



Diversidad genética y funcional de la comunidad
microbiana asociada a un biofiltro para el tratamiento
de vapores de naftaleno inoculado con *Fusarium*
solani y *Rhodococcus erythropolis*

Tesis

Entregada a la
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial de los Requisitos
Para Optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Claudio Valenzuela Reyes

Mayo, 2023

Directora de Tesis Dra. Julieta Orlando
Codirector de tesis Alberto Vergara-Fernández
Codirector de tesis Felipe Scott

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

Claudio Valenzuela Reyes

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 3 de mayo del 2023.

Directora de Tesis:
Dra. Julieta Orlando

Co-Directores de Tesis:
Dr. Alberto Vergara-Fernández
Dr. Felipe Scott

Comisión de Evaluación de la Tesis
Dr. Marcelo Baeza, Presidente Comité
Dr. Andrés Marcoleta

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	ii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contaminación de espacios interiores y soluciones actuales	1
1.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos	2
1.2.1 Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos	3
1.2.1.1 Vías de degradación de naftaleno en bacterias	4
1.2.1.2 Vías de degradación de naftaleno en hongos	6
1.3 Biofiltración con énfasis en purificación del aire de ambientes interiores	7

1.3.1 Biofiltración mediada por <i>Fusarium solani</i> y <i>Rhodococcus erythropolis</i>	9
1.3.2 Dinámica de la comunidad microbiana en un biofiltro	11
1.3.3 Robustez de un biofiltro	13
1.4 Hipótesis	15
1.5 Objetivos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Biofiltración	17
2.1.1 Montaje del sistema experimental de biofiltración	17
2.1.2 Cinética de adsorción de vermiculita	21
2.1.3 Puesta en marcha y operación inicial del biofiltro	23
2.1.4 Prueba de carga y prueba de flujo	25
2.2 Secuenciación de marcadores moleculares de la comunidad presente en el biofiltro	26
2.2.1 Obtención de secuencias de ADN	26
2.2.2 Análisis de las secuencias de ADN	27
2.3 Aislamiento e identificación de componentes de la comunidad del biofiltro	27
2.4 Montaje y operación del segundo biofiltro	28
RESULTADOS	29
3.1 Biofiltración	29

3.1.1 Montaje del sistema experimental de biofiltración	29
3.1.2 Cinética de adsorción de vermiculita	30
3.1.3 Puesta en marcha y operación inicial del biofiltro	31
3.1.4 Prueba de carga y prueba de flujo	34
3.2 Secuenciación de marcadores moleculares de la comunidad presente en el biofiltro	37
3.3 Aislamiento e identificación de componentes de la comunidad del biofiltro	40
3.4 Montaje y operación del segundo biofiltro	44
DISCUSIÓN	49
4.1 Biofiltración del primer biofiltro	49
4.2 Análisis de marcadores moleculares secuenciados a partir de la comunidad presente en el biofiltro	52
4.3 Análisis de marcadores moleculares secuenciados a partir de los aislados obtenidos a partir del primer biofiltro	54
3.4 Montaje y operación del segundo biofiltro	56
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Recetas de medios de crecimiento.	22
Tabla 2: Parámetros utilizados en la cromatografía de gases para la medición de naftaleno.	25
Tabla 3: Resultados obtenidos desde el análisis mediante GC-Masa para la identificación de los compuestos presentes en el lixiviado del biofiltro 1.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vías de degradación de naftaleno propuestas para bacterias aeróbicas.	5
Figura 2: Vías de degradación de naftaleno propuestas para hongos ligninolíticos.	7
Figura 3: Esquema general de biofiltración.	19
Figura 4: Detalles del montaje experimental.	20
Figura 5: Variación de temperatura en la cámara de biofiltración a lo largo de dos días de operación.	30
Figura 6: Cinética de adsorción de naftaleno en el lecho empacado de vermiculita humedecida (VH) con medio mineral.	31
Figura 7: Porcentaje de eliminación del biofiltro 1 a lo largo de la puesta en marcha.	32
Figura 8: Cromatogramas obtenidos de la búsqueda de ácido salicílico en las muestras de lixiviado del biofiltro.	34
Figura 9: Prueba de carga del biofiltro 1.	35

Figura 10: Prueba de Flujo del biofiltro 1.	36
Figura 11: Asignación taxonómica a nivel de género de las bacterias presentes en las muestras de vermiculita obtenidas al comienzo de la operación del biofiltro 1 y al terminar con su primera prueba de flujo.	37
Figura 12: Comparación de los genes predichos relacionados con la degradación de naftaleno entre el tiempo inicial y tiempo final de operación del biofiltro.	39
Figura 13: Géneros bacterianos que estuvieron enriquecidos en la etapa final del biofiltro y que poseen alguna de las funciones encontradas.	40
Figura 14: Asignación taxonómica a nivel de género de las bacterias aisladas desde el lixiviado del biofiltro 1.	41
Figura 15: Resultados de porcentaje de eliminación obtenidos durante el tiempo en el que transcurre la fase de puesta en marcha del biofiltro 2.	45
Figura 16: Resultados obtenidos durante la prueba de carga del biofiltro 2.	46
Figura 17: Segunda prueba de flujo del biofiltro 1 y prueba de flujo del biofiltro 2.	48

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

Cyt-P450	Citocromo P450
DGGE	Gradiente de denaturación en geles de electroforesis (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
FISH	Hibridación <i>in-situ</i> fluorescente (<i>Fluorescent In-Situ Hybridization</i>)
GC	Cromatografía de Gases
H ₂ O ^{UP}	Agua Ultra Pura
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)
HPAs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	PCR cuantitativo (<i>quantitative PCR</i>)
qrtPCR	qPCR con transcripción reversa (<i>reverse transcriptase qPCR</i>)
COVs	Compuestos orgánicos volátiles

RESUMEN

La contaminación de ambientes interiores es un tema de cuidado por los riesgos que esta conlleva a la salud. Según esto, se han desarrollado distintas estrategias que permitan tratar este aire contaminado, entre las que se encuentra la biofiltración. Ésta posee las ventajas de ser más barata y generar menor contaminación secundaria, en comparación con otros métodos fisicoquímicos. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son uno de los componentes de la contaminación de aires interiores, los cuales son producidos en la combustión incompleta de combustibles orgánicos. Un HPA modelo corresponde al naftaleno, para el cual se encuentra descrita la vía de degradación en bacterias y en menor medida en hongos. A pesar de esto, este compuesto es difícil de degradar en un sistema de biofiltración, para lo cual se ha propuesto que se podría utilizar un consorcio entre el hongo filamentoso *Fusarium solani* y la bacteria *Rhodococcus erythropolis*. Sin embargo, a lo largo de la operación de un biofiltro con este consorcio como inóculo inicial, este consorcio es desplazado por otros microorganismos del ambiente, lo cual conlleva una disminución de la eficiencia de remoción del contaminante. El objetivo de este trabajo es estudiar este cambio

en la comunidad del biofiltro para así poder encontrar microorganismos que estén mejor adaptados a las condiciones de biofiltración y que aun así puedan mantener una alta tasa de remoción de los contaminantes.

Para llevar esto a cabo, se montó un sistema de biofiltración de vapores de naftaleno en el cual se utilizó como inóculo inicial *F. solani* y *R. erythropolis*. Luego de la fase de aclimatación del biofiltro se realizaron pruebas de carga y de flujo para poder medir el rendimiento de este biofiltro. Además, para poder conocer las comunidades microbianas presentes al comienzo y al final de la operación de este biofiltro, se tomaron muestras del biofiltro en ambos tiempos, las cuales fueron estudiadas mediante metabarcoding del marcador ribosomal 16S y también mediante predicción funcional con la herramienta PICRUSt2 para bacterias y el marcador ITS para hongos.

Posteriormente, luego de la operación del biofiltro, se aislaron microorganismos desde éste, los cuales también fueron identificados mediante el marcador ribosomal 16S y analizados mediante predicción funcional con la herramienta PICRUSt2 para bacterias y el marcador ITS para hongos. Utilizando los microorganismos aislados se inoculó un segundo biofiltro el cual fue operado en paralelo con el primer biofiltro para comparar el rendimiento de ambos biofiltros durante una segunda fase de aclimatación y nuevas pruebas de carga y de flujo. Los principales resultados mostraron que el inóculo del biofiltro fue desplazado luego de la operación de éste. Las bacterias que se aislaron al final de la operación representaron a una pequeña parte de las bacterias presentes en el

biofiltro. A pesar de esto, el segundo biofiltro tuvo un menor tiempo de aclimatación con una eficiencia de remoción similar a la del primer biofiltro. Por último, la predicción funcional utilizada no permitió encontrar la vía completa de degradación de naftaleno, faltando enzimas claves de la degradación tanto en la comunidad del biofiltro como en los aislados.

Estos resultados en conjunto muestran que se pueden mejorar las características de un biofiltro para el tratamiento de vapores de naftaleno utilizando microorganismos provenientes de biofiltros anteriores que se encuentran mejor adaptados a las condiciones de biofiltración.

ABSTRACT

Indoor air pollution is a matter of care due to its health risks. Given this, different strategies have been developed to treat polluted air, including biofiltration. This strategy is cheaper and generates less secondary pollution, compared to other physicochemical methods. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are one of the components of indoor air pollution, which are produced in the incomplete combustion of organic fuels. Naphthalene is a model PAH, for which its degradation pathway has been described in bacteria and in less degree in fungi. Despite this, this compound is difficult to degrade in a biofiltration system, for which it has been proposed that a consortium between the filamentous fungus *Fusarium solani* and the bacterium *Rhodococcus erythropolis* could be used. However, throughout the operation of a biofilter with this consortium as its initial inoculum, this consortium is displaced by other microorganisms from the environment, which leads to a decrease in the removal efficiency of the contaminant. This work aims to study this change in the biofilter community to find microorganisms that are better adapted to biofiltration conditions and that can still maintain a high rate of contaminant removal.

To carry this out, a biofiltration system of naphthalene vapors was set up, in which *F. solani* and *R. erythropolis* were used as initial inoculum. After the acclimatization phase of the biofilter, load and flow tests were carried out to measure the performance of this biofilter. In addition, to know the microbial communities present at the beginning and end of the operation of this biofilter, biofilter samples were taken at both times, which were studied by metabarcoding the 16S ribosomal marker and also by functional prediction with PICRUSt2.

Subsequently, after the operation of this biofilter, microorganisms were isolated from it, which were identified with the ribosomal 16S marker and also analyzed by functional prediction with PICRUSt2. A second biofilter was inoculated with the isolated microorganisms, and operated in parallel with the first biofilter to compare the performance of both biofilters during a second acclimatization phase and new load and flow tests.

The main results corresponded to the fact that the initial community of the biofilter was displaced after its operation. The bacteria that were isolated at the end of the operation represented a small part of the bacterial population present in the biofilter. Despite this, the second biofilter had a shorter acclimation time with a removal efficiency similar to the first biofilter. Finally, the functional prediction did not allow us to find the complete naphthalene degradation pathway, with missing key degradation enzymes both in the biofilter populations and in the isolates.

These results together show that the characteristics of a biofilter for the treatment of naphthalene vapors can be improved by using microorganisms from previous biofilters that are better adapted to biofiltration conditions.

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación de espacios interiores y soluciones actuales

La contaminación de ambientes interiores es un tema de cuidado considerando los riesgos para la salud que los contaminantes pueden ocasionar al estar presentes dentro de recintos cerrados (Spengler & Sexton, 1983) y que las personas pasan la mayor parte de su tiempo en este tipo de recintos (Leung, 2015). A pesar de que sería esperable que la contaminación en el aire del interior de los ambientes sea menor que la contaminación del aire exterior debido a un efecto barrera que podrían provocar las paredes de un edificio, al recopilar estudios que comparan ambos tipos de contaminación se observa que la mayoría de las veces el aire interior posee una mayor cantidad de contaminación que el aire exterior (C. Chen & Zhao, 2011; Leung, 2015). Entre los contaminantes dañinos para la salud se encuentran el humo de cigarro, monóxido de carbono (Spengler & Sexton, 1983), compuestos orgánicos volátiles (COVs), material particulado e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), entre otros (Luengas y col., 2015). La mejor forma de reducir estos contaminantes corresponde a la ventilación. Sin embargo, a menudo ésta no es posible debido a problemas como el clima o contaminación externa. En estos casos es necesario utilizar

tecnologías para disminuir estos contaminantes. Actualmente, los métodos disponibles para la purificación de aire de interior incluyen la combinación de filtración, ionización, absorción y fotocatalisis (Luengas y col., 2015).

1.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son compuestos dañinos para la salud producidos en la combustión incompleta de combustibles orgánicos (Díaz-Robles et al., 2014; Pino-Cortés et al., 2015; Pozo et al., 2015). Distintos HPAs se han relacionado con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y respiratorias, cáncer y otras enfermedades crónicas (Sioutas et al., 2005). Debido a su alto punto de ebullición, los HPAs se encuentran en el ambiente como material particulado (MP) que puede penetrar en el pulmón humano (Díaz-Robles et al., 2014; Pino-Cortés et al., 2015; Pozo et al., 2015), y luego entrar al torrente sanguíneo y ser distribuidos a los diferentes tejidos (Nemmar et al., 2002). Tsapakis et al. (2002) analizó la composición química del MP de la ciudad de Temuco, una de las ciudades más contaminadas de Chile debido a la quema residencial de biomasa, encontrando altos niveles de HPAs entre los que destacaron benzo(α)pireno, benzoantraceno, naftaleno y fenantreno.

El naftaleno, el HPA que se utilizó como compuesto modelo durante este trabajo, es además considerado un compuesto orgánico semi-volátil debido a su alta presión de vapor, la cual es la más alta dentro del grupo de los HPAs (Jia &

Batterman, 2010). Históricamente, este compuesto recibió poca atención hasta que se describió su capacidad carcinogénica en ratones (Jia & Batterman, 2010; Preuss et al., 2003).

1.2.1 Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Se han descrito distintas vías relacionadas con la degradación de HPAs en suelos (Ghosal et al., 2016), incluyendo las vías de degradación de benzo(α)pireno, pireno, fenantreno y naftaleno, que contienen 5, 4, 3 y 2 anillos aromáticos, respectivamente (Peng et al., 2008). Estas vías se han estudiado principalmente para su uso en biorremediación tanto por bacterias como hongos (Rafin et al., 2006; Song et al., 2011). Estos mecanismos de degradación se caracterizan por necesitar oxígeno para la iniciación de la ruptura de los HPAs (Boyd & Sheldrake, 1998) ya que el primer paso de la degradación de estos compuestos corresponde a la oxidación de los arenos, la cual puede ser llevada a cabo mediante un sistema enzimático multicomponente. Se han descrito dos sistemas enzimáticos para distintos HPAs: el sistema naftaleno dioxigenasa (NDO) y el sistema bifenil dioxigenasa (BPDO) (Boyd & Sheldrake, 1998). Luego, pueden llevarse a cabo otras reacciones enzimáticas. Dado que este trabajo se enfocará en la biofiltración de naftaleno, se describen a continuación las principales vías de la biodegradación de naftaleno.

1.2.1.1 Vías de degradación de naftaleno en bacterias

En bacterias aeróbicas, los primeros pasos de la vía de degradación de naftaleno corresponden a la oxidación del naftaleno hasta ácido salicílico, como se muestra en la Figura 1A, el primer paso de esta degradación es catalizado por la NDO (Peng et al., 2008). Principalmente se han descrito tres vías diferentes que se pueden utilizar para degradar el ácido salicílico en bacterias aeróbicas, como se muestra en la Figura 1B (Peng et al., 2008). Dos de estas vías son utilizadas ampliamente por bacterias gran negativas como las del género *Pseudomonas* (Peng et al., 2008). Estas vías se caracterizan por tener un primer paso común (A11, Figura 1B), en el cual el ácido salicílico es degradado a catecol por la acción de la enzima salicilato hidroxilasa. En la vía del orto-clivaje este compuesto es degradado a ácido cis,cis-mucónico mediante la acción de la catecol 1,2-dioxigenasa (A12, Figura 1B), mientras que en la vía del meta-clivaje es degradado al semialdehído 2-hidroximucónico mediante la acción de la catecol 2, 3-dioxigenasa (NahH) (A15, Figura 1B). La tercera vía es iniciada por la conversión del ácido salicílico a gentisato mediante la acción de la salicilato 5-hidroxilasa (NagGHAaAb) (A7, Figura 1B).

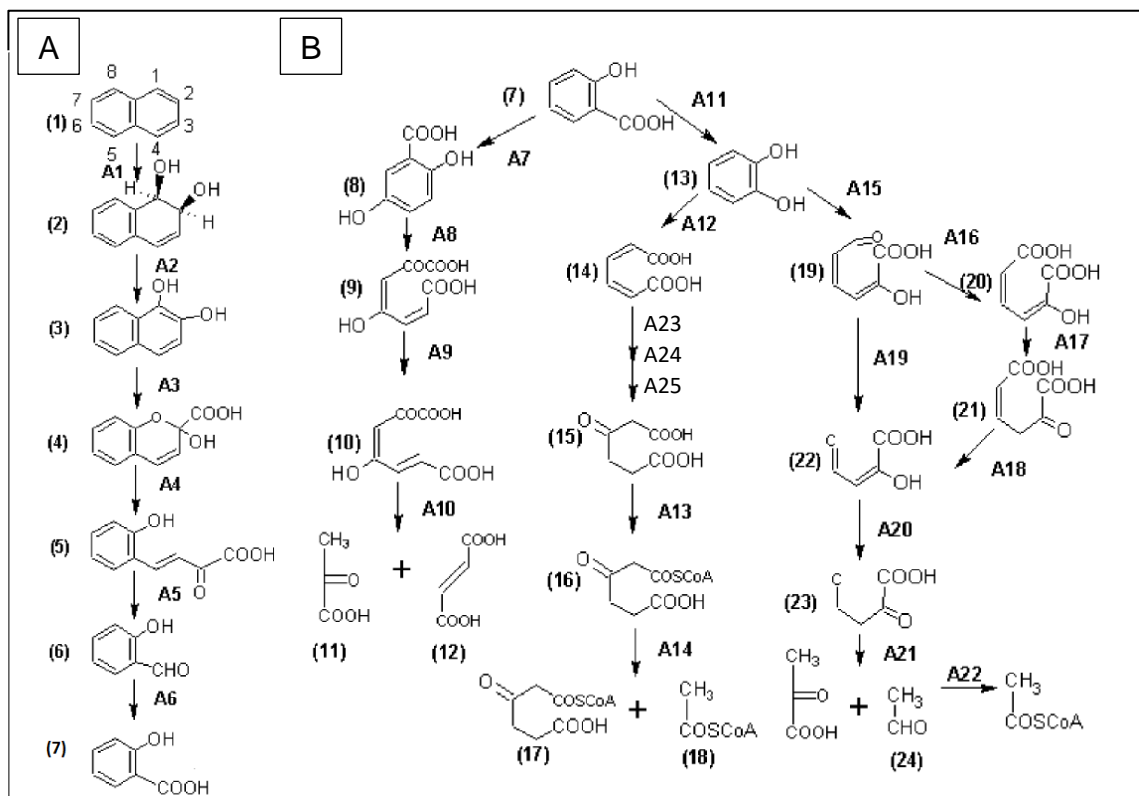


Figura 1: Vías de degradación de naftaleno propuestas para bacterias aeróbicas. Vía común (A) y sus bifurcaciones (B). Los compuestos enumerados corresponden a naftaleno (1), cis-naftaleno dihidrodiol (2), 1,2-dihidroxi-naftaleno (3), ácido 2-hidroxi-2H-cromenil-2-carboxílico (4), ácido trans-o-hidroxibenzilidenopirúvico (5), salicilaldehído (6), ácido salicílico (7), ácido gentísico (8), ácido maleilpirúvico (9), ácido fumarilpirúvico (10), ácido pirúvico (11), ácido fumárico (12), catecol (13), ácido cis,cis-muconico (14), ácido b-cetoadipico (15), b-cetoadipil-CoA (16), succinil-CoA (17), acetil-CoA (18), 2-hidroxi-muconil-semialdehído (19), ácido 2-hidroxi-muconico (20), ácido 4-oxalocrotonico (21), ácido 2-oxo-4-pentenoico (22), ácido 4-hidroxi-2-oxovalerico (23), y acetaldehído (24). Las enzimas involucradas en cada proceso numerado son naftaleno dioxigenasa (NahAaAbAcAd) (A1), cis-naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa (NahB) (A2), 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa (NahC) (A3), 2-hidroxi-2H-cromenil-2-carboxilato isomerasa (NahD) (A4), trans-o-hidroxibenzilidenopiruvico hidratasa-aldolasa (NahE) (A5), salicilaldehído deshidrogenasa (NahF) (A6), salicilato 5-hidroxilasa (NagAaAbGH) (A7), gentisato 1,2-dioxigenasa (NagI) (A8), maleilpiruvato isomerasa (NagL) (A9), fumarilpiruvato hidrolasa (NagK) (A10), salicilato hidroxilasa (NahG) (A11), catecol 1,2-dioxigenasa (A12), muconato cicloisomerasa (A23), muconolactona D-isomerasa (A24), 3-oxoadipato enol-lactonasa (A25), b-cetoadipato:succinil-CoA transferasa (PcaJ) (A13), b-cetoadipil-CoA tiolasa (PcaF) (A14), catecol 2,3-dioxigenasa (NahH/CatE) (A15), hidroximuconil-semialdehído deshidrogenasa

(NahI) (A16), 4-oxalocrotonato isomerasa (NahJ) (A17), 4-oxalocrotonato decarboxilasa (NahK) (A18), hidroximuconicil-semialdeído hidrolasa (NahN) (A19), 2-oxo-4-pentenoato hidratasa (NahL) (A20), 2-oxo-4-hidroxipentenoato aldolasa (NahM) (A21), y acetaldehído deshidrogenasa (NahO) (A22). Obtenido y modificado desde (Peng et al., 2008).

1.2.1.2 Vías de degradación de naftaleno en hongos

En general, los hongos capaces de degradar HPAs pueden ser clasificados en ligninolíticos y no-ligninolíticos (Cerniglia, 1997). En el caso de los hongos no-ligninolíticos se conoce que estos pueden degradar HPAs como naftaleno, fenantreno, antraceno, entre otros (Srivastava & Kumar, 2019), sin embargo, poco se sabe sobre las vías de degradación de estos compuestos. Mientras que en el caso de los hongos ligninolíticos, estas vías se encuentran mejor descritas (Kannangara et al., 2016). En hongos ligninolíticos se ha descrito que el sistema de enzimas lignolíticas, juegan un rol fundamental en la degradación enzimática de naftaleno (Hadibarata et al., 2012, 2013; Mori et al., 2003). Este sistema enzimático se compone principalmente de la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, las cuales se han descrito que pueden ser secretadas para degradar una serie de contaminantes, incluidos los HPAs (Hadibarata et al., 2013). En las vías de degradación propuestas para el hongo *Pleurotus ostreatus* estas enzimas en conjunto con la naftaleno-1,2-dioxigenasa realizan el primer paso de oxidación del naftaleno hacia naftol (Figura 2, pasos (1)-(3) y (1)-(4)) (Elhusseiny et al., 2019). Sin embargo, poco se ha descrito sobre el rol específico que tienen estas enzimas en las vías de degradación de naftaleno. Un resumen

de las vías propuestas se muestra en la Figura 2. Los productos finales de estas vías corresponden a ácido benzoico ((7) Figura 2) (Elhusseiny et al., 2019; Hadibarata et al., 2012) y catecol ((8) Figura 2) (Hadibarata et al., 2013) los cuales pueden ser degradados posteriormente hasta dióxido de carbono (Hadibarata et al., 2012).

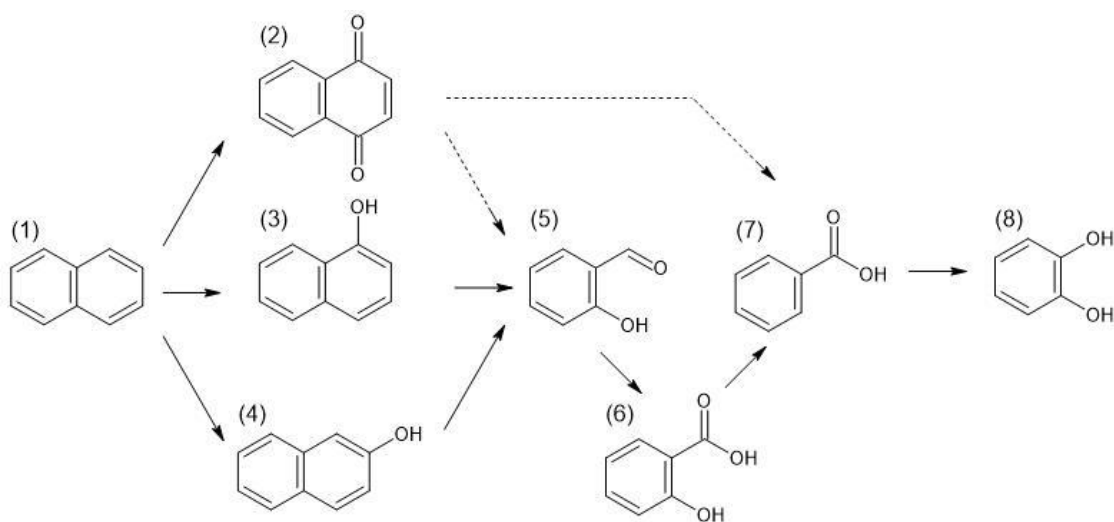


Figura 2: Vías de degradación de naftaleno propuestas para hongos ligninolíticos. Los compuestos enumerados corresponden a naftaleno (1), 1,4-naphthaquinona (2), α -Naftol (3), β -Naftol (4), salicil-aldehído (5), ácido salicílico (6), ácido benzoico (7), catecol (8). Las líneas punteadas representan partes de las vías que poseen intermediarios propuestos que no han podido ser identificados en cultivos (Elhusseiny et al., 2019; Hadibarata et al., 2012, 2013).

1.3 Biofiltración con énfasis en purificación del aire de ambientes interiores

Los biofiltros son biorreactores de lecho empacado utilizados en la purificación de aire contaminado (Iranpour et al., 2005). Los contaminantes gaseosos son transferidos desde una corriente gaseosa hacia la superficie sólida del material

de empaque donde los microorganismos, que forman una biopelícula, producen la degradación de estos compuestos (Aizpuru y col., 2001). Estos microorganismos pueden usar estos compuestos ya sea como fuente de carbono o como fuente de energía (Cabrol et al., 2012). Recientemente ha habido un interés creciente en los sistemas de biofiltración debido al aumento de compuestos orgánicos volátiles (COVs) complejos en los gases contaminados, lo que ha disminuido el rendimiento de los tratamientos tradicionales (Cheng et al., 2016a). La biofiltración corresponde a una opción más eficiente, menos costosa y con contaminación secundaria mínima (Fletcher et al., 2014; Leson & Winer, 1991). Ésta ha sido exitosamente utilizada para tratar una gran cantidad de COVs hidrofílicos como estireno, etanol, metanol, isómeros de xileno, hexano, tolueno, fenol, metilamina, trietilamina, dimetilsulfuro y diclorometano (Zhai et al., 2017b), lo que demuestra el potencial de la eliminación biológica de COVs en escala de laboratorio (Guieysse et al., 2008; Luengas et al., 2015). Sin embargo, poco se sabe de la eliminación biológica de vapores de HPA a las concentraciones típicamente presentes en un ambiente de interior contaminado (Guieysse et al., 2008).

Los sistemas de biofiltración poseen un potencial para su uso en la purificación de aire contaminado de interiores, sin embargo, éstos no se encuentran optimizados para las características propias del aire contaminado de interiores (Guieysse et al., 2008). Es esperable que esta capacidad pueda ser optimizada si se estudian cuáles microorganismos son capaces de producir la remoción de

estos contaminantes en las condiciones propias de los ambientes de interior contaminados.

1.3.1 Biofiltración mediada por *Fusarium solani* y *Rhodococcus erythropolis*

El tratamiento de HPAs mediante biofiltración es más difícil que para otros compuestos más solubles en agua (Deshusses & Johnson, 2000), ya que no son capaces de solubilizarse en las biopelículas. Además, se dificulta la degradación de estos compuestos en las partes bajas de las biopelículas porque no habría suficiente oxígeno para llevar a cabo su degradación, la cual es dependiente de oxígeno. Es por esto que una aproximación utilizada para este tipo de compuestos corresponde a la utilización de un hongo filamentoso (Davison et al., 2000; Kennes & Veiga, 2004; Vergara-Fernández et al., 2010) en conjunto con bacterias formando un consorcio como inóculo inicial del sistema (Vergara-Fernández et al., 2006, 2011, 2018a). En estudios anteriores se ha mostrado que un consorcio entre el hongo filamentoso *Fusarium solani* y la bacteria *Rhodococcus erythropolis* puede consumir simultáneamente tolueno, formaldehído y benzo(α)pireno en microcosmos (Morales et al., 2017) y en un sistema de biofiltración (Vergara-Fernández et al., 2018b).

Por su parte, las bacterias del género *Rhodococcus* son recurrentes en los biofiltros, ya que pueden degradar una gran cantidad de compuestos distintos (Borin et al., 2006; Lu et al., 2018; Zhai et al., 2017b). Sin embargo, las bacterias

en general son afectadas en mayor medida por cambios ambientales, lo que modifica su crecimiento y perjudica las eficiencias de remoción (Estrada et al., 2013). Esto puede ser compensado con la inoculación conjunta de hongos, como *F. solani*, los cuales tienen mayor tolerancia a estos cambios ambientales y según esto pueden aumentar la robustez de la eficiencia de remoción de los biofiltros que habitan (Arriaga & Revah, 2005a, 2005b; Cheng et al., 2016b, 2017; Groenestijn, 1993; Jin et al., 2007; Kraakman et al., 2011; Raboni et al., 2017; Rajamanickam & Baskaran, 2017; Spigno et al., 2003; Zhai et al., 2017a). Además, en estos sistemas se ha propuesto que el hongo filamentoso estaría formando un micelio aéreo que estaría en contacto directo con la fase gaseosa, en la cual se encontrarían los HPAs y, además, sería capaz de promover la absorción de los HPAs mediante la producción de hidrofobinas (Morales et al., 2017).

Se estudió en estos sistemas que *R. erythropolis* y *F. solani* pueden degradar fenantreno, otro HPA, con porcentajes de eliminación superiores al 60% (Gran-Scheuch et al., 2017). Sin embargo, al cabo de ocho meses se observó que este consorcio fue casi totalmente desplazado por una comunidad microbiana que colonizó el biofiltro, lo cual fue acompañado con una disminución en la eficiencia de remoción de este biofiltro. Esto está relacionado con que no se puede trabajar con estos sistemas en un estado de esterilidad, lo que lleva a las comunidades bacterianas presentes en los biofiltros a cambiar constantemente (Zhai et al., 2017a). Los microorganismos mejor adaptados a las condiciones de biofiltración

desplazan a los microorganismos menos adaptados a estas condiciones, los cuales no necesariamente tendrán la capacidad de remover eficientemente el contaminante, lo cual puede disminuir la eficiencia de remoción de los biofiltros (Vergara-Fernández et al., 2018b). Según esto, estudiar los cambios que se producen en esta comunidad es importante para seleccionar microorganismos que estén mejor adaptados a las condiciones de biofiltración y que aun así posean una alta eficiencia de remoción de los contaminantes de interés.

1.3.2 Dinámica de la comunidad microbiana en un biofiltro

Los cambios que sufre la comunidad presente en un biofiltro se han estudiado ampliamente mediante métodos independientes de cultivo (Daims et al., 2006), ya que la fracción no cultivable de las comunidades corresponden a la principal fracción de la comunidad presente en la mayoría de los ambientes naturales y diseñados (Briones & Raskin, 2003). Esto genera que los estudios dependientes de cultivo puedan, en el mejor de los casos, representar parcialmente la comunidad microbiana y, en algunos casos, conducir a conclusiones erróneas sobre estos ambientes (Briones & Raskin, 2003; Daims et al., 2006). Entre los métodos independientes de cultivo se incluyen la hibridación *in-situ* fluorescente (FISH), el gradiente de desnaturalización en geles de electroforesis (DGGE), técnicas basadas en PCR, como qPCR y qrtPCR, y la aplicación de secuenciación de nueva generación (NGS) (Daims et al., 2006; Sanz & Köchling, 2007). Sin embargo, es importante considerar que estos métodos no pueden

reemplazar totalmente a las técnicas basadas en cultivo, ya que estas son importantes para, por ejemplo, implementar metodologías como la caracterización funcional y la obtención de curvas de degradación, entre otras. Por esto, es importante continuar desarrollando técnicas para cultivar la fracción de la comunidad que es aún no cultivable.

En la dinámica de la comunidad microbiana en un biorreactor se reconocen principalmente dos momentos. Una primera parte denominada aclimatación, la cual se caracteriza por la selección de los microorganismos mejor adaptados al ambiente, los cuales pueden provenir desde el lecho empacado o desde el inóculo (Cabrol et al., 2012). La segunda parte corresponde al estado estable, el cual se caracteriza por tener una estabilidad funcional (Cabrol et al., 2012) y en el que la diversidad microbiana decrece considerablemente (Lu et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado que un biofiltro estable funcionalmente puede tener una comunidad microbiana inestable (Cabrol et al., 2012).

Adicionalmente, la composición de esta comunidad puede variar con variaciones en los parámetros fisicoquímicos de estos microambientes (Cabrol et al., 2012), y entender como estos parámetros afectan la ecología de los microorganismos presentes en los biofiltros es importante en el diseño y operación de los mismos (Zhai et al., 2017b). Entre estos parámetros se encuentra el tipo de HPAs que se introduce al biofiltro, el cual puede cambiar drásticamente la composición de la comunidad en el biofiltro (Lu et al., 2018), la cantidad de contaminantes que entran al sistema, y las condiciones ambientales como, por ejemplo, el pH, la

irrigación y la temperatura (Barona et al., 2004; Kraakman, 2003).

1.3.3 Robustez de un biofiltro

En la industria, los biofiltros pueden atravesar largos periodos de falta de nutrientes ya sea por fallas, falta de mantención o disminución en los flujos (Barona et al., 2004; Kraakman, 2003). Por lo tanto, para asegurar la aplicabilidad de los biofiltros en la industria se necesita contar con biofiltros que sean versátiles y robustos de manera de no verse afectados en su eficiencia por los distintos problemas a los cuales pudiesen ser sometidos (Barona et al., 2004; Kraakman, 2003).

Se ha descrito que una mayor robustez puede ser lograda utilizando comunidades microbianas que tengan una capacidad metabólica más amplia (Hays et al., 2015). Sin embargo, hay pocos estudios que exploren esta opción y el diseño óptimo necesario para llevar a cabo este tipo de biofiltros (Estrada et al., 2013; Zhang et al., 2018). Esta robustez podría ser lograda a medida que la comunidad del biofiltro sea compleja y estable (Cheng et al., 2016b; Lebrero et al., 2010). Sin embargo, también se puede asociar una alta robustez a comunidades altamente dinámicas (Borin et al., 2006; Cabrol et al., 2012; Steele et al., 2005), las cuales también pueden tener la capacidad de degradar contaminantes de manera estable (Zhai et al., 2017b). En estas condiciones, la comunidad microbiana posee una alta redundancia funcional (Borin et al., 2006) y una alta complejidad que llevarían a la comunidad microbiana a tener una alta

robustez incluso en condiciones como el cambio de un contaminante por otro (Lu et al., 2018). Otra opción que permite aumentar la robustez de un biofiltro es la aclimatación, es decir preparar previamente estas comunidades en condiciones similares a las de operación final, por ejemplo, en cuanto a los nutrientes y contaminantes que tendrán durante el periodo de biofiltración (Elías et al., 2010; Groenestijn, 1993; Jiang et al., 2009; Tresse et al., 2002). Por último, la robustez de un biofiltro puede ser mejorada gracias a un monitoreo constante, instalando monitores y sensores para mantener constantes algunos parámetros básicos (Kraakman, 2003).

En esta problemática se enmarca la presente propuesta de tesis, la cual consistirá en estudiar el cambio de la comunidad microbiana dentro de un biofiltro de naftaleno con el objetivo de identificar especies biofiltradoras que puedan entregarle al biofiltro una mayor robustez permitiendo un tratamiento más estable. En un biofiltro para el tratamiento de vapores de naftaleno inoculado con *Fusarium solani* y *Rhodococcus erythropolis* se espera que la diversidad de la comunidad microbiana que se genera a lo largo de la operación del biofiltro varíe a medida que se produzcan los intermediarios de la degradación de naftaleno, seleccionándose microorganismos que eliminen el naftaleno en forma más robusta, para así dilucidar cuáles son las funciones que cumplen los componentes principales de esta comunidad en el proceso de degradación de estos compuestos.

1.4 Hipótesis

La comunidad microbiana que se establece al finalizar la operación de un biofiltro inoculado con *Fusarium solani* y *Rhodococcus erythropolis* para el tratamiento de vapores de naftaleno poseerá microorganismos que permiten mejorar la capacidad de biofiltración.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Caracterizar la comunidad microbiana que se establece al final de la operación de un biofiltro para el tratamiento de naftaleno inoculado con *F. solani* y *R. erythropolis* para evaluar su capacidad de biofiltración en un nuevo biofiltro.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Medir los parámetros de operación de un biofiltro inoculado con *F. solani* y *R. erythropolis* para el tratamiento de vapores de naftaleno, incluyendo el estudio de puesta en marcha, prueba de carga y prueba de flujo.
2. Medir los intermediarios de la degradación de naftaleno que se generan durante la operación del biofiltro.
3. Analizar mediante marcadores moleculares los cambios que se producen en la comunidad microbiana presente en el biofiltro durante su operación.
4. Relacionar los microorganismos encontrados con las funciones que podrían estar cumpliendo en relación con la degradación del naftaleno.

5. Corroborar las funciones de degradación de naftaleno en un nuevo biofiltro inoculado con los microorganismos aislados desde el primer biofiltro al final de su operación.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Biofiltración

2.1.1 Montaje del sistema experimental de biofiltración

El sistema utilizado para realizar el experimento de tratamiento de los vapores de naftaleno se encuentra esquematizado en la Figura 3. Este sistema se instaló dentro de una cámara termorregulada, con dos calefactores cuyo funcionamiento se encuentra limitado por controladores de temperatura. En el sistema de ingreso del naftaleno al biofiltro, en primer lugar, el aire proveniente desde el ambiente se comprime en un compresor de aire ((1) en la Figura 3), este aire ambiental atraviesa luego el humidificador ((2) Figura 3), el cual corresponde a una columna de agua a través de la cual este aire es burbujeado para humedecer el aire que va hacia los biofiltros. El aire humedecido luego se bifurca hacia dos controladores de flujo másico. Uno de estos controladores de flujo ((3) Figura 3) controla cuánto aire sin el contaminante entra al sistema de manera de poder diluir el contaminante en el aire que entra a los biofiltros para etapas posteriores de experimentación. El otro controlador de flujo ((4) Figura 3) lleva el aire hacia el vaporizador ((5) Figura 3). Este vaporizador, como se observa en la Figura 4A, tiene en primer lugar un difusor de aire de manera de que el aire disminuya su

velocidad al atravesar el humificador, al salir de este difusor, el aire se encuentra con una base de vermiculita sobre la cual hay una capa del contaminante. Esta confección tiene el objetivo de aumentar la cantidad de tiempo que está el aire en contacto con el contaminante de manera de aumentar la cantidad de contaminante que se logra vaporizar y, con esto, la cantidad de contaminante máxima que puede atravesar los biofiltros. Ambos controladores de flujo llevan el aire hasta un mezclador ((6) Figura 3) donde el aire proveniente de ambos condensadores se mezcla, para dar lugar al aire que entra finalmente a los biofiltros.

Los biofiltros propiamente tal, como se observa en la Figura 4B, se armaron con una columna de vidrio de 3" de diámetro (7,62 cm) y 35 cm de altura con una malla de retención de 20 mesh (0,864 mm de apertura) en la parte inferior para servir de soporte para el lecho empacado de vermiculita. El flujo de aire entra a los biofiltros desde la parte inferior izquierda ((7) en la Figura 3 y en la Figura 4B) donde pasa por una zona de muestreo ((8) Figura 4B), desde donde se pueden obtener muestras del aire que entra al biofiltro. Este aire luego atraviesa el lecho empacado de vermiculita ((9) Figura 4B) y sale por la parte superior ((10) Figura 3 y Figura 4B). En la parte superior izquierda ((11) Figura 4B) se conecta una manguera que termina en un aspersor, por la cual se alimenta el biofiltro con medio fresco de manera de mantener la vermiculita húmeda y con nutrientes suficientes para los microorganismos. En la parte inferior del biofiltro ((12) Figura 4B) se acumula el medio que percola a través del lecho de vermiculita (lixiviados)

y desde este punto se pueden recolectar muestras para los análisis posteriores. A la salida de cada biofiltro, se encuentra una zona de muestreo ((13) Figura 3), desde donde se pueden tomar muestras del aire. Luego este aire atraviesa un condensador ((14) Figura 3) que baja la temperatura del aire de manera de poder disminuir lo más posible la concentración del contaminante en el aire, no eliminado en el biofiltro, antes de que éste salga del sistema e ingrese a un medidor de CO₂ ((15) Figura 3) el cual mide la concentración de CO₂ en el aire que sale del biofiltro, de manera de poder conocer cómo varía la producción de CO₂ dentro del biofiltro a modo de indicador de crecimiento.

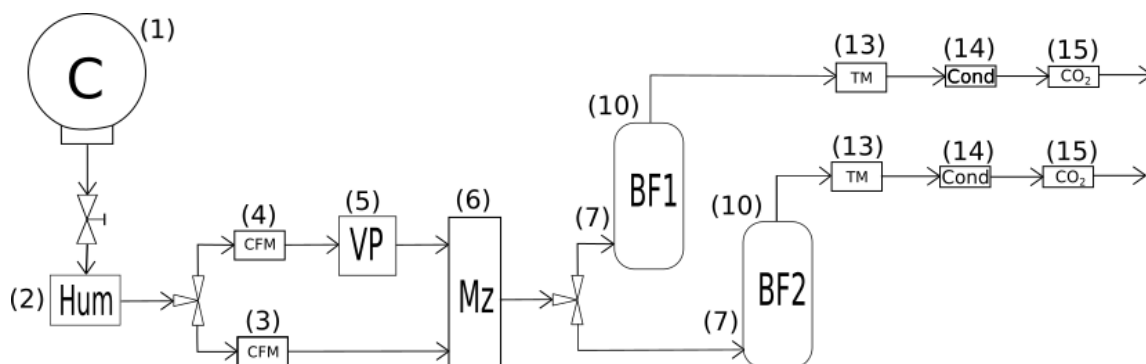


Figura 3: Esquema general de biofiltración. Con flechas se indica el sentido del flujo del aire. C: Compresor; Hum: Humificador; CFM: Controlador de flujo másico; VP: Vaporizador; Mz: Mezclador; BF: Biofiltro; TM: Toma de muestra; Cond: Condensador; CO₂: Medidor de CO₂.

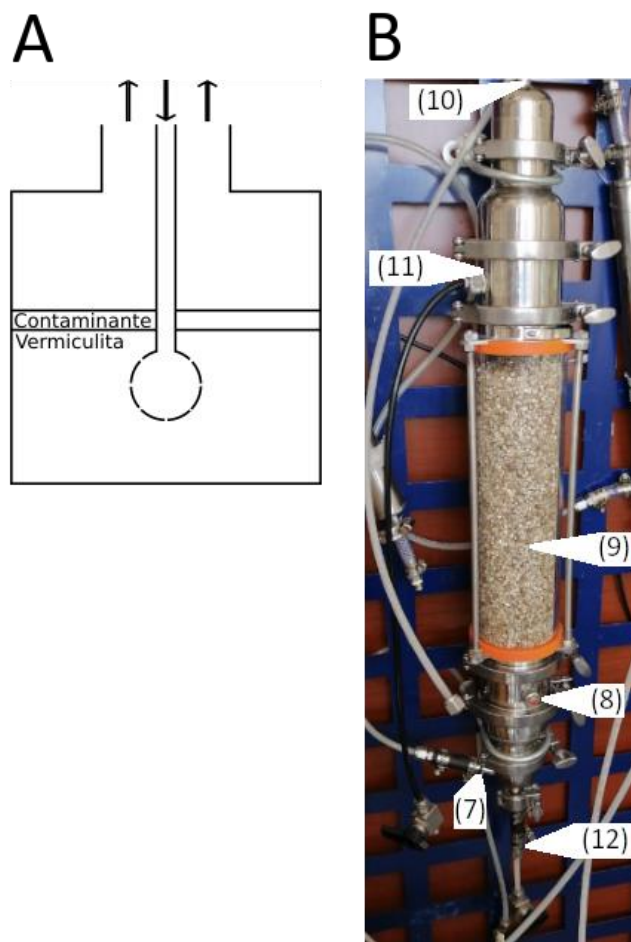


Figura 4: Detalles del montaje experimental. A) Esquema del Vaporizador. Con flechas se indica el sentido del flujo del aire. B) Fotografía del biofiltro. Con números se indican distintas partes claves del biofiltro según lo indicado en el texto.

Antes de llevar a cabo los experimentos de biofiltración se realizaron pruebas de la variación de algunos parámetros a controlar. En primer lugar, se comenzó a fluir aire a través del sistema para verificar que no hubiera fugas en este. Además, durante dos días se midió cómo cambiaba la temperatura dentro de la cámara de biofiltración mientras el calefactor con control de temperatura se encontraba

encendido y una temperatura de control de 30°C, temperatura a utilizar durante los experimentos posteriores.

2.1.2 Cinética de adsorción de vermiculita

Dado que para verificar la cantidad de naftaleno degradado en el biofiltro se midió la concentración de naftaleno a la entrada y a la salida, como se describe en las secciones posteriores, se realizó una prueba de adsorción de naftaleno en la vermiculita húmeda y seca, la cual corresponde al material de empaque del biofiltro. Esto con el objetivo de descartar que el naftaleno se adsorbiera de manera considerable en la vermiculita durante su operación, lo que alteraría los resultados de la degradación. Para ello se llenó la columna de vidrio del biorreactor con aproximadamente 250 g de vermiculita seca o con medio para realizar una cinética de adsorción de la vermiculita con el contaminante. El medio fue preparado como se indica en la Tabla 1, considerando que por cada gramo de vermiculita se utiliza 5 mL de medio. Los controladores de flujo máscicos fueron ajustados para un flujo de 0,5 L/min para la línea del contaminante ((4) Figura 3) y 1 L/min en la línea del aire sin contaminante ((3) Figura 3) de manera de lograr una proporción 1:2 entre aire contaminado y aire sin contaminante y lograr un tiempo de retención (T_{RH}) de 1 minuto en la columna del biofiltro en el que se realizará este experimento. Se ajustó, además, la temperatura de la cámara de biofiltración a 30°C, que corresponde a la temperatura a la cual se crecen los aislados de *F. solani* y *R. erythropolis*. Una vez abierta la válvula de flujo que

atravesada este biofiltro, se tomó una primera muestra del aire en la salida del biofiltro que es medida mediante cromatografía de gases para representar el tiempo 0. Esta medición se repitió cada 20 minutos hasta que la concentración del contaminante a la salida de la columna de vermiculita fuera estable. Al final de la operación se tomó el aire a la entrada del biofiltro para conocer la concentración del contaminante que estaba entrando a la columna de vermiculita y verificar que fue igualada por la concentración del contaminante a la salida de la columna de vermiculita. El mismo proceso se repitió para la columna de vermiculita con el medio mixto detallado en la Tabla 1 para conocer la cinética de adsorción de la vermiculita humedecida con medio.

Tabla 1: Recetas de medios de crecimiento. MFS: Medio de crecimiento de *Fusarium solani*. MRE: Medio de crecimiento de *Rhodococcus erythropolis*. Medio mixto: Medio mezclando MFS y MRE en proporción 1:1.

Componente	Concentración en MFS (g/L)	Concentración en MRE (g/L)	Concentración en Medio mixto (g/L)
NaNO ₃	18	0,0025	9
KH ₂ PO ₄	1,3	1,36	1,33
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,38	0,05	0,215
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0	0,125
CaCl ₂	0,055	0,01	0,0325
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015	0,0025	0,00875
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,012	0,00154	0,00677
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,013	0,000037	0,00652
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0020	0,000039	0,00102
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0015	0,000041	0,000771
H ₃ BO ₃	0,0015	0,00286	0,00218
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0	0,000025	0,0000125
KNO ₃	0	0,5	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	2,38	1,19

2.1.3 Puesta en marcha y operación inicial del biofiltro

La bacteria *Rhodococcus erythropolis* fue crecida en un medio sólido de agar nutritivo (20 g/L) mientras que el hongo *Fusarium solani* fue crecido en un medio sólido de agar papa dextrosa (39 g/L). Ambos microorganismos fueron crecidos en placas Petri en incubadoras a 30°C. A partir de estas placas Petri estos microorganismos se inocularon en un primer pre-inóculo, que corresponde a un matraz de 50 mL con 20 mL del medio correspondiente según la Tabla 1 más glicerol al 1% m/v, y luego se traspasaron a un segundo pre-inóculo de 100 mL con 50 mL del mismo medio. Las placas Petri y cada pre-inóculo se dejaron crecer durante tres días para la bacteria y cinco días para el hongo. Ambos pre-inóculos fueron mezclados con 1.200 mL de medio fresco mixto, que tiene ambos medios en partes iguales como se detalla en la Tabla 1. Finalmente, esto último fue mezclado con aproximadamente 250 g de vermiculita de manera de lograr una proporción de 5 ml de medio por cada gramo de vermiculita. Se apartó una muestra de la vermiculita inoculada con medio para analizarla posteriormente mediante análisis de metabarcoding según lo indicado en la sección 2.1.4. La vermiculita húmeda con medio se montó finalmente en el biofiltro. El biofiltro se puso en marcha con los flujos indicados en la sección anterior, 0,5 L/min para la línea del contaminante ((4) Figura 3) y 1 L/min para la línea del aire sin contaminante ((3) Figura 3) y se ajustó la temperatura de la cámara de biofiltración a 30°C.

Diariamente se obtuvieron muestras duplicadas de las entradas y salidas de los

biofiltros ((8) Figura 4B y (13) Figura 3, respectivamente) las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de gases (GC) y comparadas con una curva de calibrado para conocer la concentración del contaminante que está entrando y saliendo del biofiltro según los parámetros mostrados en la Tabla 2. También se recolectó la información proveniente del sensor de CO₂. Periódicamente se recolectó el líquido que percola a través de la columna de vermiculita y se seleccionó uno de estos percolados para analizarse mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-ms), en colaboración con la unidad de instrumentación de la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para intentar reconocer algún compuesto propio de la degradación de naftaleno. Adicionalmente, se compararon los perfiles de GC obtenidos mediante los parámetros indicados en la Tabla 2 con estándares de ácido salicílico, un compuesto intermediario de la degradación de naftaleno.

El biofiltro se operó hasta lograr un estado estable con respecto a la concentración de CO₂ y el porcentaje de remoción de contaminante a la salida del biofiltro.

Tabla 2: Parámetros utilizados en la cromatografía de gases para la medición de naftaleno.

Parámetro	Valor
T° Inyector (°C)	260
T° Columna (°C)	135
T° FID (°C)	270
Flujo (ml/min)	11,7
Flujo columna (mL/min)	1,61
Vel. Lineal (cm/s)	40
Split	5
Vol. Iny. (µL)	500
Presión (psi)	162,1
Tiempo total (min)	13
Purge flow (mL/min)	2

2.1.4 Prueba de carga y prueba de flujo

Como parte de la operación del biofiltro se realizaron pruebas de carga y pruebas de flujo. La prueba de carga consistió en mantener constante el flujo e ir aumentando gradualmente la carga. Para la prueba de flujo, por su parte, se aumentó el flujo manteniendo la carga constante. La variación de cada parámetro respectivo fue realizada una vez que se estabiliza la concentración de naftaleno medida a la salida del biofiltro.

Una vez finalizadas ambas pruebas se tomó otra muestra de vermiculita para secuenciar el 16S de la comunidad que estaba presente al finalizar la operación del biofiltro.

2.2 Secuenciación de marcadores moleculares de la comunidad presente en el biofiltro

Con el objetivo de identificar las bacterias y hongos que se encontraban al comienzo y al final de la operación del biofiltro se realizó la secuenciación de los marcadores 16S e ITS, según los pasos indicados a continuación.

2.2.1 Obtención de secuencias de ADN

Utilizando el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN) y siguiendo las indicaciones del fabricante, se extrajo el DNA de las muestras que fueron obtenidas desde el biofiltro de acuerdo con lo indicado en las secciones 2.1.3 y 2.1.4. Se midió la concentración y pureza del ADN extraído mediante un análisis espectrofotométrico en Nanodrop. Las muestras de ADN se secuenciaron en Macrogen Inc. Esto incluyó, en primer lugar, la amplificación de estas muestras utilizando los partidores universales para la región V3-V4 del gen de la subunidad ribosomal 16S (Bakt_341F y Bakt_805R) y la región ITS1 del transcrito espaciador interno (ITS, por sus siglas en inglés) (ITS1 y ITS2) para estudiar las comunidades de bacterias y hongos, respectivamente, y posterior a esto se secuenciaron estos amplicones por Illumina MiSeq para obtener los datos de metabarcoding en bruto.

2.2.2 Análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación masiva fueron filtradas por criterios de calidad y desonorizadas para generar variantes de secuencias de amplicón (ASVs, por sus siglas en inglés), para posteriormente asignar taxonómicamente cada ASV comparándolo con la base de datos SILVA (v138) (Quast et al., 2013) en el caso de bacterias y con la base de datos UNITE (v2020) en el caso de los hongos (Nilsson et al., 2019) utilizando el paquete DADA2 en R (Callahan et al., 2016). Los análisis posteriores y gráficos se realizaron utilizando los paquetes phyloseq y ggplot2 en R, determinando así las frecuencias relativas de los miembros de ambas comunidades en las muestras. Además, los genes relacionados con la degradación de naftaleno que podrían poseer las bacterias encontradas en las muestras fueron predichos con la herramienta bioinformática PICRUSt2 (Douglas et al., 2019) que utiliza como referencia la base de datos de metagenomas IMG (I. Chen et al., 2019) asignando cada gen según la base de datos KEGG (Ogata et al., 1999).

2.3 Aislamiento e identificación de componentes de la comunidad del biofiltro

A partir de la vermiculita proveniente de la etapa final del primer biofiltro se realizó un aislamiento en medio sólido utilizando como única fuente de carbono naftaleno. Los medios utilizados para el aislamiento correspondieron a un medio mixto de los medios indicados en la Tabla 1, el cual fue suplementado con naftaleno ya

sea disuelto o adicionando cristales de naftaleno para que éste sea utilizado desde la fase gaseosa. Los aislados obtenidos por este método fueron secuenciados y analizados según lo indicado en la sección 2.2.

2.4 Montaje y operación del segundo biofiltro

A partir de los aislados obtenidos según lo descrito en la sección anterior se realizó el montaje de un segundo biofiltro según lo indicado en la sección 2.1.1, el que se operó en una línea paralela como se observa en la Figura 3, mientras se realizaba una segunda operación del primer biofiltro para poder comparar el funcionamiento de ambos biofiltros. Con ambos biofiltros en paralelo se repitieron los pasos de operación indicados en las secciones 2.1.3 y 2.1.4.

RESULTADOS

3.1 Biofiltración

3.1.1 Montaje del sistema experimental de biofiltración

Los biofiltros fueron montados de manera exitosa, las fugas detectadas en el sistema fueron corregidas, hasta lograr igualar los flujos de entrada y salida de cada biofiltro determinando así que no existían fugas significativas.

Los resultados de la prueba de variación de temperatura en la cámara de biofiltración se muestran en la Figura 5. A lo largo de dos días la temperatura promedio fue de 32°C. Esta temperatura varió diariamente principalmente según la hora, alcanzándose una temperatura diaria máxima aproximadamente a las 19:00 h y una temperatura mínima diaria aproximadamente a las 7:00 h. Siendo las temperaturas máximas y mínimas obtenidas en los días de medición de 40°C y 26°C, respectivamente.

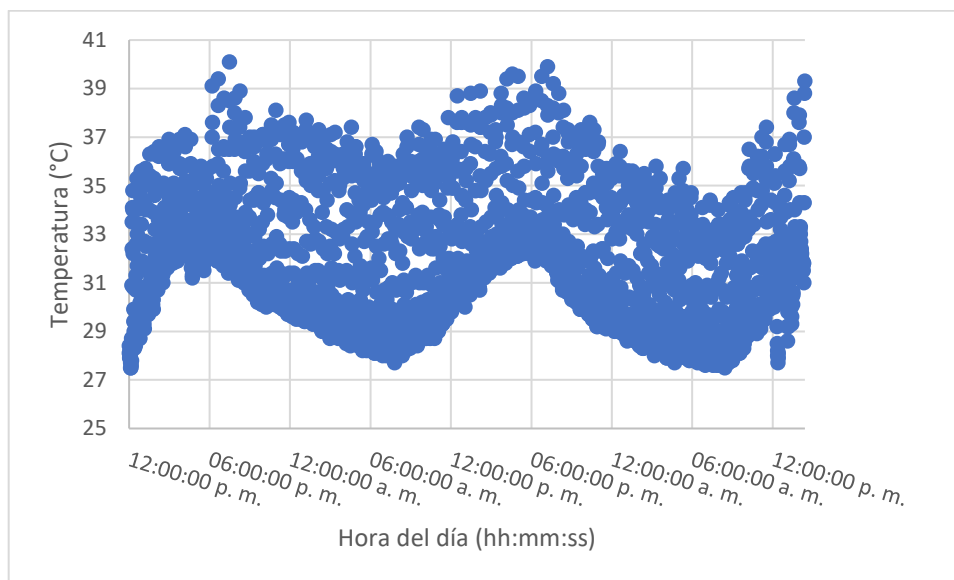


Figura 5: Variación de temperatura en la cámara de biofiltración a lo largo de dos días de operación.

3.1.2 Cinética de adsorción de vermiculita

Los flujos utilizados en el sistema de biofiltración generaron una presión de 14,00 psi en la línea de aire sin contaminante y de 13,90 psi en la línea con contaminante. Las concentraciones obtenidas a lo largo del experimento de absorción en vermiculita húmeda se muestran en la Figura 6, experimento durante el cual la concentración de entrada se mantuvo aproximadamente en $0,16 \text{ g/m}^3$. Se puede observar que la adsorción de vermiculita ocurre rápidamente durante la primera media hora de medición. Al momento de realizar la curva de adsorción de la vermiculita seca, ésta no se pudo realizar correctamente debido a que se demoró más del tiempo que se pudo destinar a la medición. A pesar de esto, se midió la concentración de naftaleno a la salida del biofiltro luego de 24 horas de comenzado el experimento y se pudo observar que la concentración de

salida ya había igualado a la concentración de entrada, por lo que la cinética de adsorción de la vermiculita seca ocurriría durante las primeras 24 horas.

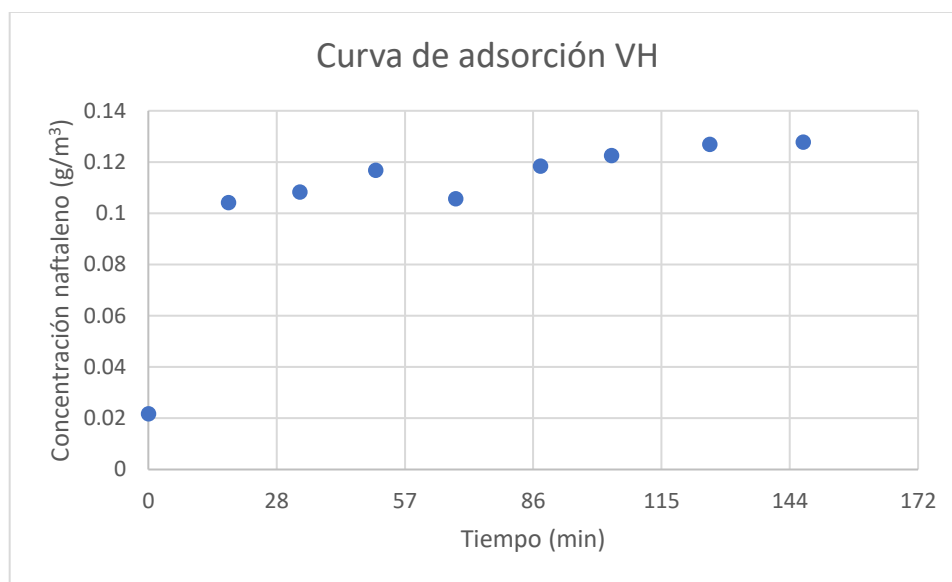


Figura 6: Cinética de adsorción de naftaleno en el lecho empacado de vermiculita humedecida (VH) con medio mineral.

3.1.3 Puesta en marcha y operación inicial del biofiltro

Durante el montaje del primer biofiltro, el cual fue inoculado con *F. solani* y *R. erythropolis*, se obtuvo una muestra de vermiculita que se destinó para secuenciación. El porcentaje de eliminación de naftaleno por parte del biofiltro a lo largo de la puesta en marcha se muestra en la Figura 7, en la cual se observa que se alcanzó un porcentaje de eliminación relativamente constante al día 20, después del cual el porcentaje de eliminación varió entre un 70% y 100%.

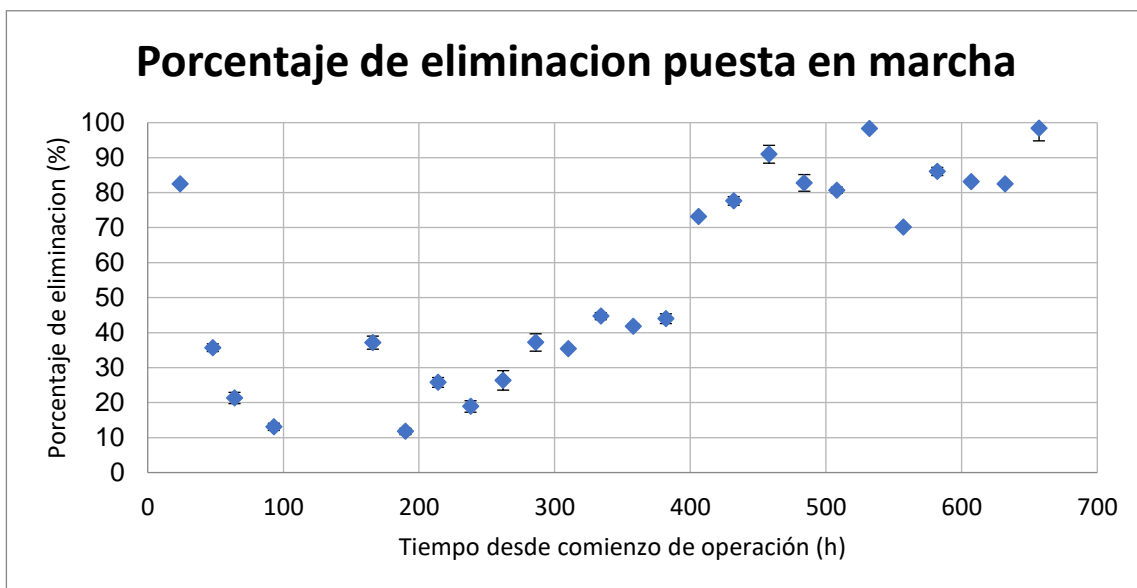


Figura 7: Porcentaje de eliminación del biofiltro 1 a lo largo de la puesta en marcha.

Los resultados de la identificación de intermediarios desde el lixiviado del biofiltro 1 mediante GC-ms se muestran en la Tabla 3. No se logró observar en el lixiviado ningún intermediario de la degradación de naftaleno reportado anteriormente.

Adicionalmente, un intermediario conocido de naftaleno (ácido salicílico) fue comparado mediante cromatografía de gases con el lixiviado obtenido desde el biofiltro, comparación según la cual se encontró en el lixiviado el pico correspondiente a este compuesto. Al utilizar una dilución de este compuesto con una calidad de estándar, se encontró que el ácido salicílico aparece a los 5,4 minutos al utilizar el método de GC indicado en la Tabla 2. En la Figura 8A se muestra como ejemplo un cromatograma de los utilizados para llegar a esta conclusión. En la Figura 8B se muestra un ejemplo del cromatograma obtenido con este mismo método a partir del lixiviado obtenido desde el biofiltro.

Tabla 3: Resultados obtenidos desde el análisis mediante GC-Masa para la identificación de los compuestos presentes en el lixiviado del biofiltro 1.

Tiempo de retención (min)	Hit1	Hit2	Hit3
4,65	Naftaleno	1-metileno	Naftaleno
5,37	1-(10,10-Dimetil-3,3-dioxo-3-tia-4-azatriciclo[5.2.1.0(1,5)]dec-4-il)-3-metilpent-4-en-1-ona	Ácido hexanoico	9-hidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-2-(1-metiletil)-8-(3-metil-1-oxobutil)-1-Oxaspiro[4.4]non-8-eno-4,7-diona
5,4	1-[2-Metil-3-(metiltio)allil]ciclohex-2-enol	i-Propil 10-metil-dodecanoato	3-Metil-4-(feniltio)-2-prop-2-enil-2,5-dihidrotiofeno 1,1-dioxido
5,44	3-hidroxi-Ácido dodecanoico	2-bromo-Octadecanal	9-Metil-Z-10-pentadecen-1-ol
5,49	2-cloro-4-(1,1-dimetilpropil)-Fenol	2-cloro-6-(1,1-dimetiletil)-Fenol	2-cloro-4-(1,1-dimetiletil)-Fenol
5,54	2-bromo-Octadecanal	Ácido Z-8-metil-9-tetradecenoico	Ácido 9-octadecenoico, 2,2,2-trifluoroetil ester
6,86	(E,Z)- 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno)-Decano	5-butil-6-hexiloctahidro-1H-Indeno	2-butil-5-hexiloctahidro-1H-Indeno
8,52	(E,Z)- 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno)-Decano	Anhidrido 2-Dodecen-1-il(-)succínico	Ácido erucico
8,83	Anhidrido 2-dodecen-1-il(-)succínico	5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno)-(E,Z)-Decano	Ácido oleico
9,62	Ácido cis-10-heptadecenoico	Ácido oleico	(E)-Ácido 9-octadecenoico
12,8	Heptacosano	Tetratetracontano	Octacosano
13,61	Heptacosano	Pentacosano	Nonacosano

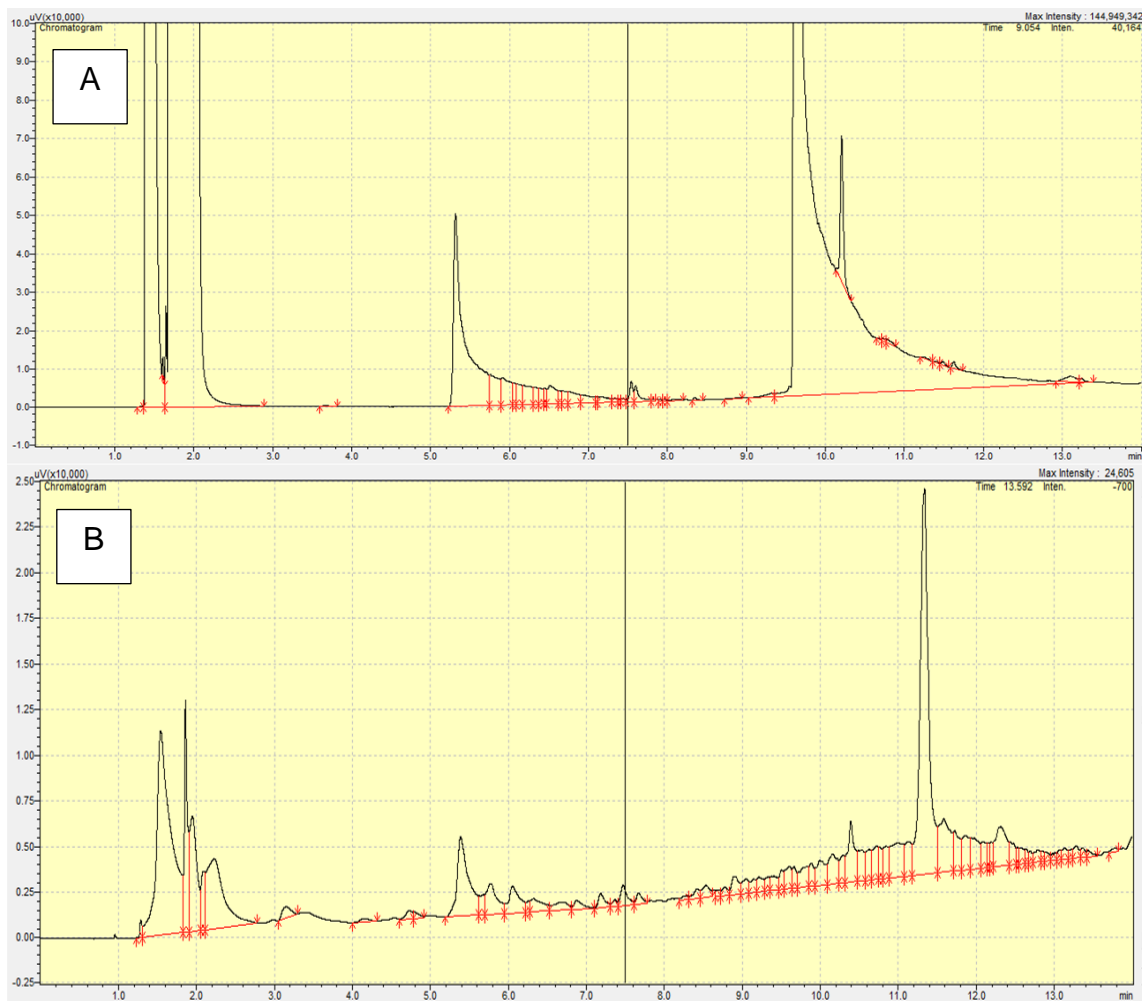


Figura 8: Cromatogramas obtenidos de la búsqueda de ácido salicílico en las muestras de lixiviado del biofiltro. Se muestra el cromatograma de un estándar de ácido salicílico (A) y el del lixiviado obtenido a partir del biofiltro (B).

3.1.4 Prueba de carga y prueba de flujo

Los resultados obtenidos para la prueba de carga del primer biofiltro se muestran en la Figura 9, en la cual se pudo observar un aumento prácticamente simultáneo de la cantidad de naftaleno eliminado con respecto a la carga de naftaleno (R^2 de 0,9959) con una eficiencia de remoción promedio del 91% (pendiente de 0,9138). Las condiciones de biofiltración no permitieron aumentar la carga de naftaleno

más allá del rango mostrado y dentro de este rango no se observó una fase de saturación de esta curva, por lo que no se pudo observar una carga de saturación crítica.

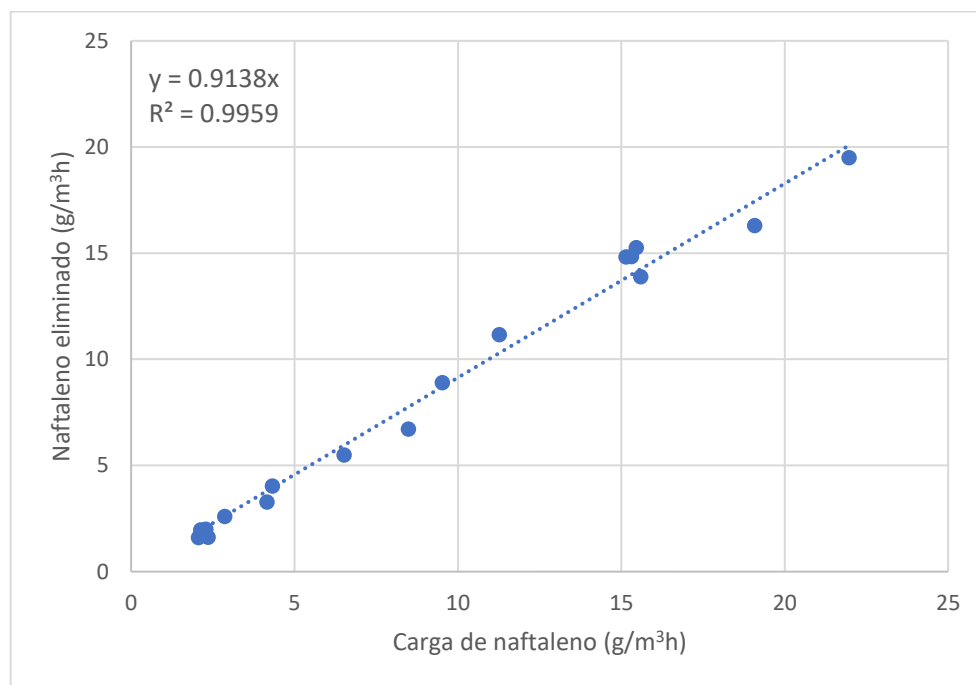


Figura 9: Prueba de carga del biofiltro 1. Se muestra la eliminación de naftaleno del primer biofiltro en relación con la carga de naftaleno suministrada.

Los resultados obtenidos para la prueba de flujo se muestran en la Figura 10. En la Figura 10A se muestran los puntos seleccionados en los cuales se buscó que la carga se mantuviera lo más constante posible alrededor de los 6 g/m³h, mientras que en la Figura 10B se muestran los resultados principales relacionados con la prueba de flujo del biofiltro 1. Durante esta prueba se pudo observar que la eficiencia de remoción del biofiltro se mantuvo inalterada, oscilando entre un 70% y 98% de manera similar a la fase constante de la puesta en marcha.

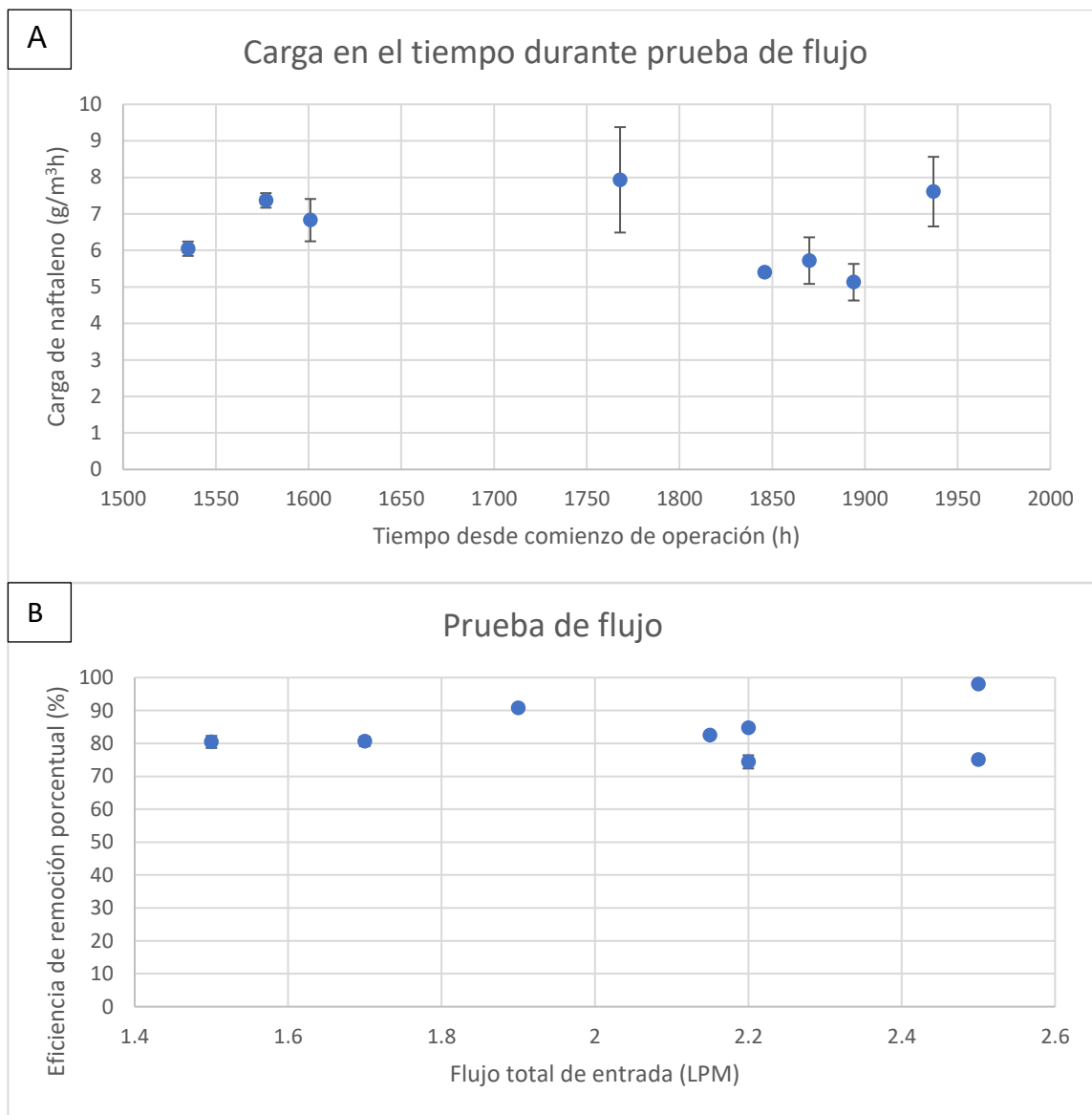


Figura 10: Prueba de Flujo del biofiltro 1. Se muestra la carga a lo largo del tiempo que duró la prueba de flujo (A) y la eficiencia de remoción porcentual en relación con el flujo de entrada del biofiltro (B).

Al final de la operación del biofiltro 1 se obtuvo otra muestra de vermiculita para secuenciar la comunidad microbiana presente en ella.

3.2 Secuenciación de marcadores moleculares de la comunidad presente en el biofiltro

Las dos muestras de vermiculita obtenidas se secuenciaron para los marcadores 16S de bacterias e ITS de hongos en Macrogen, Corea. Con respecto a las secuencias encontradas para el marcador ITS, éstas no se pudieron analizar debido a que se compararon con bases de datos de ITS y no se pudieron asociar con ningún microorganismo presente en la base de datos UNITE. Los principales resultados para la asignación taxonómica del marcador 16S se muestran en la Figura 11.

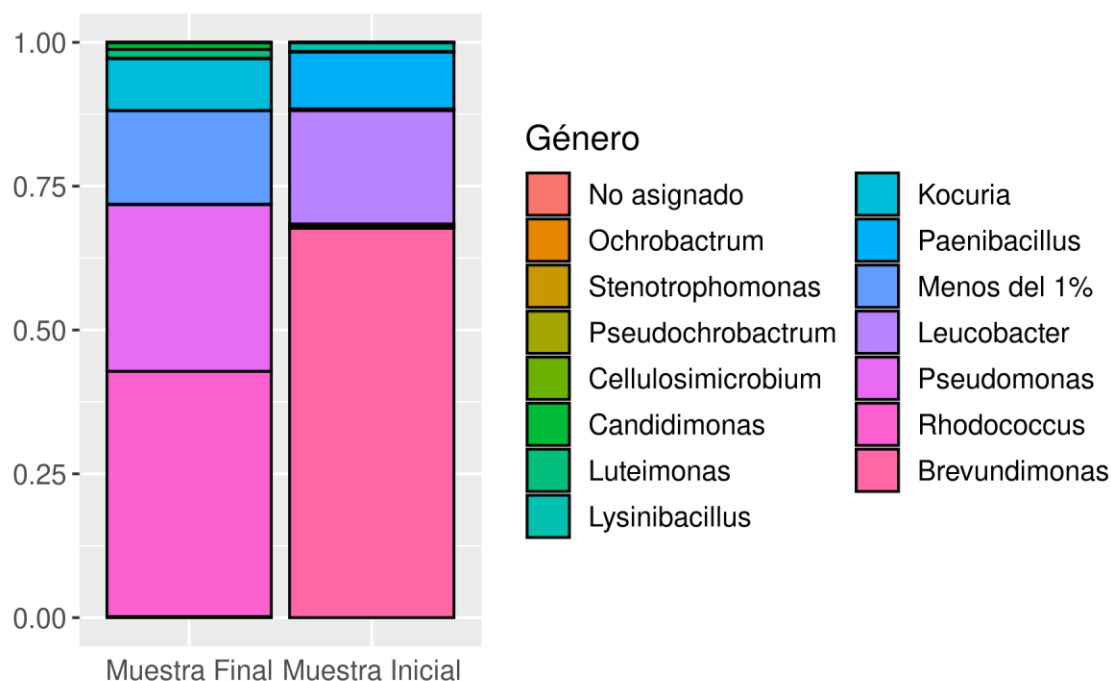


Figura 11: Asignación taxonómica a nivel de género de las bacterias presentes en las muestras de vermiculita obtenidas al comienzo de la operación del biofiltro 1 y al terminar con su primera prueba de fujo. Con la etiqueta “Menos del 1%” se agruparon los géneros de bacterias que presentaron una abundancia relativa menor al 1% en todas las muestras analizadas.

Se observó que a pesar de que el biofiltro se inoculó en un comienzo con *F. solani* y *R. erythropolis* no se detectó una alta abundancia del género *Rhodococcus* en la muestra inicial. Sin embargo, se observó un enriquecimiento del género *Rhodococcus* desde la muestra inicial a la final.

Con respecto a la predicción funcional de genes, se realizó una predicción y búsqueda de genes relacionados con la degradación de naftaleno en las muestras de biofiltros utilizando PICRUSt2. Los principales resultados obtenidos se resumen en la Figura 12, comparando las funciones encontradas en el tiempo inicial y final de operación del biofiltro. En general se observó para las vías encontradas que éstas poseen una mayor abundancia en la muestra tomada al final de la operación del biofiltro.

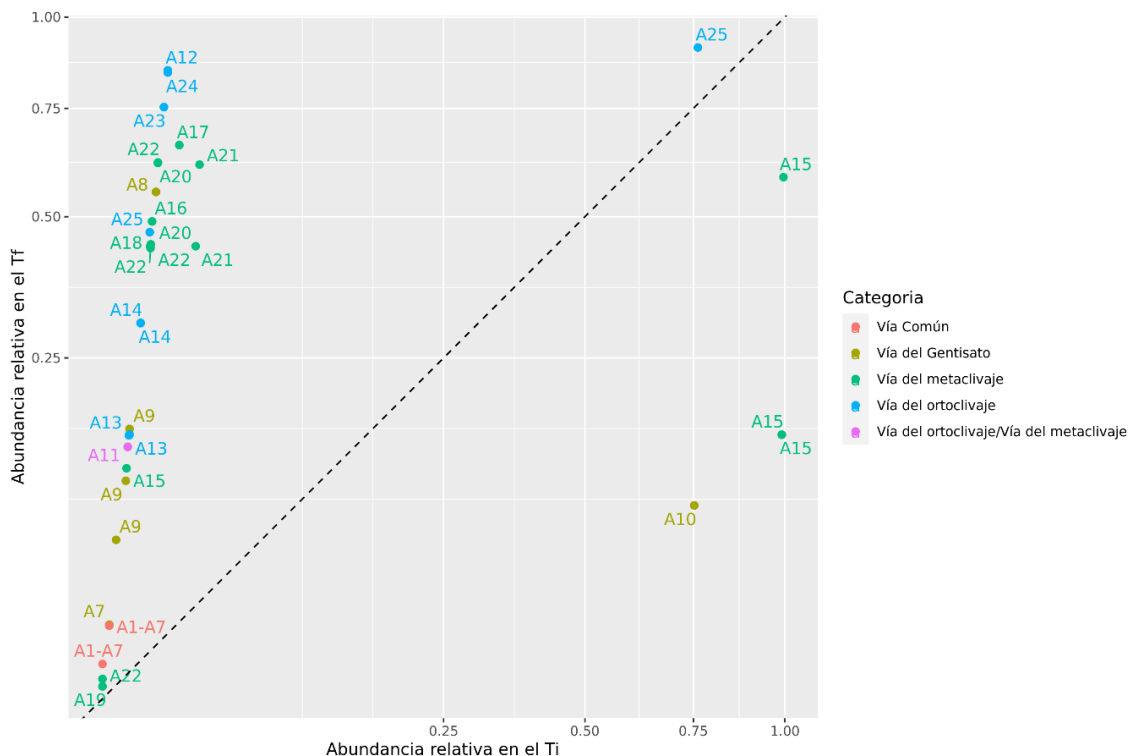


Figura 12: Comparación de los genes predichos relacionados con la degradación de naftaleno entre el tiempo inicial y tiempo final de operación del biofiltro. En el eje horizontal se muestra la abundancia del gen en el tiempo inicial y en el eje vertical la abundancia del gen en el tiempo final. Ambos ejes fueron modificados a una escala de raíz cuadrática para poder observar de mejor manera los genes con una baja abundancia en ambas muestras. La línea punteada muestra la zona teórica donde ambas abundancias son iguales. Los códigos utilizados para cada gen se corresponden con los indicados en la Figura 1.

Adicionalmente, se buscó qué bacterias, que estuvieran enriquecidas en la etapa final del biofiltro, poseían cada una de las funciones encontradas, lo que se resume en la Figura 13. Se pudo observar que la mayoría de las funciones se encuentran aportadas principalmente por bacterias del género *Rhodococcus* seguido del género *Kocuria*, ambos pertenecientes a la clase *Actinobacteria*.

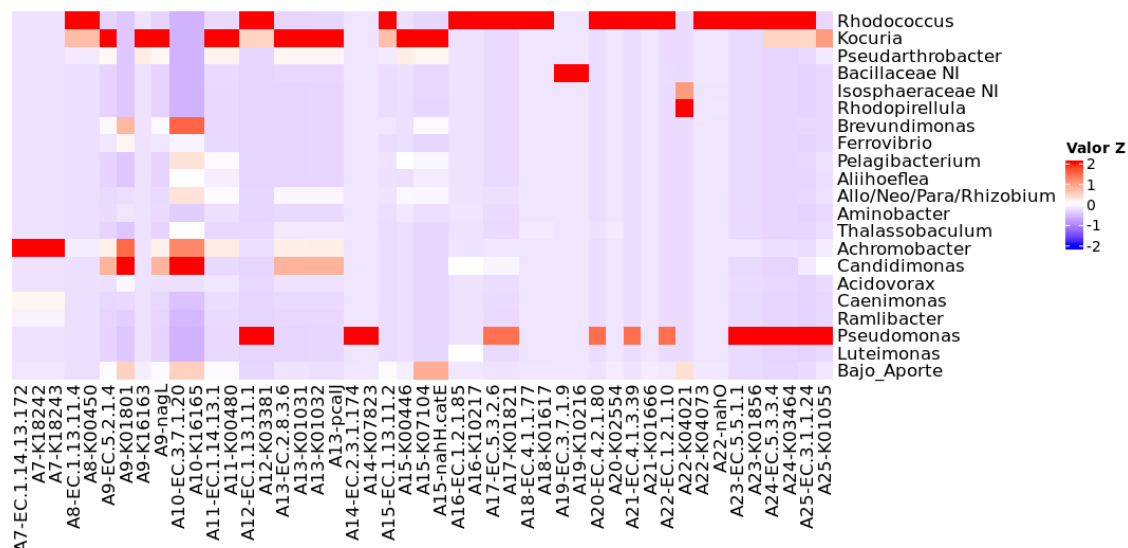


Figura 13: Géneros bacterianos que estuvieron enriquecidos en la etapa final del biofiltro y que poseen alguna de las funciones encontradas. El nombre de cada gen corresponde al código utilizado para este en la Figura 1 seguido del código utilizado para buscar este gen en la base de datos. El color representa el valor Z del aporte relativo de cada uno de estos géneros en relación con todas las bacterias que realizan esta función en la muestra. Los géneros que tuvieron un bajo aporte de las funciones buscadas (menor al 10%) fueron agrupados bajo la categoría de “Bajo Aporte”. NI se utilizó como abreviatura de “No identificado” para los géneros que no pudieron ser identificados hasta este nivel taxonómico, por lo que se utilizó el ultimo nivel de estas secuencias que pudo ser identificado.

3.3 Aislamiento e identificación de componentes de la comunidad del biofiltro

A partir del lixiviado del biofiltro 1 se obtuvieron distintos aislados, los cuales fueron asignados con nombres arbitrarios, obteniéndose cinco bacterias denominadas Bac10B, Bac9, BacA3-1, BacA3-2 y BacB1 y tres hongos, los cuales, sin embargo, no se pudieron identificar a través de las secuencias obtenidas, al igual que lo sucedido para las muestras obtenidas a partir de los

biofiltros. La identificación de las bacterias aisladas desde el lixiviado que percoló a través del biofiltro 1 se muestra en la Figura 14.

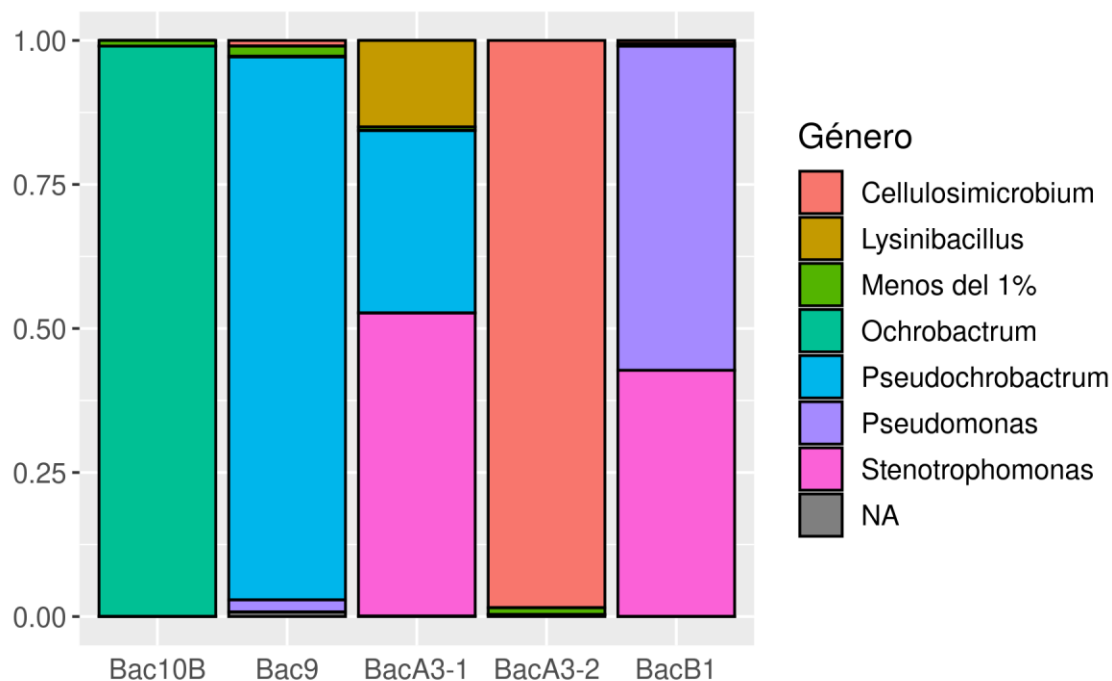


Figura 14: Asignación taxonómica a nivel de género de las bacterias aisladas desde el lixiviado del biofiltro 1. Con la etiqueta "Menos del 1%" se agruparon los géneros de bacterias que tuvieron una abundancia relativa menor al 1% en alguna de las muestras de aislados analizados.

Se puede observar que, a pesar de los esfuerzos por aislarlas, dos de las cinco bacterias correspondieron a consorcios. La muestra BacA3-1 correspondió a un consorcio entre bacterias de los géneros *Stenotrophomonas* (clase *Gammaproteobacteria*), *Pseudochrobactrum* (clase *Alphaproteobacteria*) y *Lysinibacillus* (clase *Bacilli*), y la muestra BacB1 correspondió a un consorcio entre bacterias de los géneros *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas* (clase

Gammaproteobacteria). Al comparar estos datos con los obtenidos desde las muestras de vermiculita del biofiltro 1, se pudo observar que los géneros de las bacterias aisladas en general correspondieron a una parte reducida de las comunidades presentes en las muestras de vermiculita, a excepción del género *Lysinibacillus* que posee una abundancia considerable en el biofiltro al final de la operación.

Por otro lado, los aislados Bac10B, Bac9 y BacA3-2 se consideraron aislados prácticamente puros de bacterias de los géneros *Ochrobactrum* (clase *Alphaproteobacteria*), *Pseudochrobactrum* (clase *Alphaproteobacteria*) y *Cellulosimicrobium* (clase *Actinobacteria*), respectivamente, ya que estos géneros representaban casi en su totalidad a los aislados, con porcentajes que podrían asociarse quizás a una contaminación cruzada entre las muestras cuando se extrajo la muestra de ADN.

Con respecto a las funciones predichas para los aislados utilizando PICRUSt2, se encontró que las principales bacterias presentes en los aislados denominados Bac10B y Bac9 corresponden a una bacteria del género *Ochrobactrum* y una bacteria del género *Pseudochrobactrum*, respectivamente, las que se predijo que poseen el set de genes relacionados con la biodegradación del naftaleno que corresponden al último paso de la vía del gentisato (A10) (fumarilpiruvato hidrolasa), primer paso de la vía del ortoclivaje/metaclivaje (A11) (salicilato hidroxilasa), segundo paso de la vía del metaclivaje (A15) (catecol 2,3-dioxigenasa) y un paso intermedio de la vía del ortoclivaje (A25) (3-oxoadipato

enol-lactonasa). El aislado denominado BacA3-1, resultó ser un consorcio entre la bacteria del género *Pseudochrobactrum* descrita anteriormente y una bacteria del género *Lysinibacillus*. Para esta última fue predicho que posee los genes del paso A15, descritas anteriormente, y también del paso A17, que corresponde a un paso intermedio de la vía del metaclivaje (4-oxalocrotonato isomerasa). Para la principal bacteria del aislado denominado BacA3-2, correspondiente al género *Cellulosimicrobium*, fue predicho que posee los genes del paso A15 descritos anteriormente, genes relacionados con uno de los últimos pasos de la vía del gentisato (A9) (maleilpiruvato isomerasa), y genes relacionados con el último paso de la vía del metaclivaje (A22) (acetaldehído deshidrogenasa). La principal bacteria del aislado denominado BacB1, que correspondió a una bacteria del género *Pseudomonas*, dentro de las bacterias aisladas fue la que poseyó una mayor cantidad de genes predichos asociados con la degradación del naftaleno, entre los cuales se incluyen genes relacionados con casi todos los pasos de la vía del ortoclivaje (A12-A23-A24-A25-A14) (todos a excepción del A13), genes relacionados con los primeros pasos de la vía del metaclivaje (A17) descrito anteriormente, y los genes relacionados con los últimos pasos de la vía del metaclivaje (A20-A22-A23). Por último, cabe destacar que para la bacteria de la especie *Stenotrophomonas maltophilia*, la cual se encontró en una alta abundancia formando un consorcio con las bacterias de los aislados Bac3-1 y BacB1, no se pudo predecir que posea ninguno de los genes que se buscaron como parte de las vías de biodegradación de naftaleno.

3.4 Montaje y operación del segundo biofiltro

A partir los aislados mencionados en el punto anterior, se realizó una inoculación de un segundo biofiltro, el cual fue puesto en marcha en las mismas condiciones del biofiltro anterior. Adicionalmente, se mantuvo en funcionamiento el biofiltro 1 para comparar los resultados obtenidos con los del biofiltro 2. Los resultados obtenidos de la puesta en marcha del segundo biofiltro y del funcionamiento en paralelo del primer biofiltro se muestran en la Figura 15. Se puede observar en la Figura 15B que la puesta en marcha del segundo biofiltro fue más rápida que la del biofiltro anterior, alcanzando un máximo de eficiencia durante la primera semana de operación y oscilando entre un 50% y un 90%, mientras que la del primer biofiltro se mantuvo oscilando entre un 70% y un 90% (Figura 15A).

Los resultados de la prueba de carga del biofiltro 2, la cual fue realizada en condiciones similares a la del biofiltro 1, se muestran en la Figura 16B del anexo. Durante la prueba de carga se observó un aumento, prácticamente simultáneo, de la eliminación de naftaleno con respecto a la carga de naftaleno para ambos biofiltros (R^2 de 0,9898 y 0,9908 para los biofiltros 2 y 1, respectivamente) con una eficiencia de remoción promedio aproximada del 91% para el biofiltro 2 (pendiente de 0,9058) y de 94% para el biofiltro 1 (pendiente de 0,9368). La carga de naftaleno no pudo ser aumentada más allá del rango medido, rango en el cual no se observó una fase de saturación de esta curva ni una carga de saturación crítica.

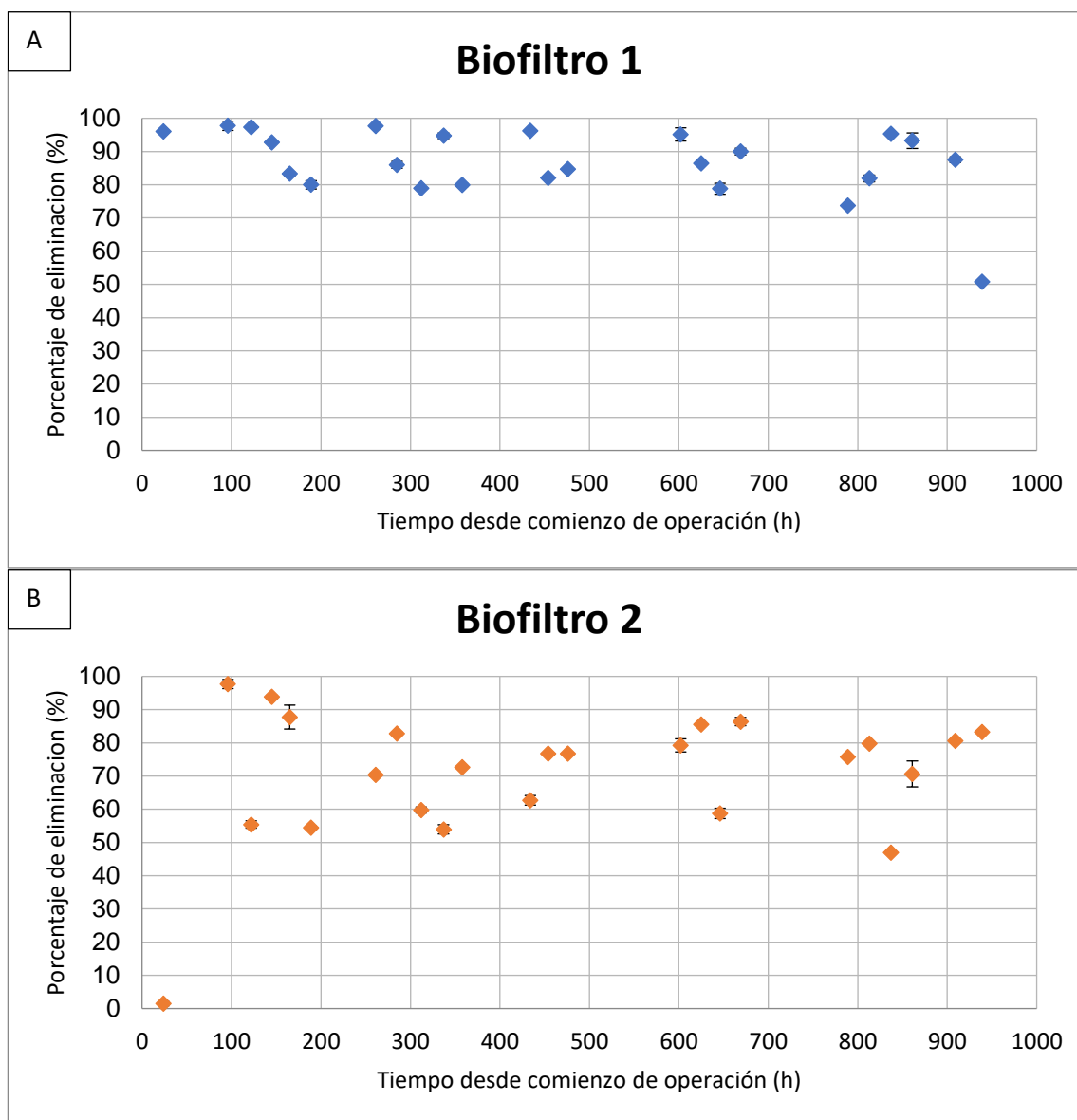


Figura 15: Resultados de porcentaje de eliminación obtenidos durante el tiempo en el que transcurre la fase de puesta en marcha del biofiltro 2. Se muestran los resultados del biofiltro 2 (A) y los del biofiltro 1 durante este mismo periodo de tiempo (B).

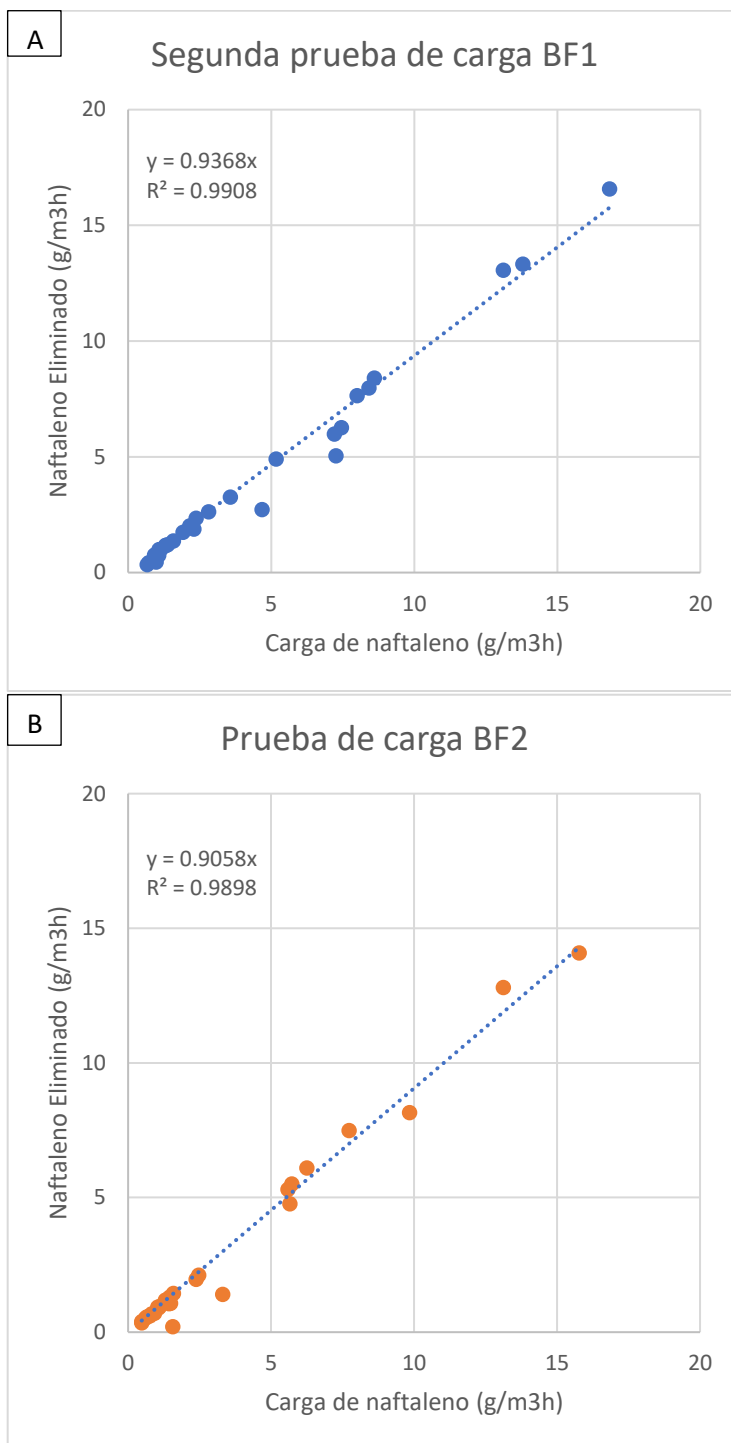


Figura 16: Resultados obtenidos durante la prueba de carga del biofiltro 2. Se muestran los resultados del biofiltro 2 (A) y los del biofiltro 1 durante la duración de esta prueba (B).

Los resultados obtenidos para la prueba de flujo del biofiltro 2 y la segunda prueba de flujo del biofiltro 1 se muestran en la Figura 17. En la Figura 17A se muestran los puntos seleccionados en los cuales se buscó que la carga se mantuviera lo más constante posible alrededor de los $2,5 \text{ g/m}^3\text{h}$, mientras que en la Figura 17B se muestran los resultados principales relacionados con la prueba de flujo del biofiltro 1. Durante esta prueba se pudo observar que la eficiencia de remoción del biofiltro 2 se mantuvo inalterada, oscilando entre un 80% y 100% hasta los 2,7 LPM, de manera similar a la fase constante de la puesta en marcha. Luego de esto, a los 3 LPM se observó una disminución de la eficiencia de remoción del biofiltro hasta un 70%.

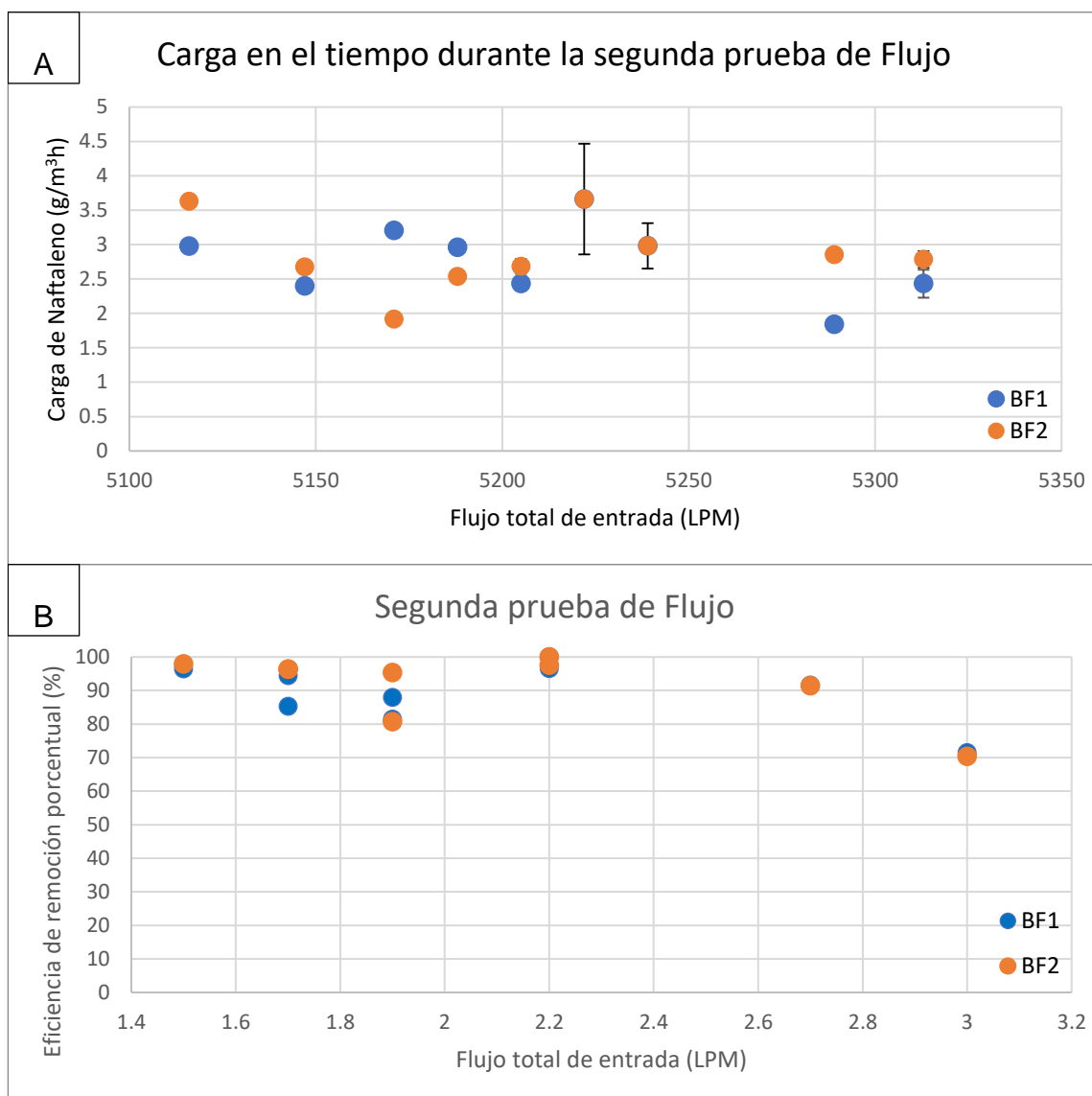


Figura 17: Segunda prueba de flujo del biofiltro 1 y prueba de flujo del biofiltro 2. Para ambos biofiltros se muestra la carga a lo largo del tiempo que duró la prueba de flujo (A) y la eficiencia de remoción porcentual en relación con el flujo de entrada del biofiltro (B).

DISCUSIÓN

4.1 Biofiltración del primer biofiltro

Entre las actividades que se llevaron a cabo durante la preparación del sistema de biofiltración, se realizó una medición de la variación de temperatura en la cámara de biofiltración, la cual presentó una oscilación entre 26°C y 46°C. Esto indica que la temperatura de esta cámara sería variable a lo largo del día y que sería afectada por la temperatura ambiental. Esto afectaría en primer lugar el crecimiento de los microorganismos, el cual seguiría estando dentro del rango óptimo de crecimiento característico de microorganismos mesófilos (10-50°C) (Tolner et al., 1997), pero sería menos relevante después de la puesta en marcha del biofiltro, debido a que después de esta etapa se habría producido el máximo crecimiento de microorganismos dentro del biofiltro. Además, podría afectar la carga de naftaleno que entra al biofiltro debido a que algunos grados pueden variar ampliamente la presión de vapor del naftaleno (Andrews, 1923), lo cual puede ser en parte mejorado tomando cuidado de realizar las mediciones en horarios similares, las cuales fueron realizadas todas durante el día entre las 8:00 h y las 18:00 h.

Adicionalmente, se llevó a cabo una prueba de adsorción con vermiculita seca y

húmeda con el objetivo de verificar que ésta no esté afectando las mediciones de degradación de la vermiculita. Por un lado, la cinética de adsorción con vermiculita seca no pudo ser realizada en su totalidad debido a que el tiempo que demoró fue superior a las 8 horas. Sin embargo, se midió la concentración de salida luego de 24 horas de comenzada la prueba y se observó que la concentración de salida ya había igualado a la de entrada, por lo que se puede inferir que la adsorción de naftaleno en la vermiculita seca terminaría dentro de las primeras 24 horas de operación. Sin embargo, cabe destacar que considerando las condiciones de biofiltración es más adecuado considerar la curva de adsorción con vermiculita húmeda, ya que en el biofiltro la columna de vermiculita siempre se mantiene humedecida con medio mineral, la cual se completó a lo largo de la primera media hora (Figura 6). De todas maneras, considerando los tiempos de operación de los biofiltros, los cuales se realizan durante meses, el tiempo que demoraron ambas curvas de adsorción no afectaría la medición de la degradación por parte de los microorganismos. Según esto, una fase en la cual la vermiculita se adsorbe en el biofiltro podría ocurrir durante los primeros días de operación, como se observa durante los primeros cinco días de operación del biofiltro 1 (Figura 7), tiempo en el cual se podría explicar la mayor eliminación de naftaleno por parte del biofiltro ya que el naftaleno está siendo adsorbido en la vermiculita y que a medida que la vermiculita se satura de naftaleno disminuiría la eliminación de naftaleno. Por lo tanto, después de pasado este tiempo se podría atribuir la eliminación de naftaleno exclusivamente a la

degradación por parte de los microorganismos. La puesta en marcha del biofiltro 1 terminó aproximadamente al día 20, con un porcentaje de eliminación relativamente constante variando entre un 70% y 100%.

Con respecto a la identificación de intermediarios utilizando GC-ms, no se logró encontrar ningún intermediario relacionado reportado anteriormente relacionado con la degradación de naftaleno según la literatura consultada. Esto en parte podría deberse a que los compuestos encontrados se relacionen con la descomposición de estos intermediarios o con reacciones no deseadas de estos intermediarios con el solvente utilizado. Adicionalmente, un intermediario conocido de la degradación del naftaleno (ácido salicílico) fue comparado mediante cromatografía de gases con el lixiviado obtenido desde el biofiltro, según lo cual se encontró en el lixiviado el pico correspondiente a este compuesto, lo cual sugiere que éste estaría presente como parte de los intermediarios de la degradación de naftaleno. El ácido salicílico sería un intermediario importante de la degradación de naftaleno por parte de las bacterias, ya que sería el intermediario final de la vía de degradación común (Peng et al., 2008), por lo que es esperable que se encuentre como parte de los intermediarios generados en el biofiltro.

Las pruebas de carga y flujo se realizaron para medir la eficiencia del biofiltro bajo distintas condiciones de operación. Esto es importante ya que, pensando en su posible aplicación como biofiltro de aire de interiores, la carga y el flujo al que se verán expuestos variará a lo largo del tiempo. Con respecto a la prueba de

carga se observó que el biofiltro fue capaz de eliminar casi todo el naftaleno cargado en el rango medido, lo cual fue similar para la prueba de flujo.

4.2 Análisis de marcadores moleculares secuenciados a partir de la comunidad presente en el biofiltro

Se observó que la comunidad inicial del biofiltro era diversa a pesar de que el inóculo inicial tenía solamente un hongo y una bacteria, encontrándose una baja abundancia relativa del género *Rhodococcus* (Figura 11). Esto podría indicar que la comunidad presente en la vermiculita sigue siendo más abundante a pesar del inóculo utilizado, o también podría deberse a que se secuenciaron muestras de ADN de microorganismos muertos luego de la esterilización de la vermiculita.

Con respecto a la predicción de genes relacionados con la degradación de naftaleno utilizando PICRUS2, no se pudo predecir ningún gen de la vía común a excepción de los genes del componente ferredoxina reductasa de la naftaleno dioxigenasa y del componente ferredoxina de la naftaleno dioxigenasa marcados como “A1-A7” (Figura 12); sin embargo, estos genes no codificarían para proteínas con una función catalítica por sí mismas, por lo que por sí solos no son indicadores de que esta vía pueda llevarse a cabo. Esto sería un resultado poco esperado, ya que estas vías serían muy relevantes en la degradación de naftaleno al ser la parte de la vía de degradación que es común (Peng et al., 2008). Posibles explicaciones para esto es que esta función pueda estar suministrada por los hongos de la comunidad, los cuales no pudieron ser

secuenciados, ya que se ha descrito que en la naturaleza serían principalmente los hongos los que realizarían los pasos iniciales de la degradación de los HPAs (Morales et al., 2017). También podría deberse a que haya otros genes que codifican enzimas que cumplirían esta función y que no hayan sido reportados con anterioridad, o que al ser estos ambientes poco descritos a nivel de las comunidades bacterianas esté primando una de las limitaciones de esta metodología, que corresponde a que en este ambiente en particular las bacterias encontradas podrían tener genes y funciones los cuales no están asociados en la base de datos debido a que esto puede variar de un ambiente a otro (Douglas et al., 2020). Por lo tanto, estos genes no estarían siendo detectados por esta metodología, en especial considerando que estos operones usualmente se asocian a elementos genéticos móviles (Phale et al., 2019), por lo que es esperable que exista una alta transferencia horizontal de estos genes en este ambiente. Finalmente, no puede descartarse que la muestra se puede haber obtenido desde una región de la columna de vermiculita donde no había suficiente concentración de naftaleno, como una zona muy elevada de la columna. Por otro lado, considerando que los genes asociados a la degradación de naftaleno usualmente se encuentran codificados en operones (Phale et al., 2019), es poco esperable que algunas taxa bacterianas posean solo algunos de los genes de cada vía, lo cual podría estar relacionado con la alta variabilidad que poseen estos operones (Phale et al., 2019).

Cabe destacar que la abundancia de la gran mayoría de los genes buscados para

la degradación de naftaleno se encuentra aumentada en la muestra obtenida al final del tiempo de operación del biofiltro (Figura 12). Esto indicaría que en la comunidad del biofiltro se seleccionaron estas funciones debido a la presencia de la presión de selección que sería la presencia de naftaleno como única fuente de carbono.

4.3 Análisis de marcadores moleculares secuenciados a partir de los aislados obtenidos a partir del primer biofiltro

Con respecto a los aislados, las predicciones realizadas no permiten explicar cómo es que estos aislados pueden sobrevivir con naftaleno como su única fuente de carbono, en especial considerando el hecho de que en estas bacterias tampoco se pudo predecir que está presente la vía común de degradación del naftaleno que es necesaria para la degradación de este compuesto. Esto refuerza la idea de que se pueden estar utilizando genes que no están descritos o que normalmente no se asocian con estas taxa bacterianas. Adicionalmente, se puede observar que, según la predicción realizada, a excepción de las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, estas taxa no estarían aportando considerablemente a la degradación de naftaleno en el biofiltro (Figura 13), ya que ninguno de los géneros de los aislados se encontró un aporte por sobre el límite establecido de un 10% de abundancia. Se ha descrito anteriormente la capacidad de bacterias del género *Pseudomonas* para degradar naftaleno, sin embargo, a diferencia de lo encontrado en este trabajo, ha sido posible identificar

en aislados de este género el gen de la naftaleno dioxigenasa (A1 Figura 1) mediante PCR (Rajan et al., 2019). En este último trabajo además se lograron aislar bacterias del género *Cellulosimicrobium* capaces de degradar naftaleno, a las cuales no se les habría podido identificar un gen de la naftaleno dioxigenasa, de manera similar a lo que se observó en el presente trabajo. La naftaleno dioxigenasa ha sido detectada también en bacterias pertenecientes al género *Ochrobactrum* (Ortega-González et al., 2018) y la capacidad de degradar naftaleno ha sido reportada anteriormente para bacterias de los géneros *Lysinibacillus* (Hernández-Santana & Dussán, 2018; Nwinyi & Amund, 2017). En cambio, según la búsqueda realizada no se ha reportado la degradación de naftaleno por parte de bacterias del género *Pseudochrobactrum*, sin embargo, se han relacionado estas bacterias con la degradación de otros contaminantes orgánicos (Xu et al., 2018). Por último, el tratamiento con naftaleno de suelos contaminados permitió detectar la presencia de bacterias del género *Cellulosimicrobium* y *Stenotrophomonas*, las cuales no fueron detectadas en los suelos sin tratar (El-Sayed et al., 2021), esto se podría considerar análogo a lo encontrado en este trabajo, en el cual estos géneros se encontraron en baja abundancia en el biofiltro, pero aun así fue posible aislarlos al utilizar naftaleno como única fuente de carbono.

Considerando estos antecedentes, es esperable que estas bacterias puedan crecer utilizando naftaleno como única fuente de carbono y la falta de información sobre la vía de degradación que tendrían estas bacterias se debería

principalmente a limitaciones en la metodología utilizada, quizás relacionado con la base de datos utilizada, la cual se centra en metagenomas principalmente de suelos, en los cuales estas bacterias estarían en baja abundancia y por lo tanto sería difícil reconstruir genomas de estas especies mediante secuenciación tipo shotgun.

3.4 Montaje y operación del segundo biofiltro

Con respecto a la disminución en el tiempo de la puesta en marcha del segundo biofiltro, esto es deseable debido a que una de las limitaciones de la biofiltración corresponde al tiempo elevado de la puesta en marcha. Se alcanzó un porcentaje de remoción menor al del biofiltro anterior, oscilando entre un 50% y un 90%, mientras que la del biofiltro 1 se mantuvo entre 70% y 98% (Figura 9) de manera similar a la fase constante de la puesta en marcha del primer biofiltro (Figura 7). Esto es interesante ya que las bacterias que se aislaron para inocular el segundo biofiltro corresponden a una pequeña porción de la comunidad que forma parte del biofiltro y, a pesar de esto, estas bacterias tuvieron la capacidad de adaptarse rápidamente a las condiciones de biofiltración disminuyendo el tiempo necesario para la puesta en marcha. Esto podría tener relación con que en estas comunidades bacterianas artificiales, y también en las comunidades naturales, existe una alta redundancia funcional (H. Chen et al., 2022), lo que indicaría que se aislaron bacterias claves para el funcionamiento del biofiltro a pesar de que estas se hayan encontrado en una baja proporción.

Durante la prueba de carga se observó que ambos biofiltros fueron capaces de eliminar casi todo el naftaleno cargado en el rango medido, por lo que no se observó una fase de saturación de esta curva ni una carga de saturación crítica (Figura 16). En una primera instancia, el segundo biofiltro (Figura 16B) tuvo una eficiencia de remoción un poco menor que la del primer biofiltro en su primera prueba de carga (Figura 9) y también se observó que el primer biofiltro (Figura 16A) mejora en aproximadamente un 3% su eficiencia de remoción promedio con respecto a su primera prueba de carga, con lo que se observa que con los meses de operación se sigue optimizando la remoción del contaminante en el biofiltro 1 a lo largo del tiempo.

Para la segunda prueba de flujo del biofiltro 1 realizada en paralelo con la prueba de flujo del biofiltro 2, se observó que la carga disminuyó a un poco más de la mitad (Figura 17A) con respecto a la primera prueba de carga (Figura 10A). Esto estaría relacionado con que habría una limitación en la cantidad de naftaleno que se logró vaporizar en el sistema y que, al duplicar el flujo para alimentar ambos biofiltros, se estaría disminuyendo la carga. Con respecto a la prueba de flujo en sí, se pudo observar que hasta los 2,7 LPM hubo una mejora en la cantidad de naftaleno eliminado de ambos biofiltros con respecto a la primera prueba de flujo del biofiltro 1 (Figura 17B con respecto a la Figura 10B); luego de esto, al alcanzar los 3 LPM disminuye la eficiencia de remoción de ambos biofiltros a un 70%, aunque este valor se encuentra dentro del rango de remoción de la primera prueba de flujo, lo cual además se mantiene sobre el rango de remoción de

sistemas de biofiltración utilizados para otros PAHs (Morales et al., 2017). De manera general estos resultados permiten predecir que, a pesar de que desde el biofiltro 1 se obtuvieron microorganismos que no se encontraban con una alta abundancia relativa en la comunidad final, estos de todas maneras permitieron generar un segundo biofiltro que logró alcanzar una eficiencia similar a la del primer biofiltro con un menor tiempo de operación. Considerando esto y lo enunciado anteriormente sobre la información encontrada de la degradación de naftaleno por parte de estas bacterias, sería interesante estudiarlas utilizando otras técnicas, como por ejemplo secuenciación de genomas para poder conocer de mejor manera cómo es que estas bacterias llevan a cabo la degradación de naftaleno.

Por último, los resultados obtenidos indican que la selección de microorganismos novedosos desde ambientes artificiales, como lo es un biofiltro, permitiría encontrar microorganismos mejor adaptados a las condiciones propias del ambiente artificial, en este caso el de biofiltración, lo cual permitiría mejorar distintos parámetros relacionados con la función que tendrían estos ambientes, como lo fue en este caso el tiempo necesario para la puesta en marcha del biofiltro. Una iteración de este proceso podría permitir seleccionar microorganismos cada vez más capaces de llevar a cabo estos procesos.

CONCLUSIONES

Durante la operación de un biofiltro inoculado con *F. solani* y *R. erythropolis* para el tratamiento de vapores de naftaleno, este consorcio fue desplazado por microorganismos ambientales.

La herramienta de predicción funcional utilizada (PICRUSt2) no fue capaz de reconstruir las vías de degradación de naftaleno completas para las comunidades del biofiltro ni para los aislados. Esto podría deberse a que los microorganismos se encuentran en un ambiente poco descrito, como es el ambiente de la biofiltración.

La inoculación de un segundo biofiltro para el tratamiento de vapores de naftaleno utilizando microorganismos provenientes de un primer biofiltro permitió disminuir el tiempo de aclimatación de la biofiltración manteniendo una eficiencia de remoción similar en las pruebas de carga y flujo, a pesar de que los microorganismos utilizados representarían solo a una pequeña proporción de la comunidad del primer biofiltro.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, M. R. (1923). Vapor pressure of naphthalene at low temperatures. *Journal of Physical Chemistry A*, 27(270), 1498–1500. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Arriaga, S., & Revah, S. (2005a). Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32(1), 548–553.
- Arriaga, S., & Revah, S. a. (2005b). Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol. Bioeng.*, 1(90), 107–115.
- Barona, A., Elías, A., Arias, R., Cano, I., & González, R. (2004). Biofilter response to gradual and sudden variations in operating conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 22(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.07.006>
- Borin, S., Marzorati, M., Brusetti, L., Zilli, M., Cherif, H., Hassen, A., Converti, A., Sorlini, C., & Daffonchio, D. (2006). Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air. *Biodegradation*, 17(2), 181–191. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-7565-5>
- Boyd, D. R., & Sheldrake, G. N. (1998). The dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols. In *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/a815309y>
- Briones, A., & Raskin, L. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 270–276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00065-X)
- Cabrol, L., Malhautier, L., Poly, F., Lepeuple, A. S., & Fanlo, J. L. (2012). Bacterial dynamics in steady-state biofilters: Beyond functional stability. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 260–271. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01213.x>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

- <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900459>
- Chen, C., & Zhao, B. (2011). Review of relationship between indoor and outdoor particles: I/O ratio, infiltration factor and penetration factor. In *Atmospheric Environment* (Vol. 45, Issue 2, pp. 275–288). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.048>
- Chen, H., Ma, K., Lu, C., Fu, Q., Qiu, Y., Zhao, J., Huang, Y., Yang, Y., Schadt, C. W., & Chen, H. (2022). Functional Redundancy in Soil Microbial Community Based on Metagenomics Across the Globe. *Frontiers in Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.878978>
- Chen, I., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J. R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S. P., Woyke, T., Elie-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2019). IMG/M v.5.0: An integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D666–D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gky901>
- Cheng, Z., Li, C., Kennes, C., Ye, J., Chen, D., Zhang, S., Chen, J., & Yu, J. (2017). Improved biodegradation potential of chlorobenzene by a mixed fungal-bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 123, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.008>
- Cheng, Z., Lu, L., Kennes, C., Ye, J., Yu, J., Chen, D., & Chen, J. (2016a). A composite microbial agent containing bacterial and fungal species: Optimization of the preparation process, analysis of characteristics, and use in the purification for volatile organic compounds. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.001>
- Cheng, Z., Lu, L., Kennes, C., Yu, J., & Chen, J. (2016b). Treatment of gaseous toluene in three biofilters inoculated with fungi/bacteria: Microbial analysis, performance and starvation response. *Journal of Hazardous Materials*, 303, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.017>
- Daims, H., Taylor, M. W., & Wagner, M. (2006). Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.002>
- Davison, B. H., Barton, J. W., Klasson, K. T., & Francisco, A. B. (2000). Influence of high biomass concentrations on alkane solubilities. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 279–284.
- Deshusses, M. A., & Johnson, C. T. (2000). Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment. *Environmental Science and Technology*, 34(3), 461–467. <https://doi.org/10.1021/es9909172>
- Díaz-Robles, L. A., Fu, J. S., Vergara-Fernández, A., Etcharren, P., Schiappacasse, L. N., Reed, G. D., & Silva, M. P. (2014). Health risks caused by short term exposure to ultrafine particles generated by residential wood combustion: A case study of Temuco, Chile. *Environment International*.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor,

- C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 2020 38:6, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2019). PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 672295. <https://doi.org/10.1101/672295>
- Elhusseiny, S. M., Amin, H. M., & Shebl, R. I. (2019). Modulation of laccase transcriptome during biodegradation of naphthalene by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Microbiology*, 22(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00041-5>
- Elías, A., Barona, A., Gallastegi, G., Rojo, N., Gurtubay, L., & Ibarra-Berastegi, G. (2010). Preliminary acclimation strategies for successful startup in conventional biofilters. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 60(8), 959–967. <https://doi.org/10.3155/1047-3289.60.8.959>
- El-Sayed, W. S., Al-Fraidi, A. A., Al-Kaff, N. S., & Elbadry, M. M. (2021). Dynamics of PAH-Degrading Bacteria and Corresponding Marker Genes in Different Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils in Almadina Almunawarah, KSA. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 60(1), 1–16. <https://doi.org/10.21608/EJAPS.2021.92563.1005>
- Estrada, J. M., Hernández, S., Muñoz, R., & Revah, S. (2013). A comparative study of fungal and bacterial biofiltration treating a VOC mixture. *Journal of Hazardous Materials*, 250–251, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.064>
- Fletcher, L. A., Jones, N., Warren, L., & Stentiford, E. I. (2014). *Understanding biofilter performance and determining emission concentrations under operational conditions*. June, 179.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Gran-Scheuch, A., Fuentes, E., Bravo, D. M., Jiménez, J. C., & Pérez-Donoso, J. M. (2017). Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01634>
- Groenestijn. (1993). Biotechniques for air pollution control Existing biotechniques. *Biodegradation*, 4, 283–301.
- Guieysse, B., Hort, C., Platel, V., Munoz, R., Ondarts, M., & Revah, S. (2008). Biological treatment of indoor air for VOC removal: Potential and challenges. In *Biotechnology Advances* (Vol. 26, Issue 5, pp. 398–410). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.005>
- Hadibarata, T., Teh, Z. C., Rubiyatno, Zubir, M. M. F. A., Khudhair, A. B., Yusoff, A. R. M., Salim, M. R., & Hidayat, T. (2013). Identification of naphthalene

- metabolism by white rot fungus *Pleurotus eryngii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(10), 1455–1461. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0884-8>
- Hadibarata, T., Yusoff, A. R. M., Aris, A., & Kristanti, R. A. (2012). Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022. *Journal of Environmental Sciences*, 24(4), 728–732. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60843-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60843-7)
- Hays, S. G., Patrick, W. G., Ziesack, M., Oxman, N., & Silver, P. A. (2015). Better together: Engineering and application of microbial symbioses. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.008>
- Hernández-Santana, A., & Dussán, J. (2018). *Lysinibacillus sphaericus* proved to have potential for the remediation of petroleum hydrocarbons. *Soil and Sediment Contamination*, 27(6), 538–549. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1490888>
- Iranpour, R., Cox, H. H. J., Deshusses, M. A., & Schroeder, E. D. (2005). Literature review of air pollution control biofilters and biotrickling filters for odor and volatile organic compound removal. *Environmental Progress*, 24(3), 254–267. <https://doi.org/10.1002/ep.10077>
- Jia, C., & Batterman, S. (2010). A Critical Review of Naphthalene Sources and Exposures Relevant to Indoor and Outdoor Air. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(7), 2903–2939. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072903>
- Jiang, X., Luo, Y., Yan, R., & Tay, J. H. (2009). Impact of substrates acclimation strategy on simultaneous biodegradation of hydrogen sulfide and ammonia. *Bioresource Technology*, 100(23), 5707–5713. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.055>
- Jin, Y., Guo, L., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2007). Fungal biofiltration of α -pinene: Effects of temperature, relative humidity, and transient loads. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 433–443. <https://doi.org/10.1002/bit.21123>
- Kannangara, S., Undugoda, L., Rajapaksha, N., & Abeywickrama, K. (2016). Depolymerizing Activities of Aromatic Hydrocarbon Degrading Phyllosphere Fungi in Sri Lanka. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 7(372), 2. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000372>
- Kennes, C., & Veiga, M. C. (2004). Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *Journal of Biotechnology*, 113(1–3), 305–319. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.037>
- Kraakman, N. (2003). Robustness of a full-scale biological system treating industrial CS₂ emissions. *Environmental Progress*, 22(2), 79–85. <https://doi.org/10.1002/ep.670220209>
- Kraakman, N., Rocha-Rios, J., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2011). Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 873–886. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3365-5>

- Lebrero, R., Rodríguez, E., Martín, M., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2010). H₂S and VOCs abatement robustness in biofilters and air diffusion bioreactors: A comparative study. *Water Research*, *44*(13), 3905–3914. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.008>
- Leson, G., & Winer, A. (1991). Biofiltration - an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *Journal of Air & Waste Management Association*, *41*(8), 1045–1054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10473289.1991.10466898>
- Leung, D. Y. C. (2015). Outdoor-indoor air pollution in urban environment: challenges and opportunity. *Frontiers in Environmental Science*, *2*(JAN), 69. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00069>
- Lu, L., Wang, G., Yeung, M., Xi, J., & Hu, H. Y. (2018). Response of microbial community structure and metabolic profile to shifts of inlet VOCs in a gas-phase biofilter. *AMB Express*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0687-z>
- Luengas, A., Barona, A., Hort, C., Gallastegui, G., Platel, V., & Elias, A. (2015). A review of indoor air treatment technologies. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 499–522). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9363-9>
- Morales, P., Cáceres, M., Scott, F., Díaz-Robles, L., Aroca, G., & Vergara-Fernández, A. (2017). Biodegradation of benzo[α]pyrene, toluene, and formaldehyde from the gas phase by a consortium of *Rhodococcus erythropolis* and *Fusarium solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(17), 6765–6777. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8400-8>
- Mori, T., Kitano, S., & Kondo, R. (2003). Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*(4), 380–383. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1253-3>
- Nemmar, A., Hoet, P. H. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., & Nemery, B. (2002). Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*, *105*(4), 411–414. <https://doi.org/10.1161/hc0402.104118>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1022>
- Nwinyi, O. C., & Amund, O. O. (2017). Biodegradation of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Axenic Bacterial Species Belonging to the Genera *Lysinibacillus* and *Paenibacillus*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* *2017* *41:3*, *41*(3), 577–587. <https://doi.org/10.1007/S40995-017-0291-0>

- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Ortega-González, D. K., Cancino-Díaz, J. C., Zaragoza, D., Flores-Ortiz, C. M., Cruz-Maya, J. A., & Jan-Roblero, J. (2018). *Ochrobactrum anthropi* BPyF3: Naphthalene biodegradation and the involvement of dioxygenase. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(1), 13310.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927–955. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>
- Phale, P. S., Shah, B. A., & Malhotra, H. (2019). Variability in Assembly of Degradation Operons for Naphthalene and its derivative, Carbaryl, Suggests Mobilization through Horizontal Gene Transfer. *Genes* 2019, Vol. 10, Page 569, 10(8), 569. <https://doi.org/10.3390/GENES10080569>
- Pino-Cortés, E., Díaz-Robles, L. A., Cubillos, F., Fu, J. S., & Vergara-Fernández, A. (2015). Sensitivity analysis of biodiesel blends on Benzo[a]pyrene and main emissions using MOVES: A case study in Temuco, Chile. *Science of the Total Environment*, 537, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.143>
- Pozo, K., Estellano, V. H., Harner, T., Díaz-Robles, L., Cereceda-Balic, F., Etcharren, P., Pozo, K., Vidal, V., Guerrero, F., & Vergara-Fernández, A. (2015). Assessing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using passive air sampling in the atmosphere of one of the most wood-smoke-polluted cities in Chile: The case study of Temuco. *Chemosphere*, 134, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.077>
- Preuss, R., Angerer, J., & Drexler, H. (2003). Naphthalene - An environmental and occupational toxicant. In *International Archives of Occupational and Environmental Health* (Vol. 76, Issue 8, pp. 556–576). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458-1>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Raboni, M., Torretta, V., & Viotti, P. (2017). Treatment of airborne BTEX by a two-stage biotrickling filter and biofilter, exploiting selected bacterial and fungal consortia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(1), 19–28. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1127-8>
- Rafin, C., Veignie, E., Woisel, P., Cazier, F., & Surpateanu, G. (2006). New Potential of a *Deuteromycete* Fungus *Fusarium Solani* in Benzo[a]pyrene Degradation: An Eco-physiological Hypothesis? In *New Frontiers in Environmental Research* (pp. 165–179).
- Rajamanickam, R., & Baskaran, D. (2017). Biodegradation of gaseous toluene

- with mixed microbial consortium in a biofilter: steady state and transient operation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(12), 1801–1812. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1834-7>
- Rajan, S., Pattanaik, A., Kumaresan, V., Bhatt, P., Gunasekaran, S., Arockiaraj, J., Pasupuleti, M., Beškoski, V. P., & Chakraborty, P. (2019). Characterization of some naphthalene using bacteria isolated from contaminated Cooum Riverine sediment of the Bay of Bengal (India). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84(2), 225–236. <https://doi.org/10.2298/JSC180724088R>
- Sanz, J. L., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. In *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>
- Sioutas, C., Delfino, R. J., & Singh, M. (2005). Exposure assessment for atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 113, Issue 8, pp. 947–955). National Institute of Environmental Health Sciences. <https://doi.org/10.1289/ehp.7939>
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., & Hu, Z. (2011). Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 62(10), 2122–2128. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.07.013>
- Spengler, J. D., & Sexton, K. (1983). Indoor air pollution: A public health perspective. *Science*, 221(4605), 9–17. <https://doi.org/10.1126/science.6857273>
- Spigno, G., Pagella, C., Fumi, M. D., Molteni, R., & de Faveri, D. M. (2003). VOCs removal from waste gases: Gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Science*, 58(3–6), 739–746. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00603-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00603-6)
- Srivastava, S., & Kumar, M. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A sustainable approach. *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*, 111–139. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_6
- Steele, J. A., Ozis, F., Fuhrman, J. A., & Devinny, J. S. (2005). Structure of microbial communities in ethanol biofilters. *Chemical Engineering Journal*, 113(1), 135–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.04.011>
- Tolner, B., Poolman, B., & Konings, W. N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(3), 423–428. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00003-0)
- Tresse, O., Lorrain, M. J., & Rho, D. (2002). Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 59(4–5), 585–590. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1039-z>
- Tsapakis, M., Lagoudaki, E., Stephanou, E. G., Kavouras, I. G., Koutrakis, P., Oyola, P., & Von Baer, D. (2002). The composition and sources of PM2.5 organic aerosol in two urban areas of Chile. *Atmospheric Environment*, 36(23), 3851–3863. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00269-8)
- Vergara-Fernández, A., Hernández, S., & Revah, S. (2010). Elimination of hydrophobic volatile organic compounds in fungal biofilters: Reducing start-up time using different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 758–765. <https://doi.org/10.1002/bit.23003>
- Vergara-Fernández, A., Revah, S., Moreno-Casas, P., & Scott, F. (2018a). Biofiltration of volatile organic compounds using fungi and its conceptual and mathematical modeling. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1079–1093. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.008>
- Vergara-Fernández, A., Soto-Sánchez, O., & Vásquez, J. (2011). Effects of Packing Material Type on n-Pentane/Biomass Partition Coefficient for Use in Fungal Biofilters. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(4), 439–444.
- Vergara-Fernández, A., Van Haaren, B., & Revah, S. (2006). Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnology Letters*, 28(24), 2011–2017. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9186-4>
- Vergara-Fernández, A., Yáñez, D., Morales, P., Scott, F., Aroca, G., Diaz-Robles, L., & Moreno-Casas, P. (2018b). Biofiltration of benzo[A]pyrene, toluene and formaldehyde in air by a consortium of *Rhodococcus erythropolis* and *Fusarium solani*: Effect of inlet loads, gas flow and temperature. *Chemical Engineering Journal*, 332, 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.095>
- Xu, X. H., Liu, X. M., Zhang, L., Mu, Y., Zhu, X. Y., Fang, J. Y., Li, S. P., & Jiang, J. D. (2018). Bioaugmentation of chloroethalonil-contaminated soil with hydrolytically or reductively dehalogenating strain and its effect on soil microbial community. *Journal of Hazardous Materials*, 351, 240–249. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.03.002>
- Zhai, J., Shi, P., Wang, Z., Jiang, H., & Long, C. (2017a). A comparative study of bacterial and fungal-bacterial steady-state stages of a biofilter in gaseous toluene removal: performance and microbial community. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(11), 2853–2861. <https://doi.org/10.1002/jctb.5302>
- Zhai, J., Wang, Z., Shi, P., & Long, C. (2017b). Microbial Community in a Biofilter for Removal of Low Load Nitrobenzene Waste Gas. *PLOS ONE*, 12(1), e0170417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170417>
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., & Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications.

Microbial Biotechnology, 11(5), 833–847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>