



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES QUE PRODUCEN MALOS OLORES

Memoria de título presentada a la Universidad de Chile para optar al título de Bioquímico

Camilo Alberto Díaz Landaida

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del autor, Camilo Alberto Díaz Landaida.

Director de tesis

Dr. Felipe Scott Contador
Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas
Universidad de los Andes

Profesor Patrocinante

Dr. Davor Cotoras Tadic
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, 2022

Agradecimientos

En el camino de formarme académicamente y como profesional me han apoyado muchas personas. Este camino ha sido particularmente muy difícil ya que hubo situaciones complicadas. Fueron tiempos difíciles, pero hoy después de un tiempo la vida comienza a ordenarse y tomar sentido, gracias a esas personas que estuvieron ahí cuando lo necesité, que me han apoyado desde siempre.

Quiero agradecer a mi madre Cecilia que ha estado conmigo y me ha prestado su apoyo en todo lo que he necesitado; a Antonia mi hija que me ha dado las fuerzas, las energías y el amor para seguir adelante en los momentos difíciles; a mi hermana Pamela la cual ha sido confidente y amiga; agradezco también al profesor Felipe por darme la oportunidad, no solo de realizar la tesis con él, sino que también por tenerme paciencia y comprensión. Quiero agradecer a todas las personas que han estado conmigo y que hoy ya no lo están. A los y las que siguen conmigo y a esas personas que, aunque estemos alejados recuerdo siempre. Quiero agradecer a Paula que es una persona muy importante en mi vida y que confió en que iba a lograr terminar, a quien siempre recuerdo diciéndome “tú puedes”.

“La vida es simple, lo difícil es ser simple” (refrán popular).

Índice de contenido

Agradecimientos.....	2
Índice de contenido.....	3
Índice de Figuras	4
Abreviaturas.....	5
Resumen	6
Abstract.....	8
1 Introducción.....	10
1.1 Biodegradación.....	12
1.1.1 Biofiltros.....	13
1.1.2 Biolavadores	13
1.1.3 Biofiltros de lecho escurrido	14
1.1.4 Terminología de los biofiltros	16
1.1.4.1 Tiempo de residencia del lecho vacío (EBRT).....	16
1.1.4.2 Carga de entrada (CE)	16
1.1.4.3 Eficiencia de eliminación (EE) y capacidad de eliminación (EC)	17
1.2 Contaminantes	18
1.2.1 Metanol.....	18
1.2.2 2,5-dimetilpirazina (DMP)	18
1.3 Microorganismos.....	19
1.3.1 <i>Fusarium solani</i>	19
1.3.2 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	20
2 Hipótesis.....	22
3 Objetivo general	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4 Metodología.....	23
5 Resultados.....	29
5.1 Determinación de la capacidad de degradación de degradar metanol y 2,5-dimetilpirazina por <i>F. solani</i> y <i>R. erythropolis</i>	29
5.1.1 Metanol.....	29
5.1.2 2,5 dimetilpirazina	32
5.2 Comparar degradación de 2,5-dimetilpirazina con <i>F. solani</i> en medio líquido y medio sólido.	34
5.3 Determinación de la capacidad de eliminación de DMP de biofiltro de lecho escurrido inoculado con <i>F. solani</i>	38
5.4 Análisis de la comunidad microbiana del biofiltro de lecho escurrido	41
6 Discusión.	43
7 Conclusión.....	51
8 Referencias	52

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema comparativo de los tipos de biotecnologías.....	14
Figura 2. Esquema de biofiltro de lecho escurrido utilizado.....	28
Figura 3. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	30
Figura 4. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	31
Figura 5. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	31
Figura 6. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	32
Figura 7. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	33
Figura 8. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	34
Figura 9. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo.....	35
Figura 10. Gráfico de concentración de CO ₂ en fase gaseosa en función del tiempo.....	36
Figura 11. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en función del tiempo del ensayo de degradación de dmp en medio sólido.....	37
Figura 12. Gráfico de concentración de CO ₂ en fase gaseosa en función del tiempo del ensayo de degradación de dmp en medio sólido.....	38
Figura 13. Gráfico de concentración de DMP en el puntro de entrada del gas y en cada etapa del biofiltro en función del tiempo.....	39
Figura 14. Eficiencia relativa del biofiltro en función del tiempo.....	39
Figura 15. Gráfico de capacidad de eliminación en función de la carga de entrada.....	40
Figura 16. Análisis de la comunidad de hongos y bacterias a nivel de genero de las tres etapas del biofiltro de lecho escurrido que trataba DMP durante 40 días.....	42

Abreviaturas

CE: Carga de entrada

CODELCO: Corporación nacional del cobre de Chile

COPEC: Compañía de petróleos de Chile

COV: Compuestos orgánicos volátiles

DMP: 2,5-dimetilpirazina

EBRT: Tiempo de residencia del lecho vacío (*Empty bed residence time*)

EC: Capacidad de eliminación (*Elimination capacity*)

EE: Eficiencia de eliminación

ENAP: Empresa nacional del petróleo

HCMM3: Medio Hanging Lantern

ITS: Espaciador transcrito interno (*Internal transcribed spacer*)

LPM: Litros por minuto

M1: Medio mineral descrito en Rappert *et al.*

MM: Medio mineral de crecimiento de *F. solani*

OMS: Organización mundial de la salud

PVC: Cloruro de polivinilo

UTO: Unidad taxonómica operativa

Resumen

Existe una contaminación silenciosa que es desconocida para una gran parte de la comunidad, esta es la contaminación por compuestos orgánicos volátiles (COV), los que son desechados en los alrededores de plantas de tratamientos de aguas, refinerías de petróleo, procesamiento de alimentos, procesamientos de carne, etc. Estos pueden causar malos olores o en algunos casos llegan a ser tóxicos. Existen tecnologías que permiten mitigar la emisión de este tipo de contaminantes, entre las cuales se encuentran los métodos físicos, químicos y biotecnológicos. En este último se agrupan tres tipos de tecnologías: biofiltros, biolavadores y biofiltros de lecho escurrido los cuales se basan en el principio de la biodegradación. Esta consiste en el uso de microorganismos para remover contaminantes gaseosos en la cual se utilizan cepas heterotróficas de hongos o bacterias que utilizan los COVs como fuente de carbono o nitrógeno, o como fuente energética. Los biofiltros de lecho escurrido son biorreactores de lecho fijo en el cual los microorganismos forman una biopelícula en la superficie de este y son irrigados continuamente por una solución de nutrientes. La elección de microorganismos para inocular un biofiltro depende de la composición del aire contaminado y la capacidad de este para degradar uno de los compuestos presentes en él. *Fusarium solani* es un hongo filamentoso comúnmente encontrado en suelos, desechos orgánicos y plantas. Este tipo de hongo es capaz de degradar varios tipos de compuestos orgánicos desde hidrocarburos alifáticos y aromáticos hasta xenobióticos. En cuanto a *Rhodococcus erythropolis* (bacteria Gram-positiva) presenta una amplia diversidad catabólica y capacidades enzimáticas únicas. En este contexto es que se planteó utilizar un biofiltro de lecho escurrido inoculado con *F. solani* y *R. erythropolis* que degradara metanol y 2,5-dimetilpirazina. Para lo cual en primera instancia se procedió a determinar la capacidad

de cada microorganismo de degradar cada una de las sustancias. Una vez determinado el microorganismo y el o los contaminantes, correspondía dilucidar que medio era más propicio para su degradación y construir un biofiltro con el microorganismo. Se utilizaron microcosmos para evaluar la capacidad de degradación de metanol y DMP tanto de *F. solani* como de *R. erythropolis*. Esto se realizó en medio líquido con ambos y en medio sólido solo con el hongo. Se construyó el biofiltro con un lecho de vermiculita inoculado con *F. solani* y se midió la concentración de DMP en cada etapa. En todos los casos las mediciones de concentración de gases se realizaron con cromatografía gaseosa. Finalmente, luego de desmontar el biofiltro, se tomó una muestra de cada etapa de este para el análisis poblacional. Luego de varios ensayos de degradación *R. erythropolis* no mostró la capacidad de degradar metanol y tampoco DMP. Por otra parte, aunque *F. solani* no fue capaz de degradar metanol si lo hizo con DMP. También en medio sólido este hongo degrada DMP de manera más eficiente que en medio líquido. El biofiltro inoculado con *F. solani* tuvo una eficiencia relativa de aproximadamente un 75%. *F. solani* es el principal componente del biofiltro. Por lo cual, un biofiltro de lecho escurrido inoculado con *F. solani* es un método eficaz para la remoción de DMP del aire con una alta eficiencia.

Abstract

Volatile organic compounds biodegradation

There is a silent contamination that is unknown to a large part of the population, this is the contamination by volatile organic compounds (VOC) which are discarded in the surroundings of water treatment plants, oil refineries, food processing, rendering etc. These can cause bad odors or in some cases become toxic. There are technologies that allow mitigating the emission of this type of pollutants, among which are physical, chemical and biotechnological methods. In the latter three types of technologies are grouped: biofilters, bioscrubbers and biotrickling filters which are based on the principle of biodegradation. This is, the use of microorganisms to remove gaseous pollutants in which strains of heterotrophic fungi or bacteria use VOCs as a carbon or nitrogen source, and as an energy source. Biotrickling filters are fixed bed bioreactors in which microorganisms form a biofilm on the bed surface and are continuously irrigated with a nutrient solution. The choice of microorganisms to inoculate a biofilter depends on the composition of the contaminated air and its ability to degrade one of the compounds present in it. *Fusarium solani* is a filamentous fungus commonly found in soil, organic waste, and plants. This type of fungi is capable of degrading various types of organic compounds, from aliphatic and aromatic hydrocarbons to xenobiotics. *Rhodococcus erythropolis* (Gram-positive bacteria) has a wide catabolic diversity and unique enzymatic capabilities. In this context, it was proposed to utilize a biotrickling filter inoculated with *F. solani* and *R. erythropolis* that would degrade methanol and 2,5-dimethylpyrazine. For which, in the first instance, it was necessary to determine the capacity of each microorganism to degrade each of the substances. Once the microorganism and the contaminant(s) had been determined, it was necessary to determine which medium

was more appropriate to its degradation and to build a biofilter with the microorganism. Microcosms were used to evaluate the methanol and DMP degradation capacity of both *F. solani* and *R. erythropolis*. This was done in a liquid medium with both organisms and in a solid medium only with the fungus. The biofilter was built with a vermiculite bed inoculated with *F. solani* and the DMP concentration was measured in each stage. In all cases, gas concentration measurements were performed with gas chromatography. Finally, after disassembling the biofilter, a sample was taken from each stage of the biofilter for population analysis. After several degradation tests, *R. erythropolis* did not show the ability to degrade methanol and neither did DMP. On the other hand, although *F. solani* was not able to degrade methanol, it was able to degrade DMP. Also, in solid medium this fungus degrades DMP more efficiently than in liquid medium. The biofilter inoculated with *F. solani* had a relative efficiency of approximately 75%. *F. solani* was the main component of the biofilter. Therefore, a biotrickling filter inoculated with *F. solani* is an effective method for the DMP removal from the air with high efficiency.

1 Introducción

Actualmente la contaminación atmosférica es uno de los problemas, sino el mayor, para los seres que convivimos en este planeta. Debido a que, no solo puede afectar la salud de los humanos y el resto de los seres vivos, sino que, además se ha visto como tiene un efecto sobre el ecosistema, generando un cambio climático que, de no tomar medidas inmediatas, llevará a un ambiente inhabitable para los entes que residimos sobre la tierra. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) se estima que la contaminación del aire exterior proveniente de del uso de combustibles fósiles y la contaminación que se produce en las zonas urbanas es responsable de 3,1 millones de muertes prematuras en todo el mundo y de 3,2% de la carga mundial de enfermedades (Fuente: Organización Mundial de la Salud).

Existe una contaminación silenciosa que pasa desapercibida para la mayoría de las personas, ya que solo afecta a personas que habitan en sitios cercanos a cierto tipo de plantas de procesamiento. Esta es la contaminación producida por compuestos orgánicos volátiles (COV), estos suelen ser desechados a los alrededores de plantas de tratamiento de aguas, refinerías de petróleo, procesamiento de alimentos, procesamiento de carne, etc. La organización mundial de la salud sugirió una definición de COV: “todos los compuestos orgánicos con un punto de ebullición que se encuentre en un rango de 50°C a 260°C, excluyendo pesticidas (Kennes y Veiga, 2001). Este tipo de contaminantes pueden causar sólo molestias a las comunidades cercanas, como malos olores, o pueden incluso ser tóxicos (Alyasi y Isaifan, 2018). Esta toxicidad puede verse reflejada en que la exposición prolongada a algunos de estos compuestos orgánicos, especialmente benceno y compuestos policíclicos aromáticos, tiene incidencia en el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Kennes y Veiga, 2001).

En Chile se conocen dos casos emblemáticos sobre malos olores y toxicidad relacionada con COVs. El primero ocurre el año 2012 en la comuna de Freirina, provincia del Huasco, región de Atacama, donde una planta de procesamiento de carne de cerdo de la empresa Agrosuper producía malos olores, afectando así a la comunidad, la cual veía como sus casas apestaban y sus habitantes sufrían plagas de moscas. Los y las pobladores de esta comuna comenzaron a movilizarse, aspirando el cierre de la planta, lo que finalmente sucedió ese mismo año (Brancher *et al*, 2016). El segundo caso es más reciente y se trata de la emergencia sanitaria producida en las comunas de Quintero, Puchuncaví y Ventana, provincia de Valparaíso, región de Valparaíso, el segundo semestre del año 2018. Entre los meses de agosto y octubre de ese año comenzaron a producirse intoxicaciones masivas debido a la emisión de compuestos tóxicos entre los que pueden encontrarse compuestos sulfurados, nitrogenados, metales pesados y COV. Sin embargo, la identidad de los contaminantes que originaron la intoxicación en los habitantes de estas localidades no está clarificada. Cabe destacar que en esta zona se encuentran muchas empresas que emiten compuestos potencialmente tóxicos para la salud, como CODELCO, instalaciones de ENAP (Empresa Nacional del Petróleo), OXIQUIM, COPEC, entre otros. En la actualidad, continúan produciéndose casos de intoxicación, aunque con menor frecuencia, además aún no hay responsables a nivel penal (Céspedes y Rueda, 2019). Estos casos a nivel nacional y su impacto en el medio ambiente dan cuenta de que se necesita un avance en cuanto a políticas públicas que regulen el funcionamiento indiscriminado de este tipo de empresas.

Existen tecnologías que pueden mitigar la emisión de contaminantes, sin embargo, existen pocos esfuerzos, por parte de las autoridades y de las empresas, en querer utilizarlos. Entre las cuales se encuentran métodos físicos, químicos y biotecnológicos que, se caracterizan

porque involucran uno o más pasos de separación fisicoquímica entre el aire y los contaminantes (Delhoménie y Heitz, 2005). Entre los métodos físicos se encuentran la condensación, criocondensación, absorción, adsorción y el procesamiento por membranas. Los procesos químicos se basan en procesos de combustión, oxidaciones químicas o fotoquímicas. Por último, las biotecnológicas se agrupan en tres: biofiltros, biolavadores y biofiltros de lecho escurrido (Delhoménie y Heitz, 2005).

1.1 Biodegradación

A diferencia de los métodos químicos y físicos, y como su nombre lo sugiere la biodegradación consiste en el uso de microorganismos en la remoción de contaminantes gaseosos. Además, los procesos biológicos de degradación son de mayor utilidad para la eliminación de COV, como alcoholes, cetonas, aldehídos, compuestos aromáticos, etc., en concentraciones bajas (Devinny y Hodge, 1995; Kim, 2004). La principal ventaja que ofrece la alternativa biotecnológica de degradación es que la energía que se utiliza para que esta suceda, es la capacidad que poseen los microorganismos de metabolizar un amplio rango de COV utilizándolos como fuente de carbono y energía para la producción de nuevas células, agua y dióxido de carbono (Delhoménie y Heitz, 2005). Los microorganismos que se utilizan en biodegradación corresponden a cepas heterotróficas de hongos o bacterias las cuales pueden utilizar COV de dos maneras. La primera es que los contaminantes sean oxidados en el transcurso de alguna vía metabólica para la obtención de energía y, la segunda que estos compuestos sean una fuente de carbono o nitrógeno para crecimiento celular (Delhoménie y Heitz, 2005). Existen principalmente 3 métodos de biodegradación, el uso de biofiltros, biolavadores y biofiltros de lecho escurrido.

1.1.1 Biofiltros

Un biofiltro consiste en un biorreactor con lecho fijo en el cual los microorganismos se encuentran inmovilizados en la superficie de este, formando una biopelícula. Los contaminantes se hacen circular a través de este lecho, el cual debe ser de un material poroso y la oxidación de estos ocurre posteriormente a su difusión dentro de la biopelícula. Para este tipo de biofiltros existen dos configuraciones, una abierta, en la cual el gas fluye ascendentemente y su instalación se realiza en exteriores ya que, necesita espacios amplios. Y una cerrada, que requiere de volúmenes más pequeños y a menudo se construyen en espacios cerrados, además pueden emplear flujos ascendentes y descendentes (Ottengraf, 1986).

1.1.2 Biolavadores

Los biolavadores están conformados por dos subunidades: una columna de absorción y un biorreactor. La unidad de absorción los contaminantes gaseosos que ingresan son transferidos a la fase líquida que se encuentra dispersa, en forma de aerosol. Ambas fases (gaseosa y líquida) fluyen a contracorriente, como se aprecia en la Figura 1, se hace circular el gas con el contaminante desde abajo hacia arriba y el líquido desde arriba hacia abajo (Wu *et al.*, 2018). Este aspecto es común tanto como para los biofiltros como para los biofiltros de lecho escurrido. Sin embargo, lo que diferencia a los biolavadores de los demás métodos es que, poseen un biorreactor separado de la columna de biodegradación, en éste se encuentran las cepas de microorganismos suspendidos en una solución acuosa que contiene, además, los nutrientes necesarios para el crecimiento y el mantenimiento de estos (Ottengraf, 1987).

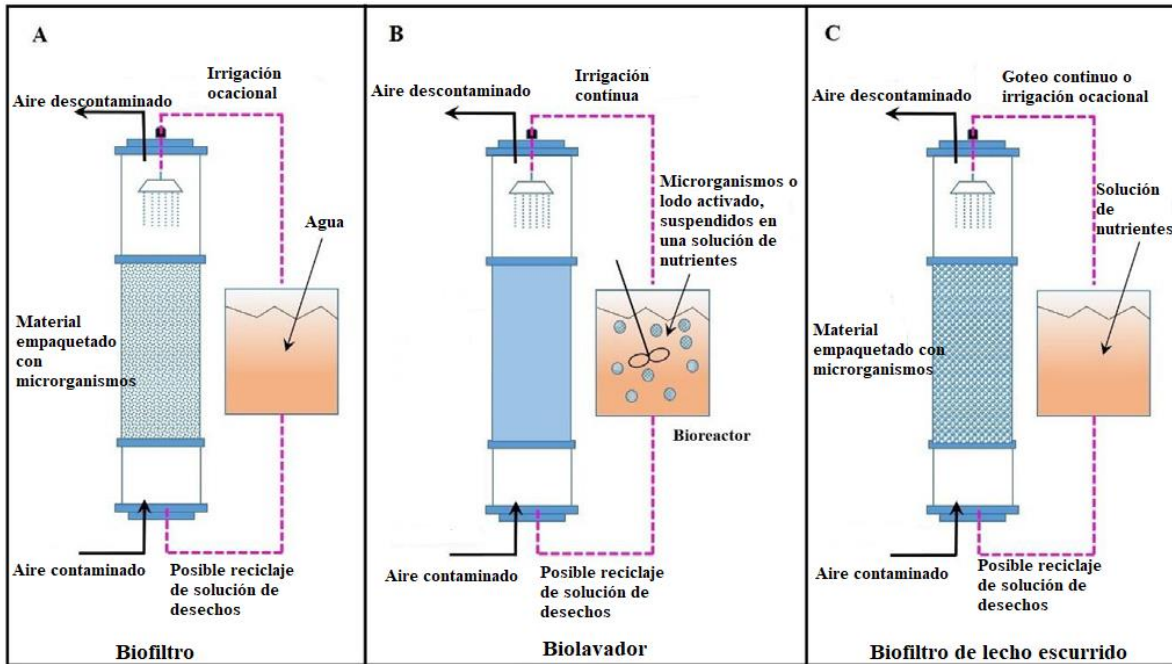


Figura 1. Esquema comparativo de los tipos de biotecnologías. A) Esquema de biofiltro, B) esquema biolavador y C) esquema biofiltro de lecho escurrido (adaptada de Wu, H. et al., 2018).

1.1.3 Biofiltros de lecho escurrido

En este tipo de biofiltros se utilizan lechos fijos por los cuales se hace circular el gas con el contaminante, pero, a diferencia de los biofiltros este lecho es continuamente irrigado por una solución de nutrientes (Delhoménie y Heitz, 2005). Su diseño consiste comúnmente de columnas hechas usualmente de vidrio o plástico en laboratorios, debido a que la transparencia de estos materiales permite observar fácilmente los cambios ocurridos al interior, y de lechos empacados (Hernandez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2010a). Sin embargo, a nivel industrial se utilizan columnas hechas de acero, plásticos reforzados con fibra de vidrio o polímeros (Chen *et al.*, 2014b). De igual manera que en los biofiltros los microorganismos forman una biopelícula sobre el lecho. Este tiene tres características fundamentales, facilitar el flujo de gas y líquido, favorecer el crecimiento de hongos o bacterias y resistir la compactación y compresión, además, deben estar hechos de materiales

inertes como plásticos estructurados, resinas, cerámicas, zeolita (tierra diatomácea), espuma de poliuretano y roca volcánica (Yamashita y Kitagawa, 1998, Sorial *et al.*, 1995; Loy *et al.*, 1997).

El funcionamiento de un biofiltro de lecho escurrido necesita que los contaminantes que se encuentran en la fase gaseosa y los nutrientes (nitrógeno, oxígeno, fósforo, etc.) estén disueltos en la fase líquida que rodea la biopelícula. El oxígeno y el contaminante gaseoso son transferidos a la fase acuosa desde el aire humidificado que se hace fluir a través del biofiltro, por diferencias entre la gradiente de concentración (Kraakman *et al.*, 2011; Lebrero *et al.*, 2012a).

Tabla 1. Tipos de tecnologías de biodegradación y sus características (adaptada de Delhoménie y Heitz, 2005).

	Microrganismos	Fase líquida	Degradación
Biolavador	Suspendidos en el biorreactor, en el medio nutritivo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Móvil ▪ Dispersada continuamente ▪ Se recicla 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La separación entre el aire y el contaminante ocurre dentro de la columna de absorción ▪ La oxidación del contaminante ocurre en el biorreactor.
Biofiltro de lecho escurrido	Inmovilizadas en el material empaquetado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Goteo continuo sobre el lecho ▪ Posible reciclaje 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ocurre en el lecho ▪ En la biopelícula
Biofiltro	Inmovilizadas en el material empaquetado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se irriga ocasionalmente el lecho con solución de nutrientes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ocurre en el lecho ▪ En la biopelícula

1.1.4 Terminología de los biofiltros

Es necesario definir ciertos conceptos usados ampliamente en el campo de la biofiltración y que serán de utilidad para comprender tanto los resultados como los términos tratados en esta tesis.

1.1.4.1 Tiempo de residencia del lecho vacío (EBRT)

Este término también llamado tiempo de contacto con el lecho vacío o tiempo de retención del lecho vacío, relaciona el flujo de entrada con el tamaño del biofiltro, es muy utilizado ya que, es un parámetro fácil de calcular y el rendimiento del biofiltro aumenta a medida que aumenta este parámetro ya sea aumentando el tamaño del biofiltro o disminuyendo el flujo de carga, sin embargo, normalmente el flujo se mantiene constante y se tienden a utilizar biofiltros de mayor tamaño (Devinny et al., 1999). Este se define de la siguiente manera:

$$EBRT = \frac{V}{Q}$$

Dónde:

EBRT: Tiempo de residencia del lecho vacío (min)

V: Volumen del lecho vacío (L)

Q: Flujo de entrada (L/min)

1.1.4.2 Carga de entrada (CE)

Es un término que utiliza para expresar la cantidad de contaminante que se desea eliminar a través el biofiltro y se define como la masa de contaminante alimentado (gramos) por unidad de volumen del biofiltro (m³) por unidad de tiempo (horas) (Devinny *et al.*, 1999).

$$CE = \frac{Q C_i}{V}$$

Dónde:

C_i : es la concentración de entrada del contaminante (gm^{-3})

V: Volumen del lecho vacío (L)

Q: Flujo de entrada (L/h)

1.1.4.3 Eficiencia de eliminación (EE) y capacidad de eliminación (EC)

Tanto la eficiencia de eliminación como la capacidad de eliminación son parámetros que se utilizan para evaluar el desempeño del sistema de biofiltración. Sin embargo, evalúan el rendimiento de diferente manera ya que, la eficiencia de eliminación o eficiencia relativa es la fracción de contaminante que es removida por el biofiltro expresada como porcentaje (Deviny et al., 1999). En cambio, la capacidad de eliminación es la masa de contaminante en gramos por unidad de volumen del biofiltro en metros cúbicos por unidad de tiempo en horas y sus fórmulas son las siguientes:

$$\text{Eficiencia de eliminación} = \left(\frac{C_i - C_o}{C_i} \right) \times 100$$

$$\text{Capacidad de eliminación} = \frac{Q}{V} (C_i - C_o)$$

Dónde:

V: Volumen del lecho vacío (L)

Q: Flujo de entrada (L/h)

C_i : concentración de entrada del contaminante (gm^{-3})

C_o : concentración de salida del contaminante (gm^{-3})

1.2 Contaminantes

1.2.1 Metanol

También conocido como alcohol metílico o alcohol de madera es comúnmente utilizado como solvente orgánico y reactante en procedimientos de síntesis orgánica (Tephly, 1991). Además, se encuentra en las emisiones gaseosas en la industria de procesamiento de subproductos de la carne (*Rendering*) (Guerra *et al*, 2017). Este compuesto ha sido reconocido como tóxico para humanos debido a su uso como sustituto para etanol en bebidas alcohólicas y los síntomas de intoxicación que se han reportado son: depresión del sistema nervioso central, acidosis metabólica (severa en casos de una ingesta de gran cantidad); toxicidad ocular seguida de ceguera, coma y muertes (Tephly, 1991). En cuanto a su exposición en forma gaseosa, se ha observado que puede tener un pequeño efecto en mediciones neuroconductuales en humanos (Cook *et al.*, 1991).

1.2.2 2,5-dimetilpirazina (DMP)

Las pirazinas son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno encontrados principalmente en comida procesada donde se forman principalmente durante procesos de calentamiento (Rappert *et al*, 2006). Las alquilpirazinas se encuentran generalmente en una gran variedad de comidas, bebestibles y en el aire de las fábricas que procesan alimentos (Maarse, 1991; Rappert and Müller, 2005a). DMP es la principal pirazina detectada en alimentos fermentados basados en soya y cacao, la cual contribuye significativamente a sus sabores (Besson *et al*, 1997). Aunque las pirazinas huelen más o menos agradablemente, su concentración relativamente alta, así como su continua producción y su presencia permanente, las hacen contaminantes que en largo plazo molestan a los vecinos de comunidades cercanas a las industrias que los emiten (Rapper *et al*, 2006). Se ha descubierto

que DMP es una de las pirazinas alquiladas con el olor más intenso entre compuestos volátiles que se emanan de industrias que procesan cacao y café (Nagorny and Francke, 2005; Ranau and Steinhart, 2004; Ranau et al, 2005).

1.3 Microorganismos

La selección de microorganismos adecuados para inocular en un biofiltro depende de la composición del aire contaminado y por la capacidad que posea un microorganismo para degradar un compuesto que se encuentre en este. A veces un solo microorganismo es capaz de degradar el contaminante y en otras oportunidades esta labor puede ser desarrollada por un consorcio de microorganismos. Para lograr una biodegradación eficiente es necesario que se utilicen microorganismos heterótrofos, los cuales usan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono (Bajpai et al., 1999). En general muchas investigaciones se enfocan en bacterias, sin embargo, los hongos también han sido utilizados en procesos de biofiltración (Spigno *et al.*, 2003; Garcia-Pena *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 1997). En particular el tipo hongos filamentosos han mostrado buenos resultados en la degradación de compuestos orgánicos volátiles especialmente los contaminantes hidrofóbicos. Además, este tipo de hongos tienen la capacidad de eliminar una gran variedad de contaminantes (Arriaga, S. y Revah, S., 2005). El uso de hongos en biofiltros ha mostrado un mejor rendimiento al degradar los compuestos más lipofílicos, esto se debe a que los hongos presentan en su superficie celular unas proteínas llamadas hidrofobinas y a la capacidad que poseen de formar hifas, lo que permite una mayor área de contacto con el gas circundante (Vergara-Fernandez et al., 2008).

1.3.1 *Fusarium solani*

Fusarium solani es un hongo blanquecino filamentoso que pertenece a la división Ascomycota y es la forma reproductiva asexual de *Netria haematococca* comúnmente

encontrado en suelos, desechos orgánicos y plantas (Zaccardelli et al., 2008). El uso de hongos filamentosos en biofiltración se debe a su capacidad de soportar ambientes con un pH relativamente ácido, además de adaptarse de buena manera a condiciones de baja humedad. Existe evidencia de que este tipo de hongos, como *F. solani*, son capaces de degradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos con una alta hidrofobicidad, sustratos poliméricos y compuestos xenobióticos, como su única fuente de carbono, debido a la gran variedad de enzimas que posee (Qi et al., 2002). En este sentido, existe evidencia de una proteína putativa homóloga a la enzima metanol deshidrogenasa en *F. solani*, permitiendo inferir que posee la capacidad de degradar metanol (Coleman, J. et al., 2009). En cuanto a DMP, la enzima que es capaz de degradarlo es la monooxigenasa de flavina (Rappert, S., et al., 2007) y aunque, no se ha reportado que *F. solani* sea capaz de degradarlo la presencia de monooxigenas ha sido ampliamente reportada en este y varios hongos (Weber *et al*, 1995; Syed *et al*, 2013).

1.3.2 *Rhodococcus erythropolis*

Rhodococci están descritos como microorganismos aeróbicos, Gram positivos, no móviles, presentan un crecimiento micelial con fragmentación en elementos con forma de bastón o cocoides y han sido aisladas desde múltiples lugares como suelos, rocas, aguas subterráneas, sedimentos marinos, heces de animales, al interior de insectos y desde animales y plantas (Goodfellow, 1989a; Ivshina *et al*, 1994). Presentan una amplia diversidad catabólica y capacidades enzimáticas únicas que tienen una gran importancia ambiental y biotecnológica (Warhurst and Fewson, 1994; Bell *et al*, 1998). Son resistentes a un gran número de compuestos recalcitrantes y presentan una habilidad excepcional para degradar compuestos hidrofóbicos naturales y xenobióticos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos,

bifenilos policlorados y dibenzotiofenos (De Carvalho y Da Fonseca, 2005). *Rhodococcus erythropolis* contienen una gran cantidad de enzimas que le permiten llevar a cabo variados tipos de degradaciones y bioconversiones como oxidaciones, deshidrogenaciones, epoxidaciones, hidrolisis, hidroxilaciones, deshalogenaciones y desulfuraciones (De Carvalho y Da Fonseca, 2005). Rappert *et al* (2006), lograron aislar una cepa de *R. erythropolis* proveniente de una planta de procesamiento de aguas, capaz de degradar 2,5-dimetilpirazina. Por último, también se ha identificado que *Rhodococcus erythropolis* posee la enzima metanol deshidrogenasa (Egelkamp, R., et al, 2017).

En este trabajo se estudió la degradación de los compuestos antes mencionados por *R. erythropolis* y *F. solani*, debido a las características que presentan ambos microorganismos, que poseen una gran gama de enzimas capaces de degradar un gran número de compuestos, con la finalidad de utilizarlos en la construcción de un biofiltro, y determinar la capacidad de eliminación de este último frente a un determinado contaminante.

2 Hipótesis

Biofiltro inoculado con *Rhodococcus erythropolis* y *Fusarium solani* es capaz de degradar DMP y metanol con una buena eficiencia de eliminación de los contaminantes.

3 Objetivo general

Determinar si *F. solani* y *R. erythropolis* son capaces de degradar metanol y DMP para su uso en la construcción de un biofiltro de lecho escurrido que permita eliminar estos compuestos con una alta tasa de eliminación.

3.1 Objetivos específicos

- 1) Determinar si *F. solani* y *R. erythropolis* son capaces de degradar metanol y 2,5-Dimetilpirazina.
- 2) Comparar degradación de 2,5-dimetilpirazina con *F. solani* en medio líquido y medio sólido.
- 3) Determinar capacidad de eliminación de DMP de biofiltro de lecho escurrido inoculado con *F. solani*.
- 4) Analizar la comunidad microbiana del biofiltro de lecho escurrido

4 Metodología

Objetivo específico 1. Determinar si *F. solani* y *R. erythropolis* son capaces de degradar metanol y 2,5-dimetilpirazina.

Microorganismos y cultivo. *Fusarium solani* CBS 117476 descrita y aislada según Arriaga y Revah 2005a, se propagó y mantuvo en agar papa-dextrosa en una incubadora a 30°C por 2 semanas. Luego de esto, una muestra del hongo tomada con un asa se agregó a un matraz con 200 ml de medio mineral, que se preparó con los compuestos y sus respectivas concentraciones mostradas en la tabla 2. Posteriormente se adicionó glicerol hasta obtener una concentración de 1 g/L. Para *R. erythropolis* DSM 43066 se obtuvo de la colección alemana de microorganismos y cultivos de células (DSMZ, Alemania). Esta se propagó en matraces Erlenmeyer los cuales contenían 200 ml de medio complejo nutritivo, compuesto por glucosa (4 g/L), extracto de levadura (4 g/L) y extracto de malta (10 g/L) durante 3 días. Posteriormente se procedió a centrifugar las células a 4000 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservó la pella. Se continuó con el lavado resuspendiendo las bacterias en medio mineral correspondiente ya sean, el mismo medio preparado para propagación de *F. solani* (tabla 1), medio M1 (Rappert) o medio HCMM3 (Juteau *et al.*, 1999) (tabla 2) con el propósito de eliminar restos de medio nutritivo y su posterior uso. Para el medio M1 se utilizó en g/L; 2.5 de K_2HPO_4 , 1.0 de KH_2PO_4 , 2.0 de $(NH_4)_2SO_4$ y 0.2 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Tabla 2. Sales utilizadas para la preparación del medio mineral de propagación de *F. solani* y sus respectivas concentraciones.

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
NaNO ₃	18	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.012
KH ₂ PO ₄	1.3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.013
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.38	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0023
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.25	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
CaCl ₂	0.055	H ₃ BO ₃	0.0015
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.015		

Tabla 3. Sales utilizadas para preparar del medio HCMM3 que se utilizó en los ensayos de degradación tanto para *F. solani* como para *R. erythropolis* y sus respectivas concentraciones en la unidad de medida de g/L

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	1.36	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.54·10 ⁻⁶
Na ₂ HPO ₄	1.42	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	3.53·10 ⁻⁶
KNO ₃	0.5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.90·10 ⁻⁶
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.38	ZnCl ₂	2.10·10 ⁻⁶
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	CoCl ₂ ·6H ₂ O	4.10·10 ⁻⁶
CaCl ₂	0.01	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.50·10 ⁻⁶
H ₃ BO ₄	2.86·10 ⁻⁶		

Ensayo de degradación medio líquido. Cada uno de los organismos fue incubado por 5 o más días a 30° C con agitación en botellas de vidrio de 125 ml tapadas con válvulas de teflón Mininert (VICI Precision Sampling, Baton Rouge, LA), a las cuales se le administró el compuesto correspondiente (metanol y 2,5-dimetilpirazina) en un volumen final de 50 ml. Previo a cada medición se procedió a realizar la técnica de *headspace*, para conseguir un equilibrio de las concentraciones del líquido y del gas, esto se realizó incubando a 30 °C por 30 min. La medición de los compuestos se realizó por medio de cromatografía gaseosa en el cromatógrafo de gases SHIMADZU GC-2014 con detector

FID con una columna de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno marca Restek y grosor de filme 0,25 µm. Para la medición de metanol se precedió con una temperatura del inyector de 200°C, columna a 80°C y detector de 200°C, con un tiempo de corrida de 2 minutos. En cuanto a DMP se utilizó la temperatura de inyector de 250°C, columna 220°C y detector de 250°C por un tiempo de corrida de 4 minutos. La inyección fue de 0,5 ml de la fase gaseosa obtenida al realizar *headspace*.

Objetivo específico 2. Comparar degradación de 2,5-dimetilpirazina con *F. solani* en medio líquido y medio sólido.

Ensayo de degradación medio sólido. Para este ensayo se utilizó viales de vidrio de 10 ml los cuales fueron sellados con precintos circulares de aluminio y septos de PTFE (politetrafluoroetileno). A estos se les agrego aproximadamente 0,5 g de vermiculita previamente lavada, esterilizada y dejada a secar en una estufa a 100°C por 24 horas. Se agregó medio mineral hasta alcanzar el volumen ocupado por la vermiculita y DMP a una concentración de 1.0 g/L, por último, se adicionó *F. solani*. Para la medición de DMP se procedió de la misma manera que en la medición en medio líquido, es decir, utilizando *headspace* y cromatografía gaseosa.

Objetivo específico 3. Determinar capacidad de eliminación de DMP de biofiltro de lecho escurrido inoculado con *F. solani*.

Instalación de Biofiltro de lecho escurrido. Este fue armado con una columna de cloruro de polivinilo (PVC) de 1,36 m de altura y un diámetro interno de 7,5 cm. Separado en tres etapas de iguales dimensiones. Cada etapa fue llenada con 82 g de vermiculita. La columna poseía un puerto para toma de muestra tanto en fondo como

en la cima, y además tenía un puerto para toma de muestra en cada etapa ubicados a igual distancia. La humedad del lecho (vermiculita) se monitoreó con una unidad lectora ECH20 PROCHECK equipada con sensores de humedad EC-5 (DecagonDevices Inc.) los cuales son capaces de medir humedad en casi cualquier tipo de suelo o soporte mineral. La humedad establecida para la continuidad de este estudio fue definida entre 70 y 80% de humedad de acuerdo con Vergara-Fernández et al. (2008). Para hacer fluir el contaminante a través del biofiltro se utilizó un compresor de aire dividido en dos corrientes, una desviada hacia un humidificador de aire que y la otra hacia el DMP puro. Para el control de entrada de aire y DMP se utilizó controladores de flujo de precisión (Cole-Palmer) con flujos de entrada de 1,97 LPM para el aire (antes de pasar por el humidificador) y 0,04 LPM hacia el contenedor de DMP puro. Con un tiempo de residencia del lecho vacío (EBRT) de 155 s. La corriente de aire hacia el contaminante finalizaba en un difusor de vidrio que permitía la vaporización del compuesto. El humidificador consistía en una columna de PVC de 8 cm de diámetro y 80 cm de alto llenada con agua hasta completar 40 cm. El aire bombeado pasaba a través del humidificador se unía al aire bombeado hacia el contaminante para finalmente ingresar a la columna

Operación del Biofiltro. Para iniciar el funcionamiento del biofiltro se procedió a suministrar *F. solani*, para esto se utilizaron tres matraces Erlenmeyer con 500 ml de medio mineral más glicerol a una concentración de 1g/L en los cuales se propago el hongo por 1 semana, luego se mezcló con la vermiculita seca y estéril, y se introdujo en cada etapa, iniciando en la más baja (ver Figura 2). Luego de finalizar la instalación al sellar cada etapa después de poner la vermiculita con el hongo, se conectó desde la

base un tubo que contiene el contaminante en aire húmedo. Con una bomba peristáltica se hacía recircular el medio a 10 revoluciones por minuto y se adicionaba medio mineral una vez por semana. Para la mantención de la temperatura del biofiltro se utilizó un Mini calentador de ventilador de aire eléctrico conectado a un controlador de temperatura Pid Rex-C100 con termocupla. La temperatura de funcionamiento se estableció en 30°C, la cual se encuentra en el rango óptimo (10 a 35°C) para hongos (Vergara-Fernández, Salgado-Ísmodes, Pino, Hernández, & Revah, 2012).

Toma de muestra. Las muestras fueron tomadas desde los puertos de muestreo ubicados en cada una de las etapas (ver Figura 2) con jeringas para gas SampleLock™ Gastight®, Series 1000 y 1700, Hamilton de 500 µl. La cuantificación de las muestras se efectuó, para el contaminante, con el mismo cromatógrafo GC-2014 Shimadzu con detector FID equipado con una columna de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno marca Restek y grosor de filme 0,25 µm. Además, se midió la producción de CO₂ para determinar la capacidad de eliminación del biofiltro, para lo cual se utilizó el mismo cromatógrafo que también tiene equipado un detector TCD acoplado a una columna de 4,6 m, 3,17 mm de diámetro interno (Carboxen 1000). El programa de medición para el dióxido de carbono consistió en una temperatura del inyector de 150° C, columna 200° C y detector de 220°C.

5 Resultados

5.1 Determinación de la capacidad de degradación de degradar metanol y 2,5-dimetilpirazina por *F. solani* y *R. erythropolis*.

5.1.1 Metanol

Para determinar si los microorganismos descritos eran capaces de degradar metanol se realizó el ensayo de degradación en microcosmos con medios distintos para cada uno de ellos. En el caso de *R. erythropolis* se utilizó medio M1 el cual se consideró como el medio óptimo para esta bacteria, y el medio mineral descrito en la tabla 2. En el caso de *F. solani* se utilizó medio mineral descrito en la tabla 2 considerando este como medio óptimo.

En un comienzo se procedió a determinar si *R. erythropolis* era capaz de degradar metanol, para lo cual se cultivó en un microcosmo con 50 ml con una concentración inicial de metanol en la fase líquida igual a 0,5 y 1,0 g/L en las botellas de 125 ml. En la figura 1 se muestra el gráfico que representa la concentración de metanol en la fase gaseosa contra el tiempo a una concentración inicial en el líquido de 0,5g/L. En esta se puede observar que no existe una clara diferencia entre el control y la muestra debido a que no se puede apreciar que la botella control se mantenga constante en el tiempo. En la discusión se abordará este tema con más detenimiento. Sin embargo, para tener una mejor visualización de los resultados es que se realizó el ensayo en una concentración mayor inicial en la fase líquida. Esto se puede ver en la figura 2 en la cual se observa que la variación entre la botella muestra y control es mínima. Además, hay que notar que la botella con *R. erythropolis* no muestra disminución del

contaminante de forma similar al control. Se probó los diferentes medios descritos en las tablas 2 y 3 obteniendo resultados similares a los que se muestran en la Figura 4

En cuanto a *F. solani* se realizaron los ensayos de la misma manera que para *R. erythropolis*, con la diferencia de que no se utilizó el medio M1 debido a que este microorganismo necesita más minerales para degradar de manera óptima (Vergara-Fernández *et al.*, 2011) los medios que se utilizaron fueron los descritos en la tabla 2 y 3.

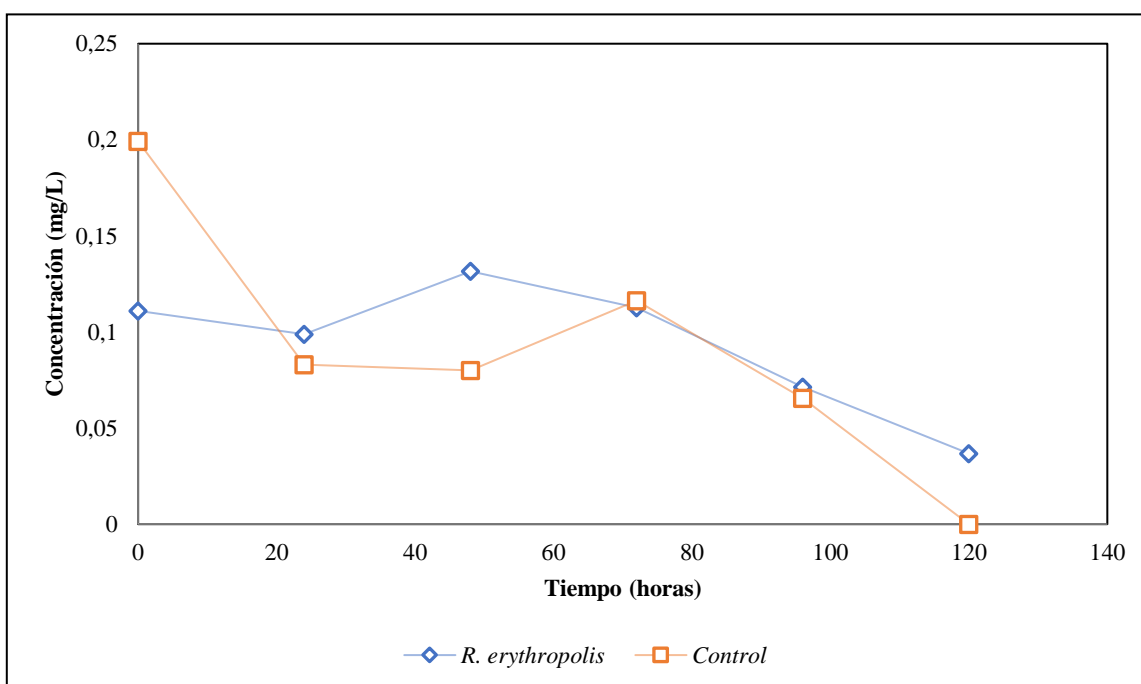


Figura 3. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de metanol en líquido de 0,5 g/L (Medio M1). Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella con *R. erythropolis* y los cuadrados anaranjados corresponden a la botella control.

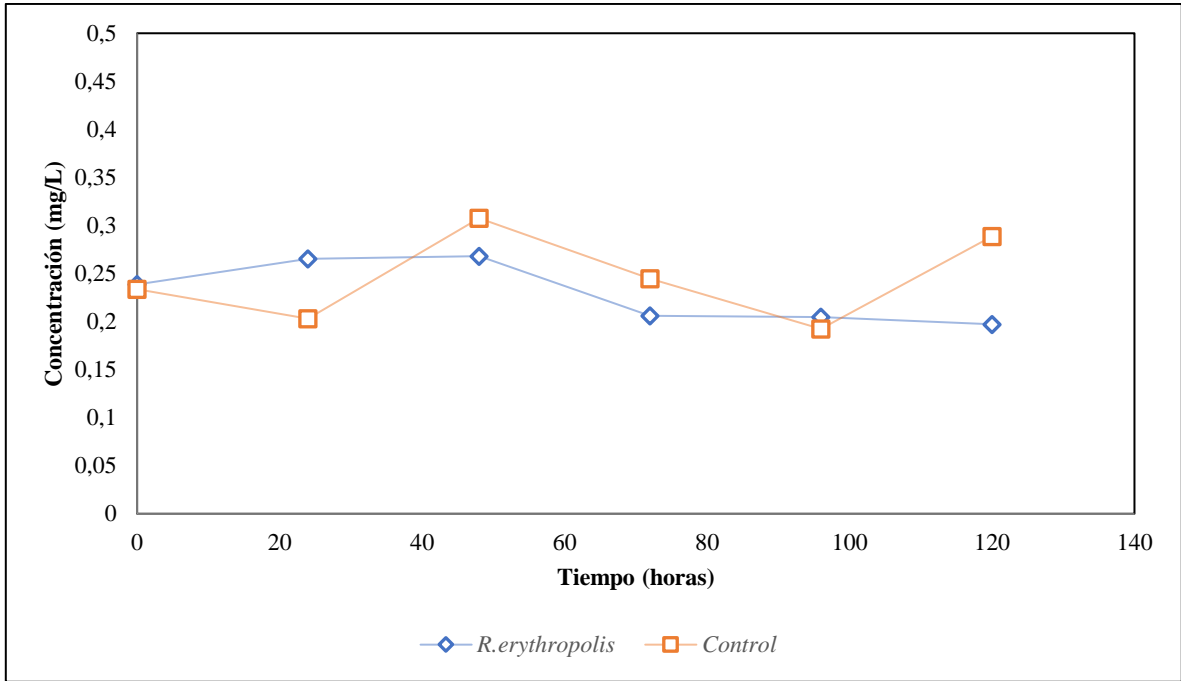


Figura 4. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de metanol en líquido de 1,0 g/L (medio MI). Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella con *R. erythropolis* y los cuadrados anaranjados corresponden a la botella control.

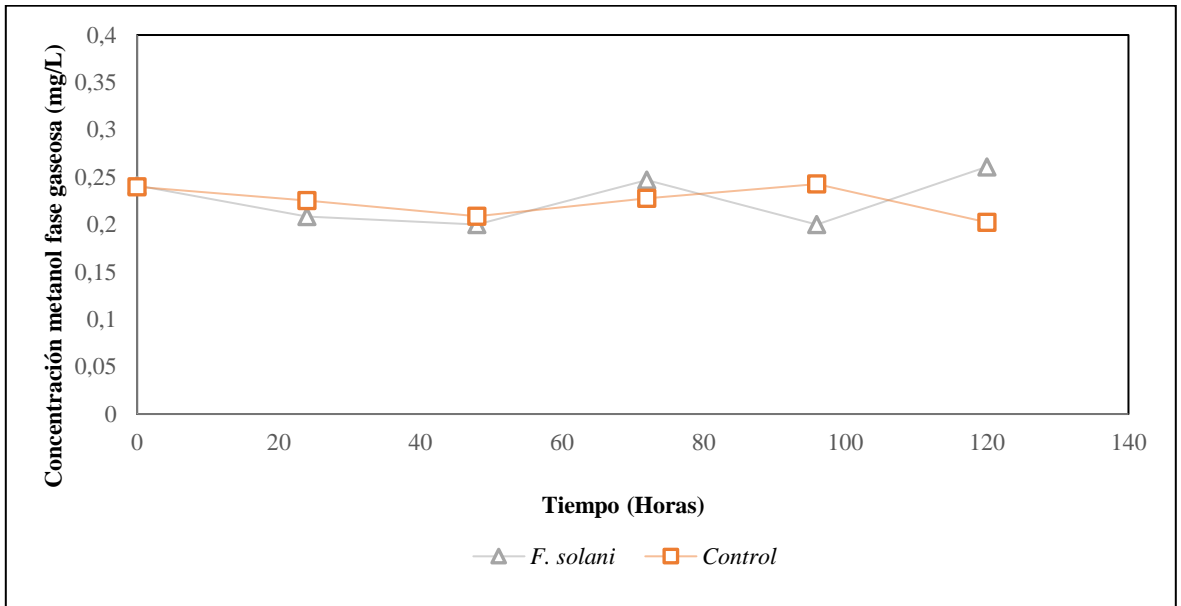


Figura 5. Gráfico de concentración de metanol en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de metanol en líquido de 1,0 g/L (medio mineral). Triángulos grises corresponden a las mediciones de la botella con *F. solani* y los cuadrados anaranjados corresponden a la botella control.

En la figura 5 se muestra el ensayo de degradación de metanol con *F. solani* con una concentración inicial de metanol en la fase líquida de 1,0 g/L en medio descrito en la tabla 2. En ese se observa que no pareciera mostrar consumo de metanol por parte del hongo en comparación con el control y al intentarlo con el medio HCMM3 el resultado es similar.

5.1.2 2,5 dimetilpirazina

Los ensayos de degradación con DMP se realizaron de igual manera que con metanol utilizando los mismos medios y mismas concentraciones. En el caso de *R. erythropolis* se utilizó el medio M1 y el medio HCMM3 y para *F. solani* medio mineral y medio HCMM3. En ambos ensayos se utilizaron varias concentraciones del contaminante, sin embargo, solo se mostrarán los resultados para las concentraciones de 1 g/L de concentración inicial en el líquido. los resultados para *R. erythropolis* en medio M1 se muestran en la Figura 6.

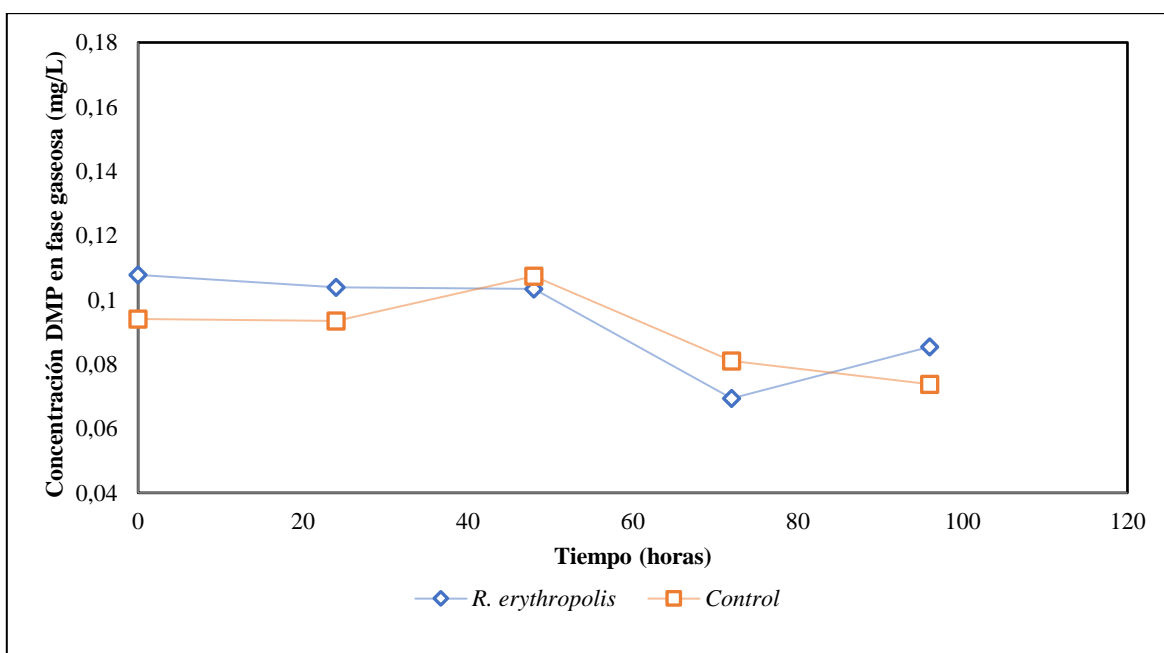


Figura 6. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de DMP en líquido de 1,0 g/L (Medio M1). Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella con *R. erythropolis* y los cuadrados anaranjados corresponden a la botella control.

En el caso de *F. solani* la Figura 7 muestra las mediciones a lo largo de los días del ensayo de degradación con DMP en medio HCMM3. Además, se incluyó en el gráfico las mediciones hechas para el ensayo *R. erythroplis* en el mismo medio como comparación.

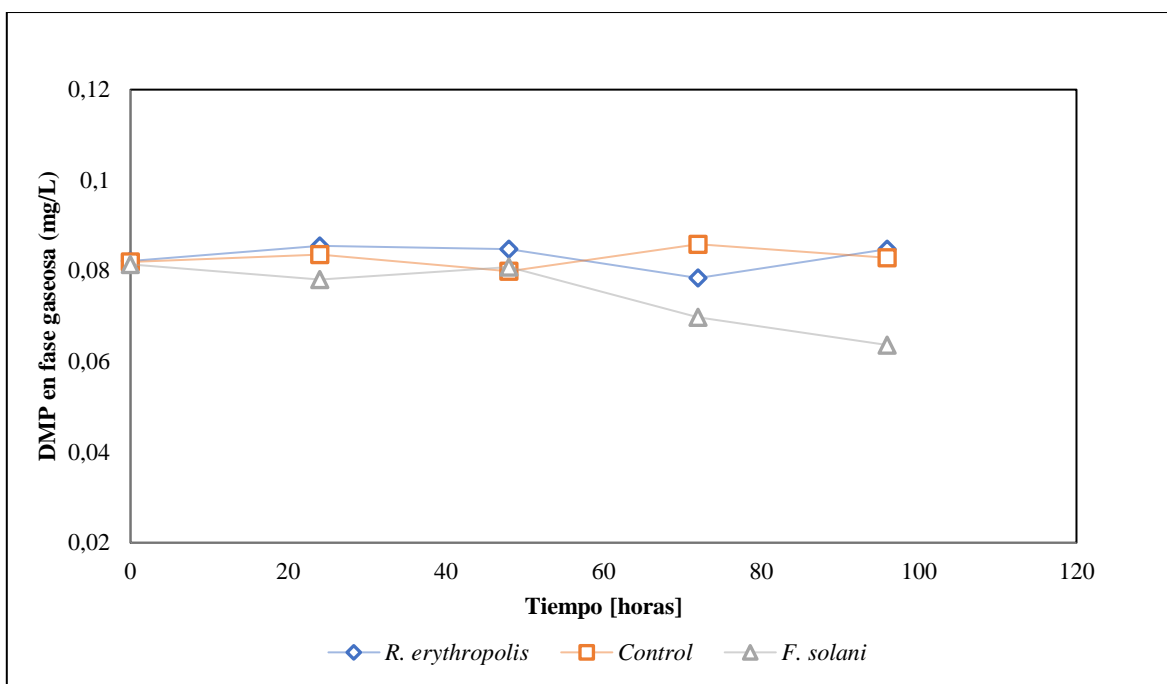


Figura 7. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de DMP en líquido de 1,0 g/L (Medio HCMM3). Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella con *R. erythroplis*, los triángulos grises corresponden a *F. solani* y los cuadrados anaranjados corresponden a la botella control.

Para cerrar este objetivo se muestra una comparación entre las mediciones de DMP en los ensayos de degradación con *Fusarium solani* en los dos medios (medio mineral tabla 3 y medio HCMM3). Esto para decidir el medio idóneo y con mejores resultados en la degradación de DMP. Esto se observa en la Figura 8. De la cual se desprende que el porcentaje de mineralización de DMP es cercano al 60%.

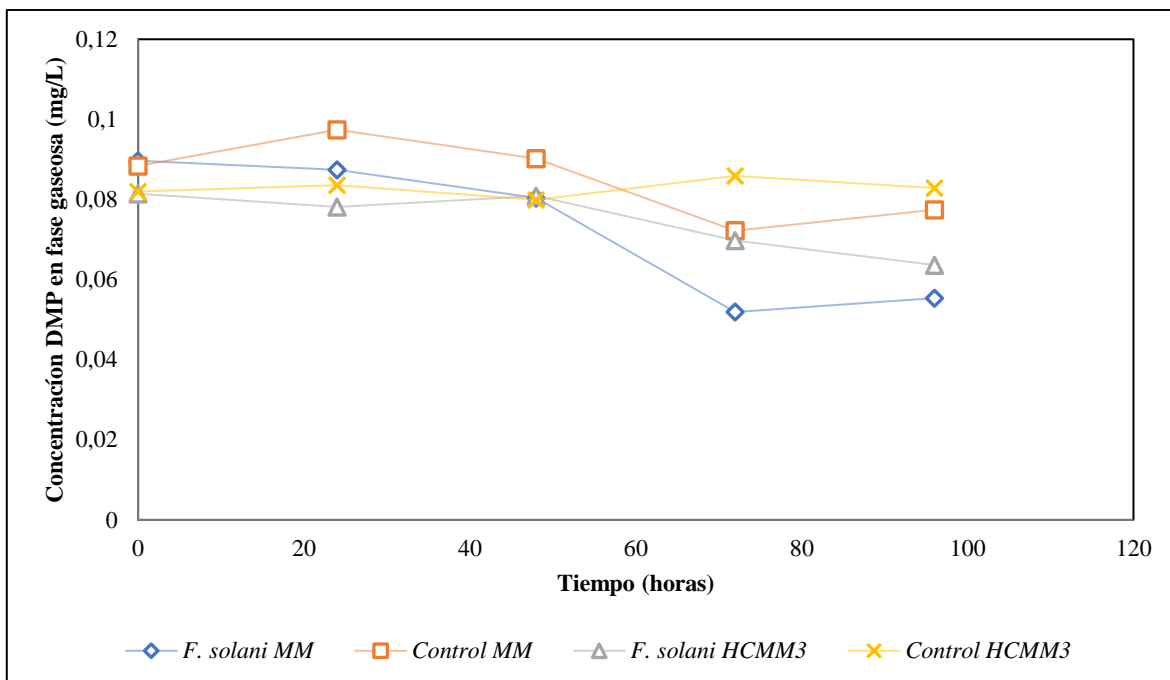


Figura 8. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de DMP en líquido de 1,0 g/L (Medio HCMM3 y medio mineral). Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella con *F. solani* en MM, los cuadrados anaranjados corresponden al microcosmo control en MM, los triángulos grises corresponden a *F. solani* en medio HCMM3 y las equis amarillas corresponden a la botella control con medio HCMM3.

5.2 Comparar degradación de 2,5-dimetilpirazina con *F. solani* en medio líquido y medio sólido.

El biofiltro de lecho escurrido utilizado en los experimentos que se mostraran en el siguiente objetivo, se rellena con vermiculita para otorgarle al microorganismo condiciones de mayor estabilidad. Para esto era necesario simular un microcosmo con medio solido al interior de la botella, con lo cual se pretendía observar las diferencias existentes tanto visuales como analíticas al realizar el ensayo en un medio o en otro. Para estimar las diferencias se procedió a armar microcosmos en viales de 10 ml. Los resultados de las mediciones se muestran en la Figura 9.

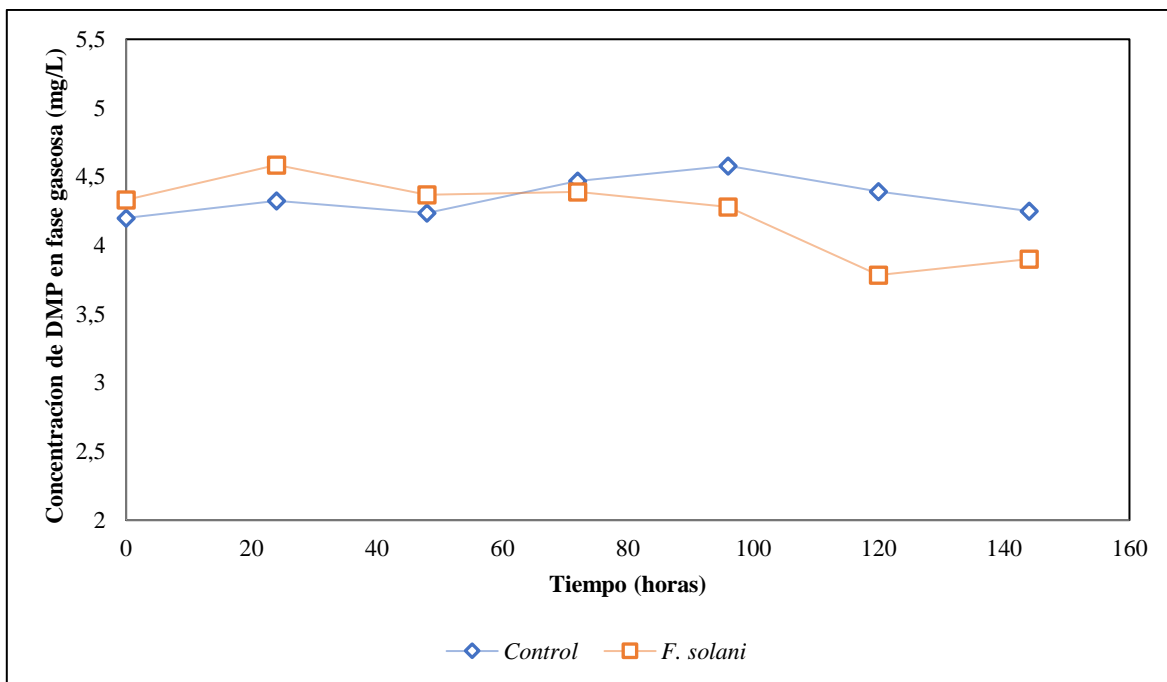


Figura 9. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en microcosmos contra el tiempo. Concentración inicial de DMP en líquido de 5,0 g/L en vermiculita con medio mineral. Rombos azules corresponden a las mediciones de la botella control y los cuadrados anaranjados corresponden a *F. solani*.

Además, en este mismo ensayo se midió la concentración de CO₂ en el mismo periodo de tiempo para evaluar su producción en contraste el consumo de DMP. En la Figura 10 se refleja la producción de CO₂ conforme avanzaba el ensayo de degradación.

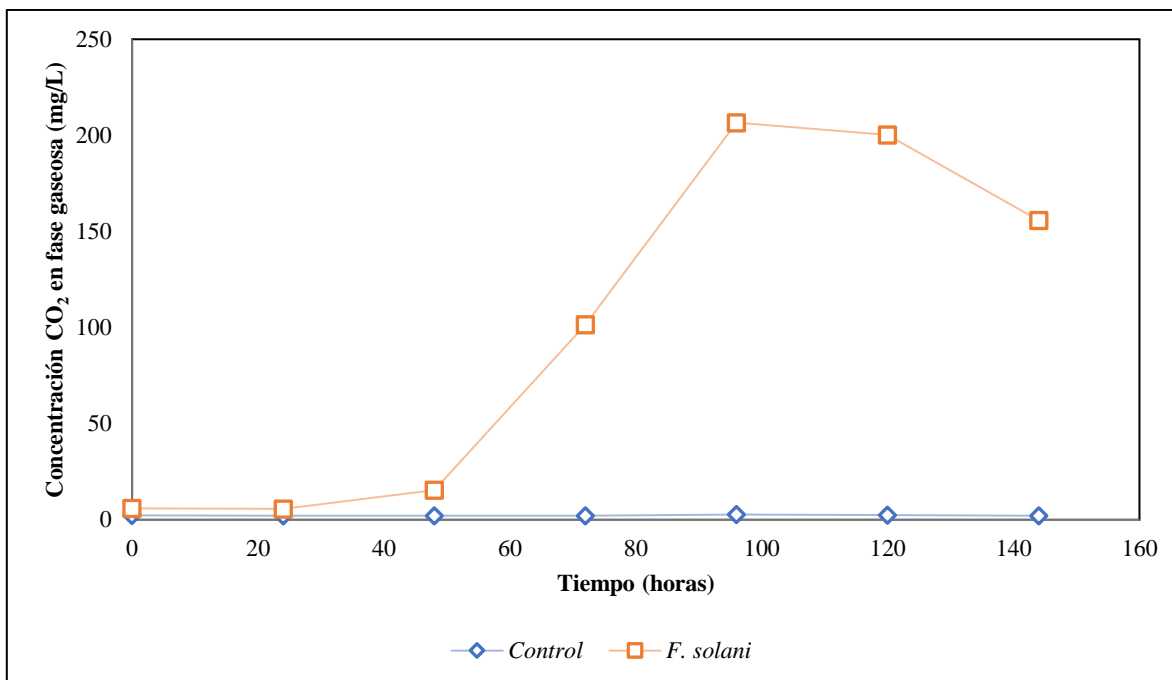


Figura 10. Gráfico de concentración de CO₂ en fase gaseosa en función del tiempo. Concentración inicial en el medio mineral de DMP es 5,0 g/L considerando que la vermiculita (medio sólido) estaba embebida de esta solución. Cuadrados anaranjados corresponden a *F. solani* y los rombos azules al control.

Cabe mencionar que para estos experimentos se utilizaron dos tipos de controles; abióticos, es decir, la botella contenía medio mineral estéril y el contaminante, esto es para todos los ensayos descritos hasta el momento y controles bióticos que se utilizaron en el ensayo que prosigue. En este se utilizó un procedimiento similar al experimento anterior, sin embargo, difiere en dos aspectos. El primero de ellos es la incorporación de un control biótico sin DMP para observar el comportamiento de la generación de CO₂ y compararlo con los microcosmos con DMP y el hongo. El segundo aspecto en que se diferencia es de incluir un microcosmo en el que el medio mineral se modificó quitando la fuente de nitrógeno, es decir, no se adicionó nitrato al medio con el propósito de evaluar si la DMP propiciaba una fuente de nitrógeno además de una fuente de carbono, y como esto impactaba en la capacidad de degradación del hongo. En la Figura 11 se representa el gráfico del ensayo en cuestión, específicamente la concentración de DMP en la fase gaseosa.

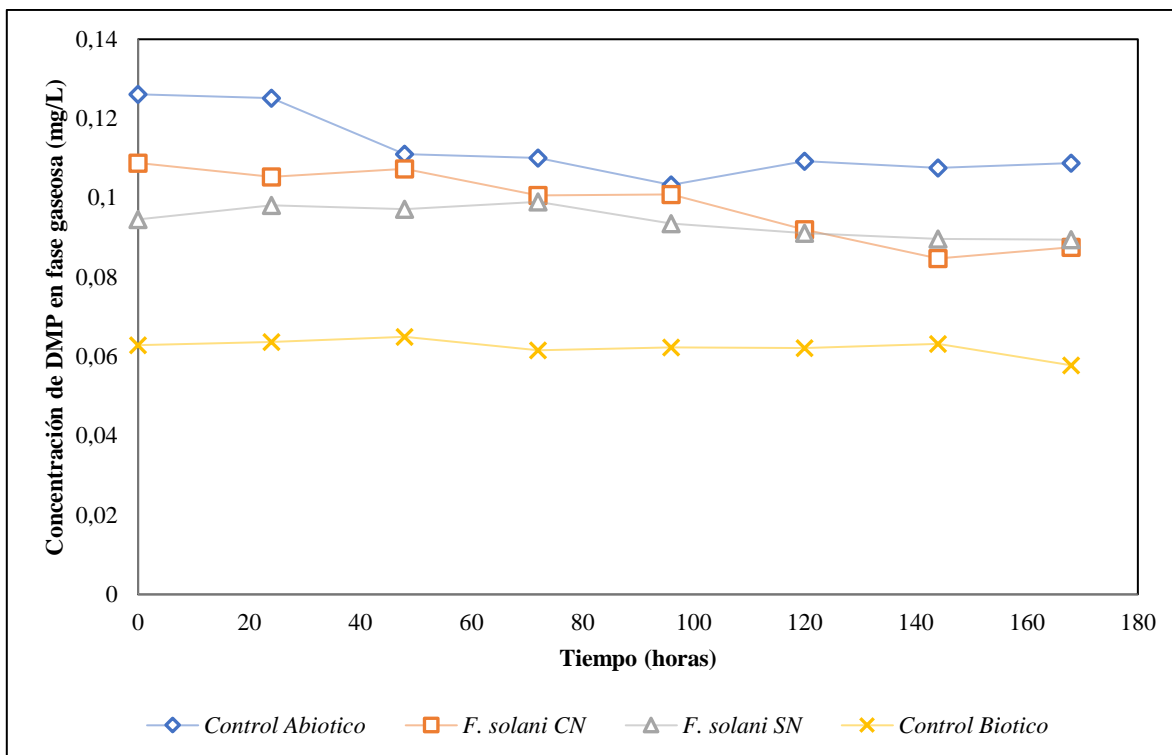


Figura 11. Gráfico de concentración de DMP en fase gaseosa en función del tiempo del ensayo de degradación de DMP en medio sólido. Concentración inicial de DMP en solución embebida en vermiculita es de 1 g/L. Rombos azules corresponden al control abiótico, cuadrados anaranjados a la botella con DMP y el hongo con nitrato de sodio, por el contrario, los triángulos grises representan a los ensayos con DMP y el hongo, pero sin incluir nitrato de sodio, por ultimo las equis amarillas corresponden al control biótico.

Además, se midió la concentración de CO_2 en cada botella para evaluar y diferenciar la producción de este con respecto a los controles, particularmente con el control biótico. Esto se muestra en la Figura 12.

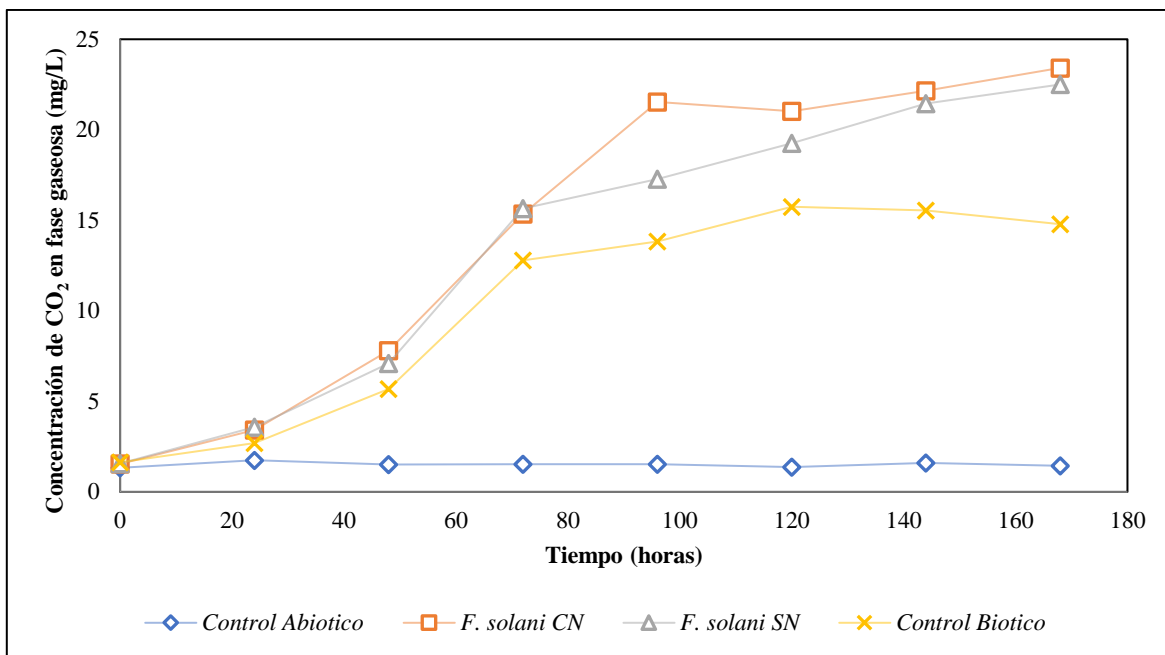


Figura 12. Gráfico de concentración de CO₂ en fase gaseosa en función del tiempo del ensayo de degradación de DMP en medio sólido. Concentración inicial de DMP en solución embebida en vermiculita es de 1 g/L. Rombos azules corresponden al control abiótico, cuadrados anaranjados a la botella con DMP y el hongo con nitrato de sodio, por el contrario, los triángulos grises representan a los ensayos con DMP y el hongo, pero sin incluir nitrato de sodio, por ultimo las equis amarillas corresponden al control biótico.

5.3 Determinación de la capacidad de eliminación de DMP de biofiltro de lecho escurrido inoculado con *F. solani*.

Considerando los resultados anteriores en los cuales se observó que en los experimentos realizados en microcosmos con *F. solani* existía una disminución de la concentración de DMP en la fase gaseosa, así como también un aumento en la producción de CO₂, es que se tomó la decisión de operar un biofiltro de lecho escurrido con el hongo y analizar el comportamiento de este a lo largo de 40 días. Para esto se midió la concentración de DMP en cada una de las etapas del biofiltro como se ve en la Figura 2, además de medirla en el punto de entrada del contaminante. Por consiguiente, también se midió la concentración de CO₂ en las etapas antes mencionadas y en la entrada del contaminante. Los resultados de este proceso se ven en la Figura 13. En esta se observa que la concentración de DMP es menor a lo largo del tiempo tanto en la etapa 2 como en la etapa 3.

Una forma de complementar este gráfico y, para poder sugerir un buen rendimiento del biofiltro es necesario conocer la eficiencia relativa del biofiltro y muestra en la Figura 14.

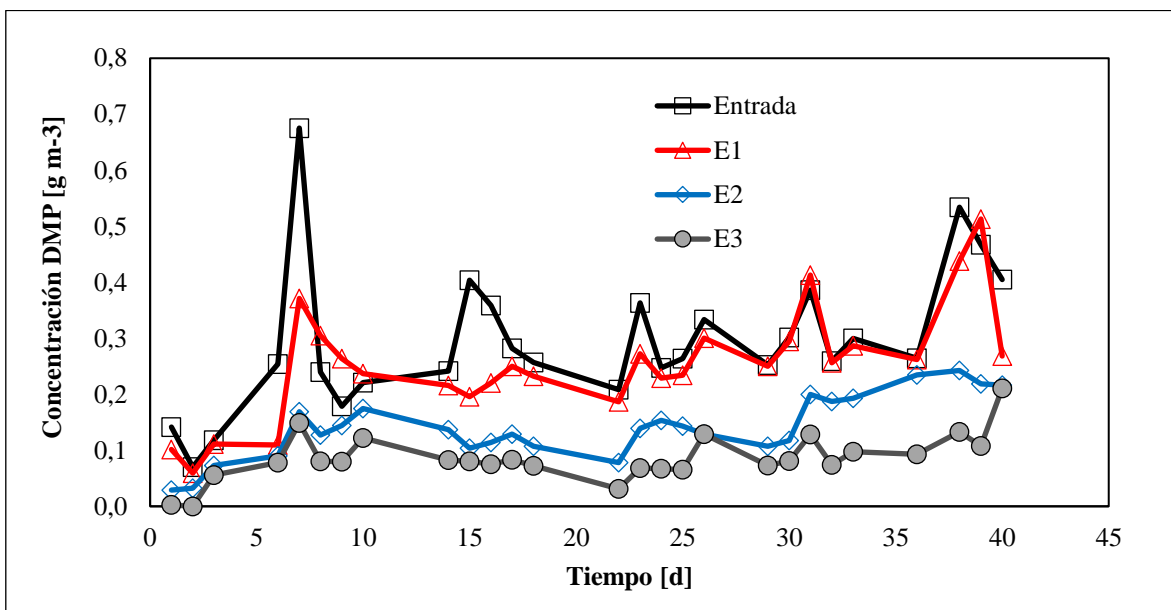


Figura 13. Gráfico de concentración de DMP en el punto de entrada del gas y en cada etapa del biofiltro en función del tiempo. E1 es la etapa baja del biofiltro, E2 es la etapa media y E3 es la etapa alta (ver figura 2).

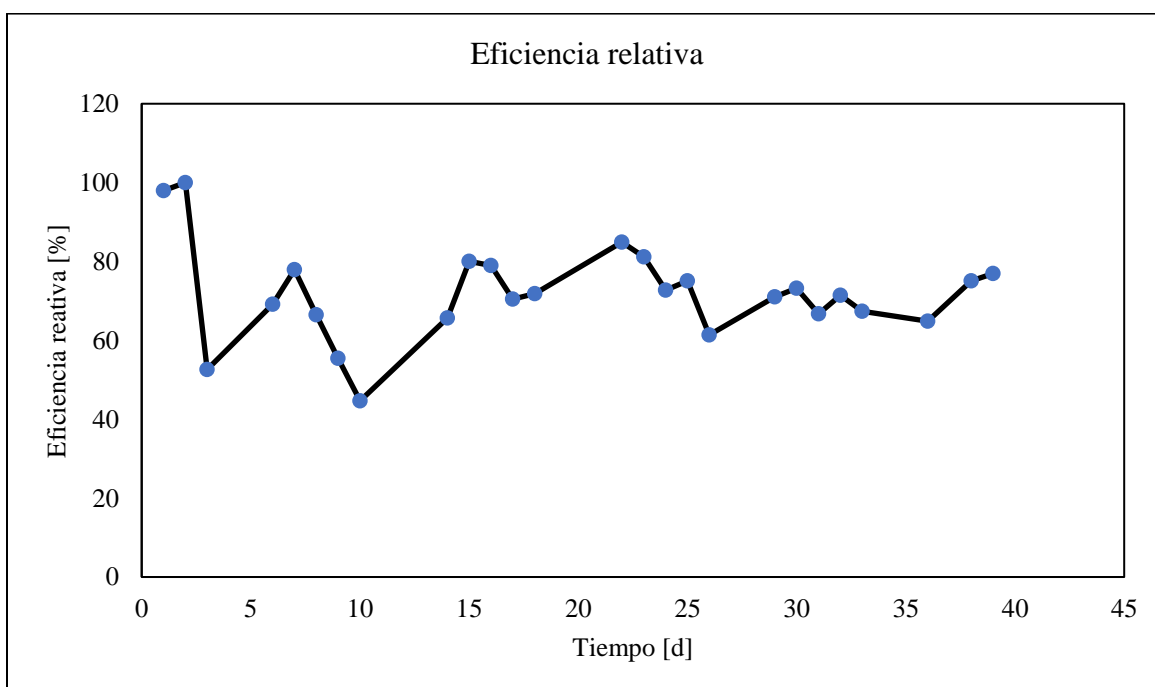


Figura 14. Eficiencia relativa del biofiltro en función del tiempo.

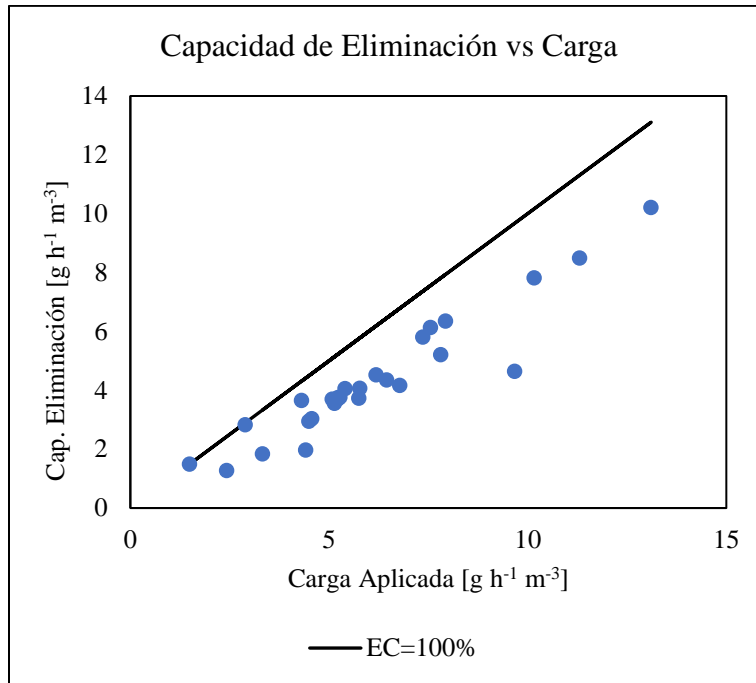


Figura 15. Gráfico de capacidad de eliminación en función de la carga de entrada. La línea negra representa el caso ideal en el cual la carga aplicada es totalmente eliminada. Los puntos azules son los obtenidos en el biofiltro utilizado.

En la Figura 15 se encuentra el gráfico de capacidad de eliminación en función del tiempo, el cual indica la capacidad del biofiltro de eliminar el contaminante que se aplica al biofiltro. La eficiencia relativa de este biofiltro durante los primeros 14 días tuvo un promedio de $71,0 \pm 19\%$. Y los restantes 26 días se estabilizó la eficiencia relativa a $74,0 \pm 5,5\%$. La carga de entrada crítica, es decir, la máxima carga de entrada que alcanza el 100% de la capacidad de eliminación. La obtenida en el biofiltro con *F. solani* es de $3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una concentración de $0,17 \text{ mg/L}$ en la entrada del biofiltro equivalente a una concentración de DMP en equilibrio en la fase líquida de $2,1 \text{ g/L}$.

5.4 Análisis de la comunidad microbiana del biofiltro de lecho escurrido

En total 143322, 67216 y 76160 lecturas de secuencias ITS (espaciador transcrito interno por sus siglas en inglés, *Internal transcribed spacer*) iniciales de hongo fueron generadas por la plataforma MiSeq Illumina para las etapas 1, 2 y 3 del biofiltro respectivamente. reduciéndose a 96634 (etapa 1), 45534 (etapa 2) y 48602 (etapa 3) secuencias que pasaron los controles de calidad y taxonómicos. En la Figura 16 A se observa una limitada diversidad de hongos alcanzando cinco, cuatro y tres UTOs (a nivel de género) para las etapas 1, 2 y tres, respectivamente. La abundancia relativa de *F. solani* por etapa fue de un 99% (etapa 1), 98% (etapa 2) y 97% (etapa 3). El diagrama de Venn de los géneros de hongos identificados reveló que además de *F. solani*, dos aislados fueron comunes para todas las etapas, siendo miembros sin identificar del filo Ascomycota. También la etapa 1 fue colonizada por los basidiomycetes *Sistotrema* sp. y *Meira geulakonigii*, hongos asociados con efectos antagonistas para los ácaros de los cítricos, sin embargo, sin tener la capacidad de degradar o producir DMP que se haya reportado.

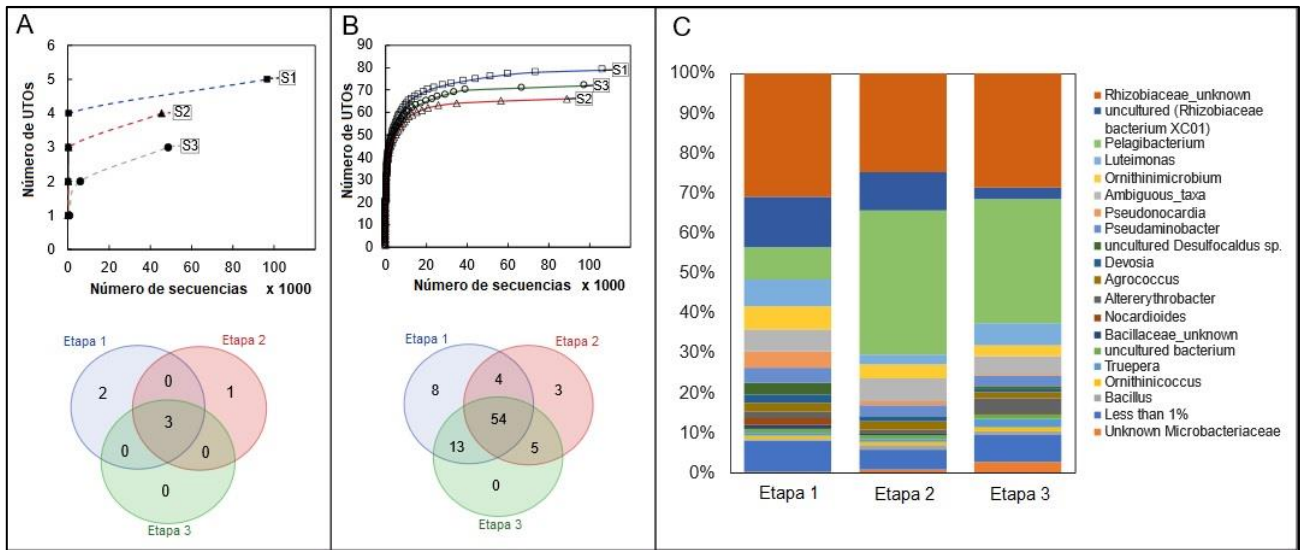


Figura 16. Análisis de la comunidad de hongos y bacterias a nivel de genero de las tres etapas del biofiltro de lecho escurrido que trataba DMP durante 40 días. En A se encuentra la curva de refracción y el diagrama de Venn de la comunidad en las tres etapas para hongos y en B para bacterias. En C se muestra la abundancia relativa de los géneros de bacterias dominantes por etapa para taxones representados en un umbral de abundancia >1%.

Contrastando con la poca diversidad de la comunidad de hongos presentes en el biofiltro, la comunidad bacteriana mostro una alta cantidad de UTOs llegando a 79 a nivel de género en la etapa 1 como se ve en la Figura 16 en los recuadros B y C. Un total de 163610, 136551 y 147023 lecturas fueron generadas y 106701, 88975 y 97620 aprobaron el criterio de calidad preestablecido para las etapas 1, 2 y 3 respectivamente. Se encontró un gran número de UTOs a nivel de género, 79 en la etapa 1 y 72 en la etapa 3 en comparación las 66 de la etapa 2. El diagrama de Venn de comunidades bacterianas por etapa revelo que la mayoría de las bacterias comparten género y que la mayor cantidad que no lo comparten se encontraron en la etapa 1. Entre los ocho UTOs únicos de la etapa 1 se identificaron miembros de los géneros *Bordatella*, *Citricoccus*, *Paracoccus*, *Rhodococcus* y *Arthrobacter* con abundancia relativa menor que el 1%.

La abundancia bacteriana relativa por etapa se muestra en la Figura 16C. Las UTOs con las abundancias relativas más grandes son miembros de la familia Rhizobiaceae y de los géneros *Pelagibacterium*, *Luteimonas* y *Ornithinimicrobium*.

6 Discusión.

F. solani es capaz de degradar DMP y no metanol

En un comienzo se planteó determinar la posibilidad de *F. solani* y *R. erythropolis* de degradar metanol y DMP para utilizarlos ambos en un consorcio dentro del biofiltro, es por esto por lo que se procedió a investigar en microcosmos. En el caso de metanol, no existía reportes de que estos microorganismos pudieran degradarlos, sin embargo, al secuenciar *F. solani* se encontró una proteína putativa que es capaz de degradar metanol (Coleman, J. et al., 2009) y aunque en este hongo aún no se ha encontrado monooxigenasas de flavina que son las enzimas que degradan DMP, en muchos hongos se pueden encontrar este tipo de enzimas (Weber *et al*, 1995; Syed *et al*, 2013) además de que *Fusarium* es conocida por ser capaz de degradar muchos compuestos orgánicos cíclicos como por ejemplo el tolueno (Qi *et al.*, 2002, Vergara-Fernandez *et al.*, 2017).

¿Son capaces de degradar metanol y DMP *R. erythropolis* y *F. solani*? Es la pregunta que nos hacíamos, para resolverlo era necesario generar condiciones para evaluar y medir su eventual uso de estas sustancias como fuente de carbono. En el primer experimento se procedió realizar cultivos en microcosmos para determinar la capacidad de degradación de ambas especies con cada contaminante.

Para comenzar con la discusión de los resultados del primer experimento es necesario ver la Figura 3. En esta se grafica la cantidad de compuesto en las botellas (microcosmos) en la fase

gaseosa en función del tiempo. Específicamente en este resultado no se puede apreciar una tendencia a la baja en el tiempo debido a que el control mostraba la misma tendencia. Una de las posibles razones de que las mediciones hayan sido tan irregulares es la baja concentración que alcanzan los contaminantes en la fase gaseosa. Particularmente en las mediciones de la Figura 3 las concentraciones fluctuaban entre los 0,05 y 0,30 g/m³, no obstante, las concentraciones de compuestos en el aire se encuentran entre estos rangos (Estrada et al, 2012).

Además, se utilizó la técnica de *head space* para poder determinar la concentración de equilibrio entre la fase gaseosa y fase líquida del compuesto en cuestión, lo que dificultó una medición precisa más aun en concentraciones tan bajas. Para disminuir los errores de medición y aumentar la eficiencia de esta, en los experimentos posteriores se aumentó la concentración inicial en el líquido para resolver el problema del límite de medición del cromatógrafo ya que, es posible que estuviésemos bajo este. En la Figura 4 muestra el resultado de aumentar al doble la concentración inicial en el líquido de 0,5 g/L a 1,0 g/L, lo que mejoró sustancialmente las mediciones, pero con dificultades ya que la técnica de *head space* se realizó de forma manual. En esta se puede ver como no hay una diferencia significativa de las concentraciones de la fase gaseosa entre el control y la botella con *R. erythropolis* ya que, de haber una tendencia clara, a las 60 horas aproximadamente se vería una disminución en la botella que contenía la bacteria. De manera similar en la Figura 5 se observa que *F. solani* tampoco es capaz de degradar metanol. Cabe mencionar que no solo está la complicación de usar concentraciones bajas ya que, una concentración elevada de metanol puede ser contraproducente con el crecimiento óptimo de los microorganismos debido a la posible inhibición que puede producir este compuesto (Valle, D., et al, 2016).

En cuanto a DMP existe una diferencia con el metanol ya que este compuesto es menos volátil que el metanol por consecuente, su concentración en la fase gaseosa es menor en comparación con el metanol. Además, su efecto a altas concentraciones sobre los microorganismos utilizados no ha sido estudiado, por lo cual aumentar a una concentración inicial en el líquido muy alta hubiese sido una decisión arriesgada.

En la Figura 6 no se puede dilucidar si efectivamente *R. erythropolis* es capaz o no de degradar DMP, aunque esta grafica indique una disminución a lo largo de los días puesto que, el control muestra una tendencia similar a la botella que contenía a la bacteria. Una de las razones que pueden explicar esta puede deberse que inicialmente se trabajó con válvulas mininert las que presentaron fugas por lo cual las mediciones eran erróneas, otra posible razón es que existiera contaminación cruzada entre las botellas al utilizar la jeringa, pero esta opción se descartó ya que el procedimiento se realizó adecuadamente, esterilizando las jeringas y luego de cada medición se utilizó una solución etanol al 70% para evitar precisamente esta contaminación cruzada. Contrarrestando nuestros resultados en Rappert *et al.* pudieron aislar una cepa de *R. erythropolis* (DM-45) que si era capaz de degradar DMP. Por el contrario, con la cepa utilizada en esta investigación (DSM 43066) pareciera no poder degradarlo según los ensayos de degradación que se observan en las figuras 6 y 7. Sin embargo, al ser contradictorio con lo presentado por Rappert es que no podemos concluir con certeza que esta cepa de *R. erythropolis* no se capaz de degradar DMP.

Por otro lado, *F. solani* mostro una tendencia hacia la disminución de DMP en comparación con el control como se puede ver en la Figura 7 ya que a partir de aquí ya no se utilizó las válvulas mininert y se utilizó precintos circulares de aluminio y septos de PTFE (politetrafluoroetileno). Lo que dispó los problemas de fuga que producían las tapas

mininert. En esta Figura se aprecia como *R. erythropolis* no muestra una aparente disminución al pasar el tiempo y con *F. solani* a contar del tercer día se observa una disminución que permite deducir que *F. solani* es capaz de degradar DMP ya que la disminución de DMP en la fase gaseosa continua al pasar el tiempo en con eso que podemos decir que *F. solani* mostro la capacidad de degradar DMP. Este hecho es al innovador puesto que no hay estudios hasta la fecha que hayan investigado si este hongo es capaz de degradar DMP, no obstante, podemos comparar como *F. solani* es capaz de degradar compuestos estructuralmente parecidos a DMP como lo es el tolueno en el trabajo de Morales *et al* donde se puede observar cómo se comporta *F. solani* es capaz de degradar tolueno a lo largo de 100 horas que degrada donde cerca del 50% del tolueno es mineralizado o convertido en otros compuestos. En el caso de DMP cerca del 60% es mineralizado o convertido en otros metabolitos.

Con la finalidad de determinar un medio propicio para establecer las condiciones óptimas para la degradación se compararon los medios MM y HCMM3, esto se observa en la Figura 8 donde se puede ver que utilizar el medio MM contribuye a una degradación más eficaz en comparación con el otro medio, pero no por una diferencia de gran envergadura. Esto permitió decidir que medio sería el mejor o el más apropiado para iniciar el funcionamiento del biofiltro.

F. solani tiene un crecimiento mayor en medio sólido

Los biofiltros de lecho escurrido en su interior contienen un lecho con el cual el microorganismo interactúa formando una biopelícula (Purswani J., *et al*, 2011) favoreciendo el crecimiento de *F. solani* en este caso. Es por esto por lo que se realizó un ensayo de degradación en viales con vermiculita embebida con medio mineral y DMP. En la Figura 9 se observa que la degradación es similar al medio líquido, sin embargo, visualmente tiene un crecimiento mayor en comparación con el medio líquido. Como complemento se midió la concentración de CO₂ para evaluar si efectivamente parte del DMP se convertía en CO₂. Ya que parte de este contaminante es fuente de carbono para el hongo y lo que no se logra integrar se libera en forma de este gas. Esto se observa en la Figura 10. En esta se observa la producción de CO₂ por parte de la metabolización de DMP por parte de *F. solani* lo que confirma de que este hongo es capaz de usar DMP como fuente de carbono.

Además, se quiso evaluar la posibilidad de que *F. solani* pudiera utilizar DMP como una fuente de nitrógeno ya que, la 2,5-dimetilpirazina contiene dos átomos de nitrógeno conformando el anillo aromático. En la Figura 11 se muestra la gráfica del ensayo de degradación en medio sólido en viales donde se observa que entre el medio sin nitrógeno y con nitrógeno no existe una diferencia significativa. En ambos medios se observa una degradación similar con lo que podemos sugerir que principalmente el DMP es utilizado como fuente de carbono, pero no de nitrógeno, aunque no se puede descartar por completo. Para poder investigar este aspecto en investigaciones futuras se podría indagar más a fondo la posibilidad de que *F. solani* además de utilizar DMP como fuente de carbono lo utiliza como fuente de nitrógeno. Esto podría realizarse utilizando un espectrómetro de masas, sintetizando DMP con nitrógeno 15 que es el isótopo pesado de manera similar a como lo

realizan en Sosinska *et al* donde utilizaron sulfato de amonio con nitrógeno 15 para medir mediante espectrometría de masas la variación de la cantidad de nitrógeno en la pared de celular de *Candida albicans* debida al pH. Cabe mencionar que el DMP es un compuesto poco volátil y tiende permanecer mucho tiempo en los utensilios con los que se trabaja sin importar con lo que se limpiara la jeringa de inyección ni las veces que se limpiaba siempre mostraba un *peak* en el cromatógrafo. Por lo cual en el control abiótico muestra haber DMP, pero se preparó sin este. Por último, para este punto se midió la concentración de CO₂ en estos viales y este mostro una producción similar entre ambos medios como se ve en la Figura 12.

Biofiltro de lecho escurrido con *Fusarium solani* es eficaz en degradar DMP.

Hasta la fecha no existen investigaciones relacionadas a la degradación de DMP por hongos incluyendo a *F. solani*. Por este motivo resulta complicado comparar los resultados de esta investigación con otra similar, no obstante, hay trabajos de investigación relacionados con la degradación de tolueno en biofiltros con *F. solani* (Vergara-Fernandez *et al.*, 2017). Considerando la estructura molecular del tolueno que es similar a la de DMP y que el primer paso de la degradación del tolueno en hongos comienza con el ataque de una monooxigenasa (Luykx DMA, *et al*, 2003; Blasi B, *et al*, 2017). En Vergara-Fernandez *et al.*, 2017 utilizan un biofiltro inoculado con *F. solani* para degradar tolueno con una eficiencia relativa de un 83% y una carga de entrada critica de 100 g m⁻³ h⁻¹ y un EBRT de 154 s. Esta información puede servir como comparación entre los resultados obtenidos en este trabajo. La eficiencia relativa promedio obtenida con este filtro los primeros 14 días fue de 71%, los siguientes 26 días fue de 74%, una carga de entrada critica fue de 3 g m⁻³ h⁻¹ y el EBRT del sistema es 155 s. Aunque estructuralmente son compuestos similares, DMP es un compuesto más

soluble en agua que el tolueno el primero con un coeficiente de partición aire-agua de $8,4 \cdot 10^{-5}$ y el segundo es de 2,2 esto puede ser la explicación detrás de la diferencia en la capacidad de eliminación. Ya que a una igual carga de entrada la concentración de DMP sería 26000 veces más alta que la de tolueno. Por lo cual, aunque no se sabe si DMP tiene un efecto inhibitorio en la degradación de este, no sería posible obtener capacidades de eliminación como las del tolueno, si esta inhibición fuese efectiva. Además, a concentraciones más altas de DMP la eficiencia relativa del biofiltro disminuye sugiriendo una inhibición.

F. solani es el principal componente de la biodiversidad presente en el biofiltro

La abundancia relativa de *F. solani* fue de un 99% en la etapa 1, 98% en la etapa 2 y 97% en la etapa 3. Otras dos especies de hongos aparte de *F. solani* fueron encontradas, descritas en los resultados, pero con muy poca presencia. Y a diferencia de la de la poca diversidad de hongos presentes en cada etapa, la diversidad de bacterias fue mayor. La curva de refracción para todas las etapas tiende hacia la saturación, sugiriendo que la diversidad de la comunidad bacteriana fue adecuadamente capturada. Ya que el biofiltro fue inoculado solamente con *F. solani*, pero operado con aire no estéril, las bacterias que colonizaron el biofiltro pueden haber ingresado por el aire o por el medio mineral, el cual se esterilizaba, pero se manejó en condiciones no asépticas. El diagrama de Venn reveló la presencia de géneros de *Bordetella*, *Blastococcus*, *Citricoccus*, *Paracoccus*, *Rhodococcus*, y *Arthrobacter*. Cabe remarcar que *Rhodococcus erythropolis* DM-45 (Rappert *et al*, 2006) y *Arthrobacter* sp. (Kutanova *et al*, 2013) se han descrito como capaces de degradar DMP. Las razones por las cuales estas tienen una abundancia relativa baja considerando su habilidad de degradar el compuesto como fuente de carbono es desconocida. Además de que, en los experimentos de esta investigación, la cepa con la que se realizaron los experimentos no mostró una capacidad clara de

degradación. Por lo que es aún más interesante saber el motivo de este suceso. Además, se encontraron miembros de las familias de Rhizobiaceae y de los géneros *Pelagibacterium*, *Luteimonas* y *Ornithinimicrobium*. *Rhizobium excellensis* puede sintetizar la alquilpirazina sustituida 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (Chatonet *et al*, 2010), no obstante, no hay reportes de degradación de DMP por miembros de este género. De manera similar, no existe información acerca de metabolización de pirazinas en taxones *Pelagibacterium*, *Luteimonas*, o *Ornithinimicrobium*. A pesar de la falta de información con respecto de la habilidad de estas bacterias de usar DMP como única fuente de carbono y energía, la abundancia de géneros en el biofiltro apunta a una comunidad enriquecida donde algunos miembros metabolizan directamente DMP mientras que los otros podrían utilizar los productos intermedios de la degradación.

7 Conclusión

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que tanto *R. erythropolis* como *F. solani* no son capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono. Las razones por las cuales estos organismos no mostraron esa habilidad son aún desconocidas y podría ser un tema para investigar en el futuro. Lo más interesante e incluso controversial es que aun habiendo investigaciones sobre la capacidad de *R. erythropolis* de degradar DMP en esta investigación no fuese posible demostrarlo. Es posible que sea a que son cepas distintas o a un error en la implementación de los experimentos, sin embargo, estos fueron realizados de la misma manera en que fueron descritos por el autor Rappert (Rappert *et al*, 2006).

Por otra parte, *F. solani* si mostro capacidad de degradar DMP con un 60% de mineralización del compuesto. Esto llevo a la determinación de utilizar un biofiltro de lecho escurrido con *F. solani* y determinar la eficiencia de este en el abatimiento de este contaminante. El biofiltro con *F. solani* mostro potencial para poder mitigar el DMP del ambiente con una eficiencia relativa de 80% con una carga de entrada de $11.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. La secuenciación de ADN de alto rendimiento mostró que *F. solani* fue el mayor representante de la comunidad fúngica con una abundancia relativa de 97%, lo que indica que juega un papel importante en el biofiltro posiblemente a su habilidad de degradar DMP. Si la comunidad fúngica estaba compuesta por solo cinco géneros, la comunidad bacteriana tuvo una inmensa variedad con 79 géneros diferentes identificados. El papel de los miembros de esta comunidad bacteriana en la degradación de DMP o en la transformación de metabolitos intermedios esta aun por dilucidar. Por último, el desempeño del biofiltro tiene un alto potencial para eliminar DMP este podría se replicado a una escala mayor para facilitar la eliminación de este compuesto en fábricas que procesan alimentos.

8 Referencias

- Alyasi, H. S., y Isaifan, R. (2018). A review on pollution emissions and impact from waste treatment and disposal facilities. *Journal of Environmental and Toxicological Studies*, 2(1), 1-9.
- Arriaga, S., & Revah, S. (2005). Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 548-553.
- Bajpai P, Bajpai PK, Kondo R (1999). *Biotechnology for environmental protection in the pulp and paper industry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Bell K, Philp J, Aw D, Christofi N (1998) The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol* 85:195210
- Besson I, Creuly C, Gros JB, Larroche C (1997) Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:489–495
- Blasi B, Tafer H, Kustor C, Poyntner C, Lopandic K, Sterflinger K. Genomic and transcriptomic analysis of the toluene degrading black yeast *Cladophialophora immunda*. *Sci Rep*. 2017 Dec 12;7(1):11436.
- Brancher, M., Schaubergerb, G., Francoa, D., y De Melo, H. (2016). Odour impact criteria in South American regulations. *CHEMICAL ENGINEERING*, 54.
- Céspedes, F. L., y Rueda, H. R. (2019). Antecedentes y reflexiones sobre la zona de sacrificio de Quintero y Puchuncaví. *Cuad Méd Soc (Chile)*, 59(1), 21-31.
- Chatonnet P, Fleury A, Boutou S. Origin and Incidence of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Compound with a “Fungal” and “Corky” Aroma Found in Cork Stoppers and Oak Chips in Contact with Wines. *J Agric Food Chem*. 2010 Dec 8;58(23):12481–90.
- Chen, Y., Fan, Z., Ma, L., Yin, J., Luo, M., Cai, W., 2014b. Performance of three pilot-scale immobilized-cell biotrickling filters for removal of hydrogen sulfide from a contaminated air steam. *Saudi J. Biol. Sci.* 21 (5), 450–456.

- Coleman, J. J., Rounsley, S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., Grimwood, J., ... y Schwartz, D. C. (2009). The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS genetics*, 5(8), e1000618.
- Cook, M. R., Bergman, F. J., Cohen, H. D., Gerkovich, M. M., Graham, C., Harris, R. K., y Siemann, L. G. (1991). Effects of methanol vapor on human neurobehavioral measures. Research report (Health Effects Institute), (42), 1-45.
- Cox HHJ, Moerman RE, van Baalen S, van Heiningen WNM, Doddema HJ, Harder W (1997). Performance of a styrene degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 53: 259-266.
- De Carvalho, C. C., & Da Fonseca, M. M. R. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(6), 715-726.
- Delhoménie, M. C., y Heitz, M. (2005). Biofiltration of air: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1-2), 53-72.
- Devinny, J. S., y Hodge, D. S. 1995. Formation of acidic and toxic intermediates in overloaded ethanol biofilters. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 45(2): 125–131.
- Estrada, J. M., Kraakman, N. B., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2012). A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnology advances*, 30(6), 1354-1363.
- Garcia-Pena EI, Hernandez S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S (2001). Toluene biofiltration by the fungus *Scenedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol. Bioeng.*, 76: 61-69.
- Guerra, F. D., Smith, G. D., Alexis, F., & Whitehead, D. C. (2017). A survey of VOC emissions from rendering plants. *Aerosol Air Qual. Res*, 17, 209-217.
- Goodfellow, M. (1989a) Genus *Rhodococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 ed. Williams, S.T., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. pp. 2362- 2371. Baltimore: Williams and Wilkins.

Hernandez, J., Lafuente, J., Prado, O.J., Gabriel, D., 2013. Startup and long-term performance of biotrickling filters packed with polyurethane foam and poplar Wood chips treating a mixture of ethylmercaptan, H₂S, and NH₃. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 63 (4), 462–471.

Ivshina, I.B., Kamenskikh, T.N. and Liapunov, Y.E. (1994) IEGM Catalogue of Strains of Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms. Moscow: Russian Academy of Sciences

Kennes, C., y Veiga, M. C. (2001). Conventional biofilters. In *Bioreactors for waste gas treatment* (pp. 47-98). Springer, Dordrecht.

Kim, I. 2004. The Promising World of Bio-oxidation. *Chemical Engineering Progress.* 100(1): 8–11.

Kraakman, N.J., Rocha-Rios, J., van Loosdrecht, M.C., 2011. Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (4), 873–886.

Kutanovas S, Rutkiene R, Urbelis G, Tauraite D, Stankeviciute J, Meskys R. Bioconversion of methylpyrazines and pyridines using novel pyrazines-degrading microorganisms. *Chemija.* 2013;24(1):67–73.

Lebrero, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., Quijano, G., 2012a. Toluene mass transfer characterization in a biotrickling filter. *Biochem. Eng. J.* 60, 44–49.

Loy, J., Heinrich, K., and Egerer, B. 1997. Influence of filter bed material on the elimination rate in a biotrickling filter bed. In: *Proceedings of the 90th Annual Meeting & Exhibition of the Air & Waste Management Association.* June 8–13, 1997. Toronto. Air & Waste Management Association, Pittsburgh.

Luykx DMA., Prenafeta-Boldú FX, de Bont JA. Toluene monooxygenase from the fungus *Cladosporium sphaerospermum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec;312(2):373–9

Maarse H (1991) *Volatile compounds in food and beverages.* Marcel Dekker Inc., New York, USA

Nagorny S, Francke W (2005) Identification, structure elucidation, and synthesis of volatile compounds in the exhaust gas of food factories. *Waste Manage* 25:880–886

Ottengraf, S. P. (1986). Exhaust gas purification. *Biotechnology: a comprehensive treatise*, 8, 425-452.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Contaminación del aire. [en línea] Disponible en: http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/air_pollution/es/ [Consulta: 12 de noviembre de 2019].

Purswani J, Juárez B, Rodelas B, González-López J, Pozo C. (2011). Biofilm formation and microbial activity in a biofilter system in the presence of MTBE, ETBE and TAME. *Chemosphere*.85(4):616-24. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.106. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21774959.

Qi, B., Moe, W., & Kinney, K. (2002). Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 684.

Ranau R, Steinhart H (2004) Bewertung und Quantifizierung von Leitsubstanzen aus der geruchstragenden Abluft von Lebensmittelbetrieben und der Ferkelaufzucht. Erfassung und Minimierung von Gerüchen. In: Niemeyer B, Robers A, Thiesen P (eds) *Messung und Minimierung von Gerüchen*, Hamburger Berichte 23. Verlag Abfall aktuell, Stuttgart, Germany, pp. 147–165

Ranau R, Kleeberg KK, Schlegelmilch M, Streese J, Stegmann R, Steinhart H (2005) Analytical determination of the suitability of different processes for the treatment of odorous waste gas. *Waste Manage* 25:908–916

Rappert S, Müller R (2005a) Odor compounds in waste gas emissions from agricultural operations and food industries. *Waste Manage* 25:887–907

Rappert S, Müller R (2005b) Microbial degradation of selected odorous substances. *Waste Manage* 25:940–954

Rappert, S., Botsch, K. C., Nagorny, S., Francke, W., & Müller, R. (2006). Degradation of 2, 3-diethyl-5-methylpyrazine by a newly discovered bacterium, *Mycobacterium* sp. strain DM-11. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1437-1444.

Rappert, S., Li, R., Kokova, M., Antholz, M., Nagorny, S., Francke, W., y Müller, R. (2006). Degradation of 2, 5-dimethylpyrazine by *Rhodococcus erythropolis* strain DP-45 isolated from a waste gas treatment plant of a fishmeal processing company. *Biodegradation*, 18(5), 585-596.

Singh, K., Singh, R.S., Rai, B.N., Upadhyay, S.N., 2010a. Biofiltration of toluene using wood charcoal as the biofilter media. *Bioresour. Technol.* 101 (11), 3947–3951

Sosinska, G. J., De Koning, L. J., de Groot, P. W., Manders, E. M., Dekker, H. L., Hellingwerf, K. J., ... & Klis, F. M. (2011). Mass spectrometric quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH. *Microbiology*, 157(1), 136-146.

Sorial, G. A., Smith, E. L., Biswas, P., and Brenner, R. C. 1995. Evaluation of trickle-bed biofilter media for toluene removal. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 45(10): 801–810.

Spigno G, Pagella C, Fumi MD, Molteni R, De Faveri DM (2003). VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem. Eng. Sci.*, 58: 739-746.

Syed, K., Porollo, A., Lam, Y. W., Grimmett, P. E., y Yadav, J. S. (2013). CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2692-2702.

Tephly, T. R. (1991). The toxicity of methanol. *Life sciences*, 48(11), 1031-1041.

Valle, D. L., Jr, Cabrera, E. C., Puzon, J. J., y Rivera, W. L. (2016). Antimicrobial Activities of Methanol, Ethanol and Supercritical CO₂ Extracts of Philippine Piper betle L. on Clinical Isolates of Gram Positive and Gram Negative Bacteria with Transferable Multiple Drug Resistance. *PloS one*, 11(1), e0146349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146349>

Vergara-Fernández A, Yáñez D, Morales P, Scott F, Aroca G, Diaz-Robles L, et al. Biofiltration of benzo[α]pyrene, toluene and formaldehyde in air by a consortium of

Rhodococcus erythropolis and Fusarium solani: Effect of inlet loads, gas flow and temperature. Chem Eng J. 2018 Jan;332(July 2017):702–10

Vergara-Fernández, A., Hernández, S., & Revah, S. (2008). Phenomenological model of fungal biofilters for the abatement of hydrophobic VOCs. Biotechnology and bioengineering, 101(6), 1182-1192.

Vergara-Fernandez A, Soto-Sanchez O, Vasquez J (2011) Effects of packing material type on n-pentane/biomass partition coefficient for use in fungal biofilters. Chem Biochem Eng Q 25:439–444

Warhurst AM, Fewson CA (1994) Biotransformations catalyzed by the genus Rhodococcus. Crit Rev Biotechnol 14:29–73

Weber, F. J., Hage, K. C., y De Bont, J. A. (1995). Growth of the fungus Cladosporium sphaerospermum with toluene as the sole carbon and energy source. Applied and Environmental Microbiology, 61(10), 3562-3566.

Wu, H., Yan, H., Quan, Y., Zhao, H., Jiang, N., & Yin, C. (2018). Recent progress and perspectives in biotrickling filters for VOCs and odorous gases treatment. Journal of environmental management, 222, 409-419.

Yamashita, S., y Kitagawa, M. 1998. Removal of toluene and benzene from flue gas by a biotrickling filtration system which uses an urethane foam filter. In: Proceedings of the 91st Annual Meeting & Exhibition of the Air & Waste Management Association. June 14–18, 1998. San Diego. Air & Waste Management Association, Pittsburgh.

Zaccardelli, M., Vitale, S., Luongo, L., Merighi, M., & Corazza, L. (2008). Morphological and molecular characterization of Fusarium solani isolates. Journal of phytopathology, 156(9), 534-541.