.0.042531-0
- Giaroli, G. N., & Maggioni, A. A. (2015). *Producción de poliacidoláctico por ROP en la provincia de Buenos Aires. Estudio de Prefactibilidad*. Buenos Aires. Obtenido de http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8529/produccion-de-poliacido-por-rop.pdf
- Goff, M., Patrick, G., Kevin, W., & O'Connor, E. (2007). Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: A nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. *Journal of Biotechnology*, 132, 283-286. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.03.016
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100, 965-973.
- Harjani, J. R., Farrell, J., Garcia, M. T., Singer, R. D., & Scammells, P. J. (2009). Further investigation of the biodegradability of imidazolium ionic liquids. *Green Chemistry*, 11, 821-829. doi:10.1039/b900787c
- Hazrati, H., Shayegan, J., & Seyedi, S. M. (2015). Biodegradation kinetics and interactions of styrene and ethylbenzene as single and dual substrates for a mixed bacterial culture. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12. doi:10.1186/s40201-015-0230-y
- He, Q., Yan, Y., Li, H., Zhang, Y., Chen, L., & Wang, Y. (2015). Characteristics and reactivity of volatile organic compounds from non-coal emissions sources in China. *Atmospheric Environment*, 115, 153-162. doi:10.1016/j.atmosenv.2015.05.066
- Henderson, L., & Speit, G. (2005). Review of the genotoxicity of styrene in humans. *Mutation Research*, 589, 158-191.
- Hernandez, M., Quijano, G., Thalasso, F., Daugulis, A., Villaverde, S., & Muñoz, R. (2010). A comparative study of solid and liquid non-aqueous phases for the

- biodegradation of hexane in two-phase partitioning bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 731-740.
- Higgins, I., Hammond, R., Sariaslani, F., Best, D., Davies, M., Tryhorn, S., & Taylor, F. (1979). Biotransformation of hydrocarbons and related compounds by whole organism suspensions of methane-grown *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89, 671-677.
- 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. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.10.005
- Ignat'ev, N., Welz-Biermann, U., Kucheryna, A., Bissky, G., & Willner, H. (2005). New ionic liquids with tris(perfluoroalkyl)trifluorophosphate (FAP) anions. *Journal of Fluorine Chemistry*, 126(8), 1150-1159. doi:10.1016/j.jfluchem.2005.04.017
- Ikura, Y., Yoshida, Y., & Kudo, T. (1997). Physiological properties of two *Pseudomonas mendocina* strains which assimilate styrene in a two-phase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 604-607.
- Instituto Nacional de Ecología. (2007). *Inventario Nacional de Emisiones de México*.
- Itoh, N., Yoshida, K., & Okada, K. (1996). Isolation and Identification of Styrene-degrading *Corynebacterium* Strains, and Their Styrene Metabolism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1826-1830. doi:10.1271/bbb.60.1826
- Jang, J., Hirai, M., & Shoda, M. (2005). Performance of a Styrene-Degrading Biofilter Inoculated with *Pseudomonas* sp. SR-5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 297-302.
- Jantschak, A., Daniels, M., & Paschold, R. (2004). Biofilter Technology: An Innovative and Cost-Effective System to Remove VOC. *IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing*, 17(3), 255-260. doi:10.1109/TSM.2004.831936
- Jiang, B., Zhou, Z., Dong, Y., Tao, W., Wang, B., Jiang, J., & Guan, X. (2015). Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m- and p-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Comamonas* sp. JB. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 9. doi:10.1007/s12010-015-1671-6
- JianMing, Y., Liang, L., Wenji, C., JianMeng, C., & YiFeng, J. (2014). Identification and characteristics of a *Pseudomonas putida* strain with the capable of efficiently degrade styrene. *China Environmental Science*, 34(6), 1564-1571.

- Jiménez, E., & Villegas, A. (2005). Diseño de un sistema de biofiltración para la remoción de estireno. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia*(3), 9-20.
- Jorio, H., Brzezinski, R., & Heitz, M. (2005). A novel procedure for the measurement of the kinetics of styrene biodegradation in a biofilter. *Chemical Technology and Biotechnology*, 80(7), 796-804.
- Jung, I., & Park, C. (2005). Characteristics of styrene degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* isolated from a biofilter. *Chemosphere*, 61, 451-456.
- Kalia, V. (2019). *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-13-3759-8
- Karunanithi, A., & Farahipour, R. (2016). Ionic Liquid Product Design. In M. Martín, M. Eden, & N. Chemmangattuvalappil, *Tools for Chemical Product Design* (pp. 239-268). ELSEVIER. doi:10.1016/B978-0-444-63683-6.00009-5
- Keener, W., & Arp, D. (1994). Transformation of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 1914-1920.
- Kennes, C., & Vega, M. (2001). Bioreactors for waste gas treatment. *Kluwer Academic Publishers The Netherlands*, 305.
- Kesselmeier, J., Kuhn, U., Rottenberger, S., Biesenthal, T., Wolf, A., Schebeske, G., . . . Tavares, T. (2002). Concentrations and species composition of atmospheric volatile organic compounds (VOCs) as observed during the wet and dry season in Rondonia (Amazonia). *Journal of Geophysical Research*, 107(D20), 13. doi:10.1029/2000JD000267
- Kessler, B., & Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 86, 97-104.
- Khan, M. I., Zaini, D., Shariff, A. M., & Moniruzzaman, M. (2016). Framework for Ecotoxicological Risk Assessment of Ionic Liquids. *Procedia Engineering*, 148, 1141-1148. doi:10.1016/j.proeng.2016.06.567
- Kim, Y., & Lenz, R. (2001). Polyesters from microorganisms. En W. Babel, & A. Steinbüchel, *Biopolyesters* (págs. 51-79). Berlín: Springer.
- Kim, Y., & Lenz, R. (2001). Polyesters from microorganisms. In W. Babel, & A. Steinbüchel, *Biopolyesters* (pp. 51-79). Berlín: Springer.
- Kishi, R., Eguchi, T., Yuasa, J., Katakura, Y., Arata, Y., Harabuchi, I., . . . Masuchi, A. (2001). Effects of low-level occupational exposure to styrene on color vision: Dose relation with a urinary metabolite. *Environmental Research*, 85(1), 25-30.

- Kraakman, N., Rocha-Ríos, J., & van Loosdrecht, M. (2011). Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*, 873-886. doi:10.1007/s00253-011-3365-5
- Kusaka, S., Abe, H., Lee, S., & Doi, Y. (1997). Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutiric acid] produced in a recombinant Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *47*, 140-143.
- Kusumawardhani, H., Hosseini, R., & de Winde, J. (2018). Solvent Tolerance in Bacteria: Fulfilling the Promise of the Biotech Era? *Trends in Biotechnology*, *36*(10), 1025-1039.
- Lageveen, R., Huisman, G., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., & Witholt, B. (1988). Formation of Polyesters by Pseudomonas oleovorans: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates. *Applied Environmental Microbiology*, *54*(12), 2924-2932. doi:10.1128/AEM.54.12.2924-2932.1988
- Lee, S. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, *14*, 431-438.
- Lemoigne, M. (1926). Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide boxybutyrique. *Bulletin de la Société Chimique de France*, *8*, 770-782.
- Liu, C., Wang, H., Xing, W., & Wei, L. (2013). Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 9377-9387. doi:10.1007/s00253-013-5165-6
- Ludwig, B., Trotter, J. T., Gabrielson, J. P., Carpenter, J., & Randolph, T. W. (2011). Flow cytometry: A promising technique for the study of silicone oil-induced particulate formation in protein formulations. *Analytical Biochemistry*, *410*, 191-199. doi:10.1016/j.ab.2010.12.008
- Luttrell, W., & Willis, B. (2011). Toxic Tips: Styrene. *Journal of Chemical Health and Safety*, *2*.
- Manahan, S. (2000). *Environmental Chemistry* (7ma ed.). Boca Raton: Lewis Publishers.
- Mirpuri, R., Jones, W., & Bryers, J. D. (2000). Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm -grown cells of Pseudomonas putida 54G. *Biotechnology and Bioengineering*, *53*(6), 535-546.
- Montes, M., Veiga, M., & Kennes, C. (2012). Effect of oil concentration and residence time on the biodegradation of α -pinene vapours in two-liquid phase suspended-growth bioreactors. *Journal of Biotechnology*, *554*-563. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.07.019

- Mooney, A., Ward, P., & O'Connor, K. (2006). Microbial degradation of styrene: biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1-10.
- Mudliar, S., Giri, B., Padoley, K., Satpute, D., Dixit, R., Bhatt, P., . . . Vaidya, A. (2010). Bioreactors for treatment of VOCs and odours - A review. *Journal of environmental management*, 91(5), 1039-1054.
- Muñoz, R., Arriaga, S., Hernández, S., Guieysse, B., & Revah, S. (2006). Enhanced hexane biodegradation in a two phase partitioning bioreactor: Overcoming pollutant transport limitations. *Process Biochemistry*, 1614-1619. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.007
- Muñoz, R., Daugulis, A., Hernández, M., & Quijano, G. (2012). Recent advances in two-phase partitioning bioreactors for the treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances*, 30, 1707-1720.
- Mutafov, S., Angelova, B., Schmauder, H., Avramova, T., & Boyadjieva, L. (2004). Stoichiometry of microbial continuous-flow purification of toluene contaminated air. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 22-234.
- Nguyen, T., Rodríguez-Castillo, A., Guihéneuf, S., Biard, P., Paquin, L., Amrane, A., & Couvert, A. (2017). Toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor involving a hydrophobic ionic liquid as a non-aqueous phase liquid. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 117, 31-38. doi:10.1016/j.ibiod.2016.11.011
- Nijkamp, K., Maaik Westerhof, R., Ballerstedt, H., de Bont, J., & Wery, J. (2007). Optimization of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of p-coumarate from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 617-624. doi:10.1007/s00253-006-0703-0
- Nikodinovic, J., Kenny, S., Babu, R. P., Woods, T., Blau, W., & 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, 665-673. doi:10.1007/s00253-008-1593-0
- Nikodinovic-Runic, J., Casey, E., Duane, G., Mitic, D., Hume, A., Kenny, S., & O'Connor, K. (2011). Process Analysis of the Conversion of Styrene to Biomass and Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate in a Two-Phase Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2447-2455. doi:10.1002/bit.23187
- O'Leary, N., O'Connor, K., & Dobson, A. (2002). Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 403-417.

- Oelschlagel, M., Groning, J. A., Tischler, D., Kaschabek, S., & Schlomann, M. (2012). Styrene oxide isomerase of *Rhodococcus opacus* 1CP, a highly stable and considerably active enzyme. *Applied Environmental Microbiology*, *78*(12), 4330-4337.
- Oh, Y. S., Shareefdeen, Z., Baltzis, B. C., & Bartha, R. (1994). Interactions Between Benzene, Toluene, and p-Xilene (BTX) During Their Biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, *44*, 533-538.
- Ohara, H. (2003). Biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 474-477. doi:10.1007/s00253-003-1383-7
- Oliveira, M., Vidal, B., Melo, C., Miranda, R., Soares, C., Coutinho, J., . . . Lima, A. (2016). (Eco)toxicity and biodegradability of protic ionic liquids. *Chemosphere*, *147*, 460-466. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.11.016
- Osswald, P., Baveye, P., & Block, J. (1996). Bacterial influence on partitioning rate during the biodegradation of styrene in a biphasic aqueous-organic system. *Biodegradation*, *7*, 297-302.
- Palomo-Briones, R., Barba de la Rosa, A., & Arriaga, S. (2015). Effect operational parameters on methanol biofiltration coupled with Endochitinase 42 production. *Biochemical Engineering Journal*, 9-15.
- Parnian, P., Zamir, S., & Shojaosadati, S. (2016). Styrene vapor mass transfer in a biotrickling filter: effects of silicone oil volume fraction, gas-to-liquid flow ratio, and operating temperature. *Chemical Engineering Journal*, *284*, 926-933. doi:10.1016/j.cej.2015.08.148
- Parod, R. (2014). Styrene. *Encyclopedia of Toxicology*, 409-412. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00065-8
- Patel, M., Popat, S., & Deshusses, M. A. (2016). Determination and Correlation of the Partition Coefficients of 48 Volatile Organic and Environmentally Relevant Compounds Between Air and Silicon Oil. *Chemical Engineering Journal*, *310*, 72-78.
- Patrauchan, M. A., Florizone, C., Eapen, S., Gómez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., . . . Eltis, L. (2007). Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of Bacteriology*, *190*(1), 37-47. doi:10.1128/JB.01122-07
- Pérez-Rial, D., Lopez-Mahía, P., & Tauler, R. (2010). Investigation of the source composition and temporal distribution of volatile organic compounds (VOCs) in a suburban area of the northwest of Spain using chemometric methods. *Atmosphere Environmental*, *44*(39), 5122-5123.

- Pöschl, U. (2005). Atmospheric Aerosols: Composition, Transformation, Climate and Health Effects. *Angewandte Chemie*, 44, 7520-7540.
- Quijano, G., Couvert, A., Amrane, A., Darracq, G., Couriol, C., Le Cloirec, P., . . . Carrié, D. (2011). Potential of ionic liquids for VOC absorption and biodegradation in multiphase systems. *Chemical Engineering Science*, 66, 2707-2712.
- Quijano, G., Couvert, A., Amrane, A., Darracq, G., Couriol, C., Le Cloirec, P., . . . Carrié, D. (2011). Toxicity and biodegradability of ionic liquids: New perspectives towards whole-cell biotechnological applications. *Chemical Engineering Journal*, 174, 27-32. doi:10.1016/j.cej.2011.07.055
- Quijano, G., Couvert, A., Amrane, A., Darracq, G., Couriol, C., Le Cloirec, P., . . . Carrié, D. (2013). Absorption and Biodegradation of Hydrophobic Volatile Organic Compounds in Ionic Liquids. *Water, Air and Soil Pollution*, 224(1528), 9. doi:10.1007/s11270-013-1528-y
- Quijano, G., Hernandez, M., Villaverde, S., Thalasso, F., & Muñoz, R. (2010). A step-forward in the characterization and potential applications of solid and liquid oxygen transfer vectors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 543-551.
- Quijano, G., Revah, S., Gutierrez-Rojas, M., Flores-Cotera, L., & Thalasso, F. (2009). Oxygen transfer in three-phase airlift and stirred tank reactors using silicone oil as transfer vector. *Process Biochemistry*, 44, 619-624.
- Rehmann, L., Sun, B., & Daugulis, A. (2007). Polymer selection for biphenyl degradation in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biotechnology Progress*, 23, 814-819.
- Rene, E., Bernat, P., Dlugonski, J., Veiga, M., & Kennes, C. (2012). Use of styrene as sole carbon source by the fungus: optimization and modelling of biodegradation. Pathway Elucidation Cell Membrane Composed. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1351-1371.
- Rene, E., Montes, M., Veiga, M., & Kennes, C. (2011b). Styrene removal from polluted air in one and two-liquid phase biotrickling filter: Steady and transient-state performance and pressure drop control. *Bioresource Technology*, 6791-6800.
- René, E., Veiga, M., & Kennes, C. (2010). Biodegradation of gas-phase styrene using the fungus *Sporothrix variegatus*. impact of pollutant load and transient operation. *Chemosphere*, 79, 221-227.
- Rene, E., Veiga, M., & Kennes, C. (2011). Performance Evaluation and Neural Modelling of Gas-Phase Styrene Removal in One-and Two-Liquid Phase

Suspended-Growth Bioreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 6485-6495. doi:10.1021/ie102523j

- Rocha-Ríos, J., Quijano, G., Thalasso, F., Revah, S., & Muñoz, R. (2011). Methane biodegradation in a two-phase partition interal loop airlift reactor with gas recirculation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, 353-360.
- Rodríguez Castillo, A., Guihéneuf, S., Blard, P.-F., Paquín, L., Amrane, A., & Couvert, A. (2018). Impact of activated sludge acclimation on the biodegradation of toluene absorbed in a hydrophobic ionic liquid. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 621-630. doi:10.1007/s13762-017-1429-5
- Rojas Llanes, J. (2009). Evaluación de la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- α -pineno empleando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y *Apergillus niger* DSM 821. Bucaramanga, Colombia.
- Rueff, J., Teixeira, J., Santos, L., & Gaspar, J. (2009). Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure. *Clínica Química Acta*, 399, 8-23.
- Rustemov, S., Golovleva, L., Alieva, R., & Baskunov, B. (1992). New pathway of styrene oxydation by a *Pseudomonas putida* culture. *Microbiologica*, 65, 1-5.
- Ruthiya, K., Van der Schaaf, J., Kuster, B., & Schouten, J. (2003). Mechanisms of physical and reaction enhancement of mass transfer in a gas inducing stirred slurry reactor. *Chemical Engineering Journal*, 96, 55-69.
- Sabirova, J. (2010). Polyhydroxyalkanoates Produced by Hydrocarbon-Degrading Bacteria. En K. Timmis, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Vol. 4, págs. 2981-2994). Berlín: Springer.
- Sabirova, J., Ferrer, M., Lunsdorf, H., Wray, V., Kalscheuer, R., Steinbuchel, A., . . . Golyshin, P. (2006). Mutation in a "testB-Like" Hydroxyacyl -Coenzyme A-Specific Thioesterase Gene Causes Hyperproduction of Extracellular Polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8452-8459.
- Salar-García, M., Ortíz-Martínez, V., Hernández-Fernández, F., de los Ríos, A., & Quesada-Medina, J. (2017). Ionic liquid technology to recover volatile organic compounds (VOCs): A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 484-499. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.09.040
- San-Valero, P., Gabaldón, C., Peña-roja, J., & Quijano, G. (2017). Enhanced styrene removal in a two-phase partitioning bioreactor operated as a Biotrickling filter: Towards full-scale applications. *Chemical Engineering Journal*, 309, 588-595.

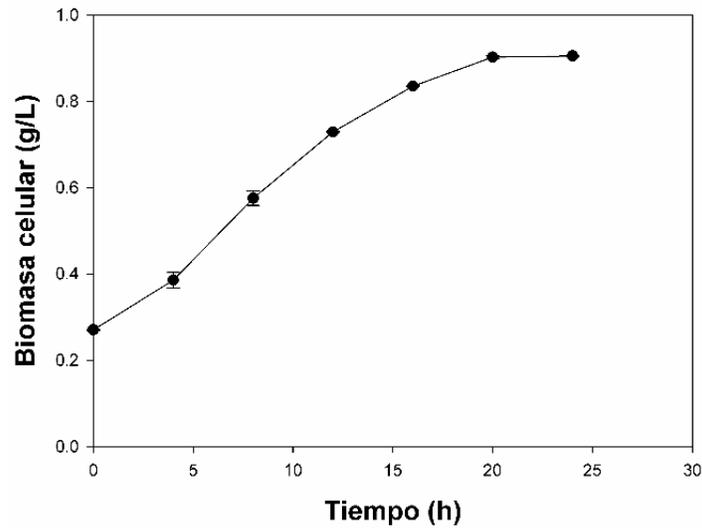
- Sato, E., Matsumoto, K., Okochi , H., & Igawa, M. (2006). Scavenging Effect of Precipitation on Volatile Organic Compounds in Ambient Atmosphere. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 79(8), 1231-1233.
- Sempere, F., Martínez-Soria, V., Palau, J., Peña-Roja, J., San-Valero, P., & Gabaldón, C. (2011). Effects of nitrogen source and empty bed residence time on the removal of styrene gaseous emissions by biotrickling filtration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 859-867. doi:10.1007/s00449-011-0536-9
- Śliwińska-Kowalska, M., Zamysłowska-Szmytke, E., Szymczak, W., Kotyło, P., Fiszer, M., Wesolowski, W., & Pawlaczyk-Luszczynska, M. (2003). Ototoxic effects of occupational exposure to styrene and co-exposure to styrene and noise. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 45(1), 15-24.
- Speijers, G. (1993). VOCs and the environment and public health-health effects. En H. Bioemen, & J. Burn, *Chemistry and Analysis of Volatile Organic Compounds in the Environment* (pág. 304). Springer-Science+Business Media.
- Steinbüchel, A. (2001). Perspectives fro biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyakanoate biosynthesis pathways as a succesful example. *Macromolecular Bioscience*, 1, 1-24.
- Stewart, R., Dodd, H., Baretta, E., & Schaffer, A. (1968). Human exposure to styrene vapor. *Archives of Environmental Health*, 16, 656-662.
- Tan, G., Chen, C., Ge, L., Li, L., Tan, S., & Wang, J. (2015). Bioconversion of Styrene to Poly(hydroxyalkanoate) (PHA) by the New Bacterial Strain *Pseudomonas putida* NBUS12. *Microbes and Environments*, 30(1), 76-85. doi:10.1264/jsme2.ME14138
- Thi Phuong, T., Chul-Woong, C., & Yeoung-Sang, Y. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research*, 44, 252-372. doi:10.1016/j.watres.2009.09.030
- Thomas, R. (1990). Evaluation of Toxicity of Volatile Organic Chemicals: General Considerations. En N. Ram, R. Christman, & K. Cantor, *Significance and Treatment of Volatile Organic Compounds in Water Supplies* (pág. 576). Lewis Publishers.
- Tischler, D. (2015). Pathways for the Degradation of Styrene. In D. Tischler, *Microbial Styrene Degradation* (1 ed., pp. 7-18). Springer. doi:10.1007/978-3-319-24862-2
- Tobin, K., & O'Connor, K. (2005). Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*, 111-118. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.025

- Toft, A., Hurley, M., Wallington, T., Andersen, M., & Nielsen, O. (2006). Atmospheric chemistry of C₄F₉(CH₂)₃OC₄F₉ and CF₃CFHCF₂(CH₂)₃OCF₃CFHCF₂: lifetimes, degradation products, and environmental impact. *Chemical Physics Letters*, 427, 41-46.
- Trigeros, D., Módenes, A., Kromov, A., & Espinoza-Quiñones, F. (2010). Modelling of biodegradation process of BTEX compounds: kinetic parameters estimation by using Particle Swarm Global Optimizer. *Process Biochemistry*, 1355-1351.
- U.S. Environmental Protection Agency. (19 de enero de 2017). *Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants*. Recuperado el agosto de 2020, de <https://www.epa.gov/haps/health-effects-notebook-hazardous-air-pollutants>
- Uragami, T. (2014). Volatile Organic Compounds. En E. Drioli, & L. Giorno, *Encyclopedia of Membranes* (pág. 2). Berlín: Springer. doi:10.1007/978-3-642-40872-4_596-1
- Vallero, D. (2014). Air Pollutant Hazards. En D. Vallero, *Fundamentals of Air Pollution* (pág. 214). Academic Press.
- Veiga, M. C., Fraga, M., Amor, L., & Kennes, C. (1999). Biofilter performance and characterization of a biocatalyst degrading alkylbenzene gases. *Biodegradation*, 10, 169-176.
- Wallen, L., & Rohwedder, W. (1974). Poly- β -hydroxyalkanoates from activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 8, 576-579.
- Ward, P. G., de Roo, G., & O'Connor, K. E. (2005). Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied Environmental Microbiology*, 71(4), 2046-2052. doi:10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005
- Yao, C., Pitner, W., & Anderson, J. (2009). (Pentafluoroethyl) Trifluorophosphate Anion: A New Class of Highly Selective and Ultra Hydrophobic Solvents for the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using. *Analytical Chemistry*, 81(12), 5054-5063. doi:10.1021/ac900719m
- Zamir, S., Babatabar, S., Abbas, S., & Shojaosadati, A. (2015). Styrene vapor biodegradation in single- and two-liquid phase biotrickling filters using *Ralstonia eutropha*. *Chemical Engineering Journal*, 21-27.
- Zhang, J., & Smith, K. (2003). Indoor air pollution: a global health concern. *British Medical Bulletin*, 68, 209-225.
- Zúñiga, C., Morales, M., Le Borgne, S., & Revah, S. (2011). Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 876-882. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.04.011

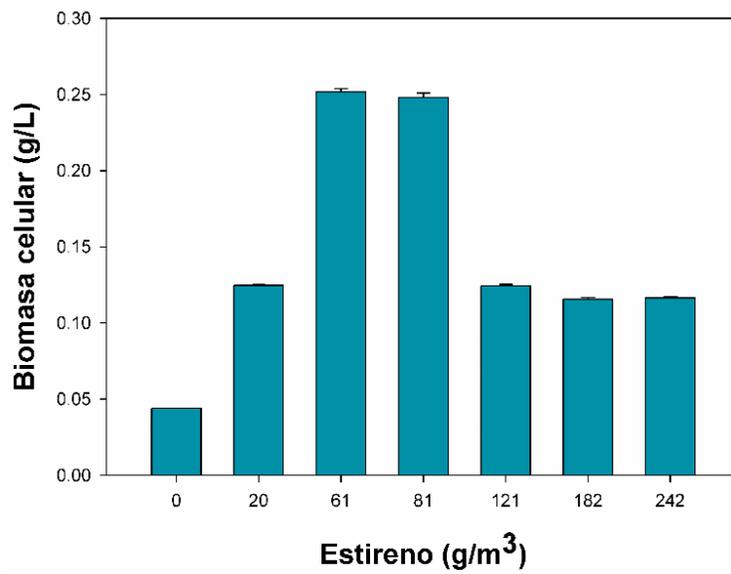
Zuñiga-Peña, N. (Enero de 2010). Degradación de metano en reactores de partición de dos fases líquidas y acumulación de PHB (Poli- β -hidroxibutirato). 93. Tesis de maestría.

11. ANEXOS

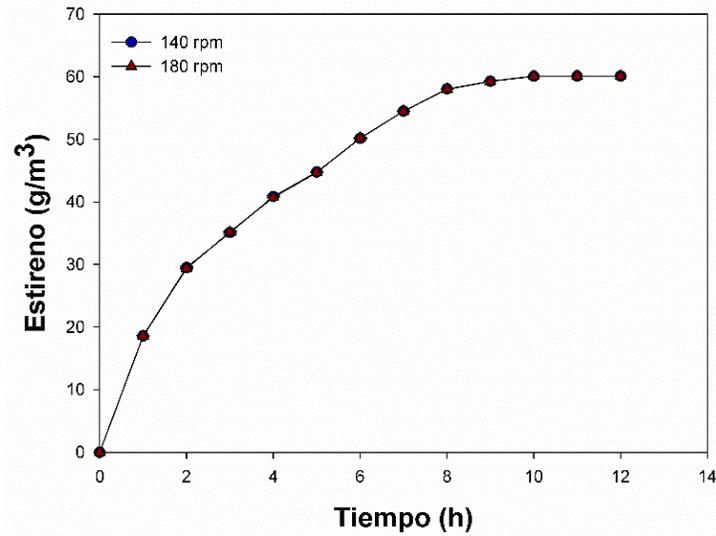
11.1 Cinética de crecimiento de *P. putida* S12 en medio nutritivo



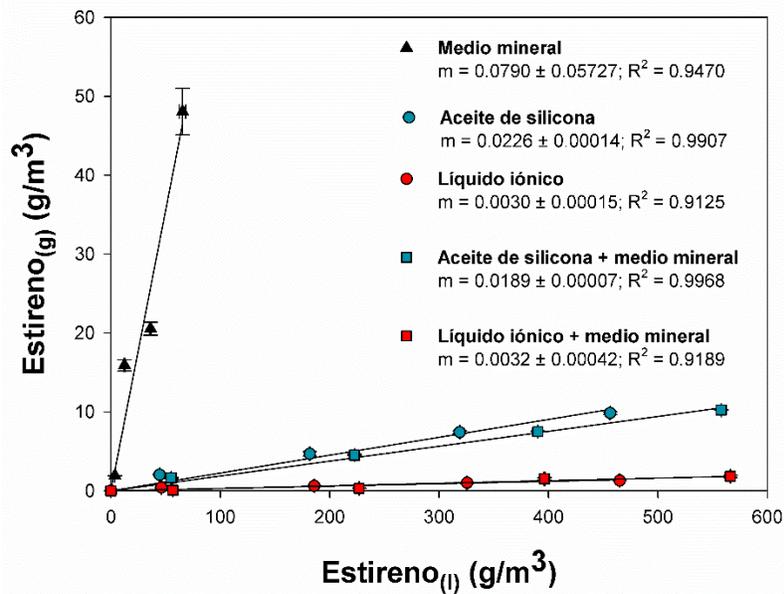
11.2 Concentración mínima inhibitoria de estireno para *P. putida* S12



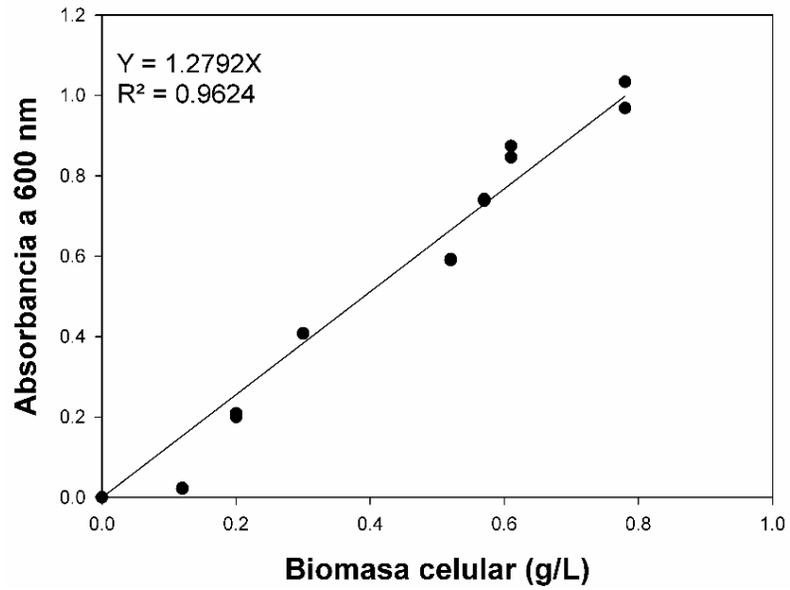
11.3 Cinéticas de crecimiento de *P. putida* S12 a 140 y 180 rpm



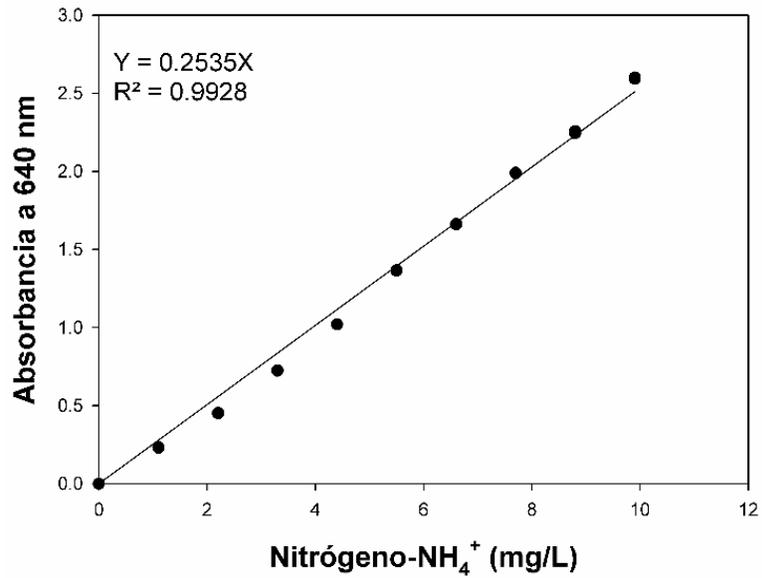
11.4 Método gráfico para la obtención del coeficiente de partición del estireno en el aceite de silicona y el líquido iónico puros y en mezcla al 5% v/v con medio mineral.



11.5 Curva de calibración de densidad óptica a 600 nm



11.6 Curva de calibración para la medición de amonio



11.7 Curva de calibración para la medición de estireno y CO₂

