



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. Metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro.

T E S I S

Que para obtener el título de
Doctora en Biotecnología

PRESENTA:

M. en C. Elvia Inés García Peña

Asesores:

Director: Dr. Sergio Revah
Dr. Ernesto Favela
Dr. Richard Auria

México D.F.

11 de Julio 2002



sa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. Metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro.

T E S I S

Que para obtener el título de
Doctora en Biotecnología

PRESENTA:

M. en C. Elvia Inés García Peña

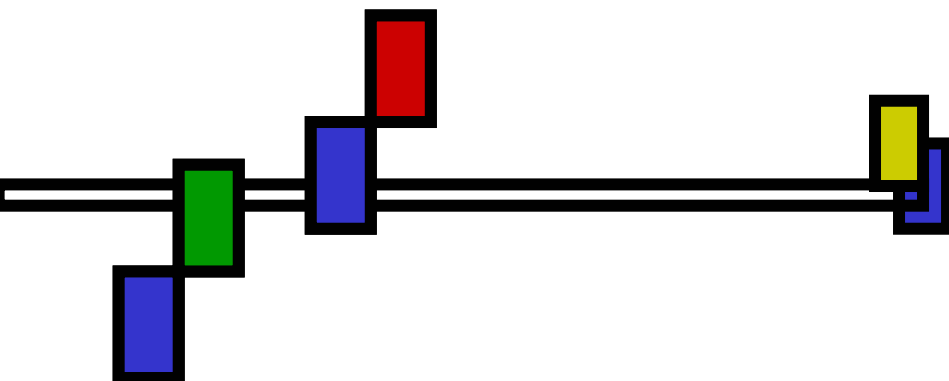
Asesores:

Director: Dr. Sergio Revah
Dr. Ernesto Favela
Dr. Richard Auria

México D.F.

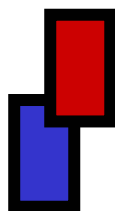
11 de Julio 2002

A mi hija



Agradecimientos

- Al Dr. Sergio Revah por su guía y apoyo permanente.
- Al Dr. Ernesto Favela y al Dr. Richard Auria, miembros de mi Comité Tutorial.
- A mi familia.
- A mis compañeros y amigos de la Planta de Bioprocesos y de la Planta de Fermentación Sólida.
- A los miembros del jurado: Dr. Ernesto Favela, Dr. Roberto Zazueta, Dr. Frederic Thalasso y Dr. Pierre Christen, por sus comentarios y tiempo dedicado a la corrección de este documento.
- Al Dr. José Sepulveda.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo parcial al presente trabajo y la impresión de la tesis.



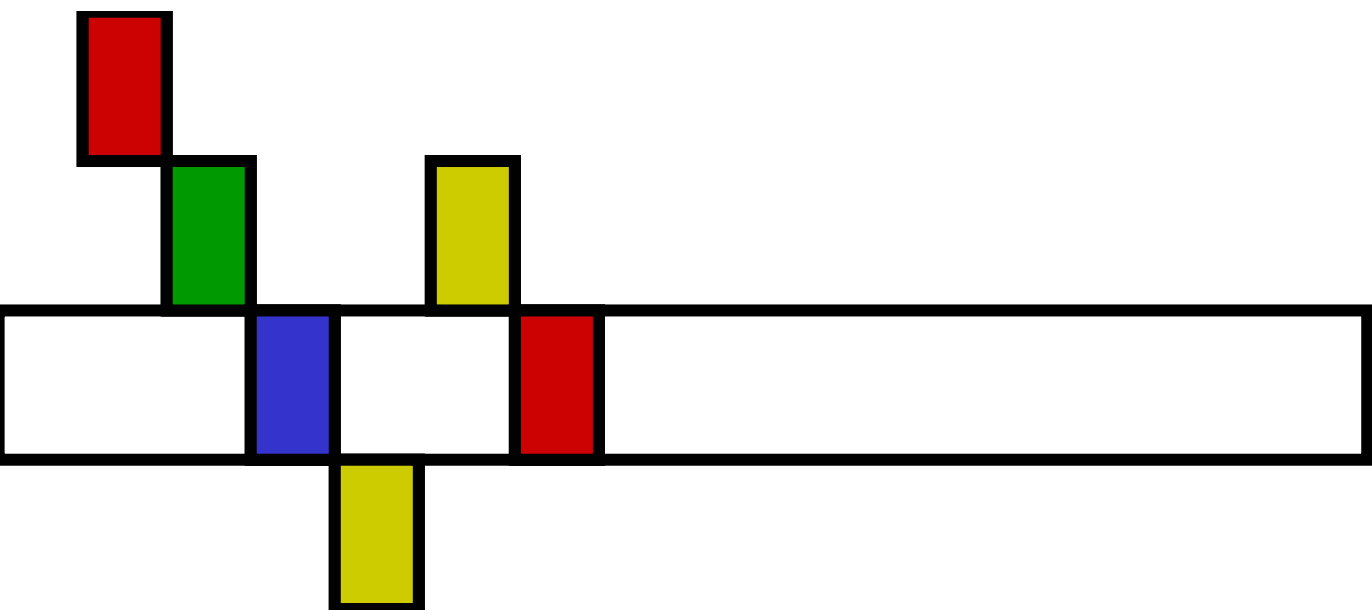
INDICE	i
I. RESUMEN	vi
II. INTRODUCCIÓN	1
1 Características, distribución, toxicidad y degradación del tolueno	1
1.1 Características generales del tolueno	1
1.2 Liberación de tolueno al ambiente	2
1.3 Distribución del tolueno en el ambiente	3
1.4 Niveles de tolueno monitoreados o estimados en el ambiente	4
1.5 Toxicidad del tolueno	6
1.6 Transformación y degradación del tolueno	7
1.7 Rutas metabólicas de degradación de tolueno	9
1.7.1 Rutas metabólicas de degradación de tolueno en bacterias	9
1.7.2 Rutas metabólicas de degradación de tolueno en hongos	12
1.8 Enzimas involucradas en la degradación de tolueno	15
1.8.1 Oxigenasas	15
1.8.1.1 Características generales	15
1.8.1.2 Monooxigenasas	15
1.8.1.3 Dioxigenasas	17
1.8.1.4 Tolueno mono y di oxigenasas	19
1.8.2 Deshidrogenasas	22
1.8.2.1 Características generales	22
1.8.2.2 Deshidrogenasas pirin-dependientes	23
1.8.2.3 Deshidrogenasas flavin-dependientes	23
1.8.2.4 Cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa	24

1.9 Vías metabólicas de degradación de otros sustratos aromáticos con hongos	25
1.10 <i>Scedosporium apiospermum</i>	29
1.11 Biofiltración en columnas pequeñas similares a sistemas de fermentación en medio sólido (F.M.S.)	31
2 Biofiltración	34
2.1 Características principales de la biofiltración	36
2.2 Ventajas de la biofiltración	37
2.3 Factores importantes en un biofiltro	39
2.3.1 Material de empaque	39
2.3.2 Población microbiana	41
2.3.3 Efecto de la humedad	43
2.3.4 Efecto de los nutrientes	45
2.3.5 Efecto del pH del empaque	47
2.3.6 Efecto de la temperatura	47
2.3.7 Efecto del sustrato	47
2.3.8 Factores que afectan la velocidad de eliminación del contaminante	48
2.3.9 Efecto del flujo de gas	51
2.3.10 Aclimatación del biofiltro	51
2.3.11 Biofiltración con hongos	52
III. JUSTIFICACIÓN	54
IV. OBJETIVOS	56
4.1 Objetivo general	56
4.2 Objetivos particulares	56
V. MATERIALES Y METODOS	57

5.1. Microorganismo	57
5.2 Suspensión de esporas	57
5.3 Medio de cultivo	57
5.4 Sistemas de cultivo	58
5.4.1 Crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> en medio líquido	58
5.4.2 Crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> en biofiltros de escala laboratorio (cultivo sólido)	58
5.4.3 Crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> bajo condiciones de biofiltración	59
5.4.3.1 Material de soporte	59
5.4.3.2 Reactor	60
5.4.3.3 Definiciones	62
5.5 Métodos analíticos	63
5.5.1 Determinación de tolueno	63
5.5.2 Determinación de O ₂ y CO ₂	64
5.5.3 Determinación de glucosa	66
5.5.4 Determinación de la biomasa	66
5.5.4.1 Determinación por peso seco	66
5.5.4.2 Determinación a través de la proteína del micelio	67
5.6 Metabolismo de degradación del tolueno	67
5.6.1 Crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> en presencia de los intermediarios de la vía metabólica de degradación de tolueno	67
5.6.2 Consumo de oxígeno con los distintos intermediarios	68
5.6.3 Determinación de actividades enzimáticas	69
5.6.3.1 Actividad de oxigenasas	69

5.6.3.2 Actividad de deshidrogenasas	70
5.7 Población microbiana	70
5.8 Microcosmos	71
IV. RESULTADOS	72
6.1 Caracterización del crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> con glucosa y tolueno como únicas fuentes de carbono y energía	72
6.1.1 Caracterización del crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> en cultivo líquido	72
6.1.2 Caracterización del crecimiento de <i>Scedosporium apiospermum</i> con tolueno en biofiltros escala laboratorio	79
6.1.3 Metabolismo fúngico vinculado a la degradación de tolueno. Evaluación de la posible ruta de degradación de tolueno en <i>Scedosporium apiospermum</i>	84
6.1.3.1 Crecimiento y producción de CO ₂ con los intermediarios de las diferentes rutas metabólicas de degradación de tolueno, como única fuente de carbono y energía	85
6.1.3.2 Consumos de oxígeno en presencia de los intermediarios de la vía metabólica de degradación de tolueno en <i>S. apiospermum</i>	89
6.1.4 Actividades enzimáticas asociadas a la vía metabólica de degradación de tolueno en <i>S. apiospermum</i>	91
6.1.4.1 Determinación de actividad de oxigenasas	91
6.1.4.2 Determinación de actividad de deshidrogenasas	96
6.1.3 Actividad enzimática de oxigenasas asociada a la actividad metabólica de degradación de tolueno	99
6.1.4 Efecto de la respiración endógena y del uso de inhibidores para reducir su magnitud	102
6.2 Biofiltración de tolueno con <i>S. apiospermum</i>	108

6.2.1 Patrón de crecimiento de <i>S. apiospermum</i> en el biofiltro	108
6.2.2 Efecto del contenido de humedad y la compactación del material de empaque sobre la capacidad de degradación de tolueno en el biofiltro	110
6.2.3 Efecto de la adición de nutrientes sobre la capacidad degradativa del biofiltro	112
6.2.4 Efecto de la carga sobre la capacidad de eliminación (C.E.)	118
6.2.5 Mantenimiento de altas actividades biológicas en el biofiltro fúngico por largos periodos de tiempo	119
6.2.6 Actividad enzimática oxigenasa asociada al funcionamiento del biofiltro fúngico	124
6.2.7 Evaluación de la población microbiana	130
6.2.8 Microscopía electrónica	131
VII.CONCLUSIONES	133
VIII. REFERENCIAS	136
IX. ANEXOS	151



I. RESUMEN



I. RESUMEN

En el presente trabajo, se estudió y evaluó la utilización de *Scedosporium apiospermum* para la biofiltración de tolueno y se establecieron los fenómenos metabólicos que rigen el proceso de biofiltración con el hongo. El tolueno fue usado como sustrato, ya que constituye un frecuente contaminante de corrientes gaseosas residuales debido a su amplio uso como solvente industrial, participa en reacciones que dan origen a otros compuestos contaminantes del aire y tiene efectos negativos sobre la salud humana. En la primera etapa del estudio el hongo fue crecido en medio de cultivo líquido con tolueno. 51.5 mg/L_T del compuesto aromático fueron consumidos en 45 horas, obteniendo una velocidad específica de consumo igual a 23.4 mg_{tolueno}/h g_{biomasa} y un rendimiento de biomasa en función a tolueno Y_{x/s} igual a 0.95 mg_{biomasa}/mg_{tolueno}. Al usar glucosa como sustrato inicial se redujo la fase de retardo a 4 horas y la misma concentración inicial de tolueno (51.5 mg/L_T) fue consumida en 24 horas.

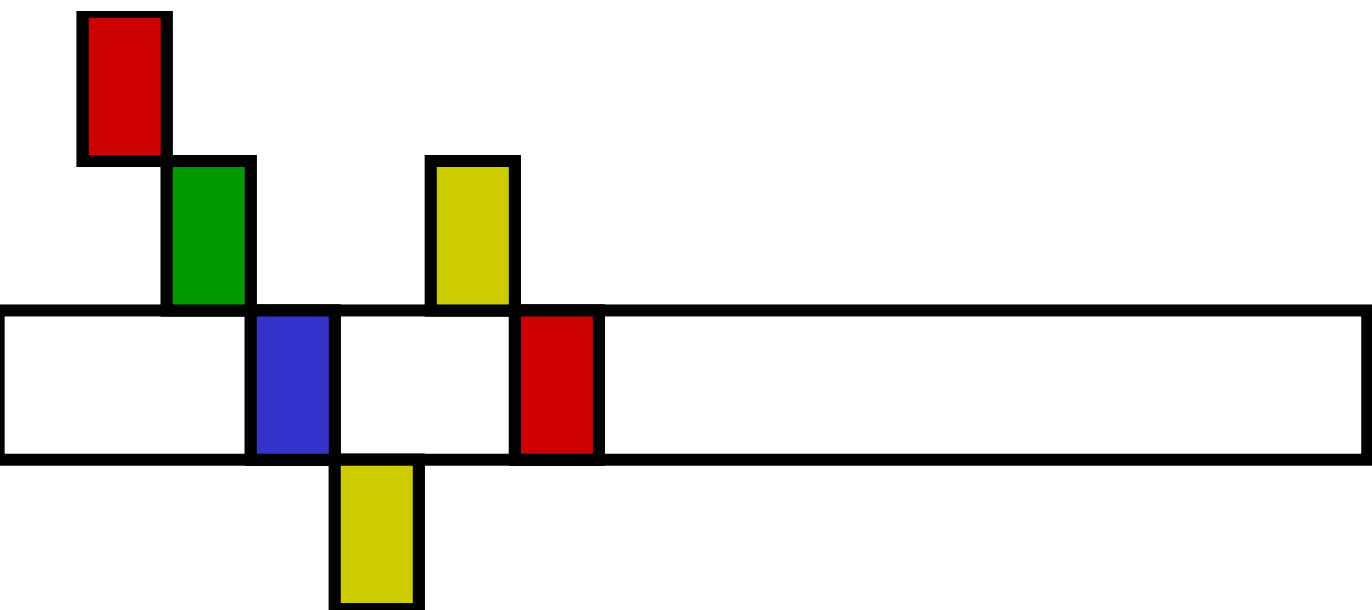
Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos con el fin de elucidar la ruta metabólica de degradación de tolueno presente en *S. apiospermum*. En esta parte se evaluó su crecimiento en presencia de los diferentes intermediarios de las vías metabólicas de degradación de tolueno, se determinó el consumo de oxígeno en presencia de los intermediarios como una medida de la actividad metabólica y se establecieron las técnicas para medir la actividad de oxigenasas y deshidrogenasas, enzimas involucradas en el catabolismo del compuesto aromático. En lo que se refiere al crecimiento, las producciones de CO₂ y de biomasa fueron mayores con alcohol bencílico, benzaldehído y catecol (13.9, 15.7 y 17.5 mg de CO₂, respectivamente). El microorganismo también fue capaz de crecer en presencia de m-cresol, p-cresol y protocatecuato (11.7, 11.4 y 12.2 mg de CO₂). Los patrones de crecimiento, de consumo de oxígeno y la determinación de la tolueno oxigenasa (24.4 nmolO₂/min mg_{proteína}) y de la alcohol bencílico deshidrogenasa (16.2 nmol_{cofactor reducido}/min mg_{proteína}) indicaron que el catabolismo del tolueno en *S. apiospermum* se lleva a cabo a través de la vía de ataque inicial al grupo metilo. Sin embargo, existen indicios de que el hongo puede contener más de una vía de degradación del tolueno, esto último ha sido

recientemente reportado para *Cunninghamella echinulata* CBS 596.68 (Prenafeta-Boldú y col., 2001).

En la segunda etapa, se determinó si el hongo degradaba el contaminante bajo condiciones de biofiltración en biofiltros a escala de laboratorio, sistema que permitió la operación de varios biofiltros simultáneamente. Debido a que los resultados mostraron que *S. apiospermum* alcanzaba altas tasas de degradación, el hongo fue crecido en un sistema de biofiltración de mayor escala, se optimizó la operación del biofiltro y se determinó la actividad enzimática asociada al consumo de tolueno. En el primer experimento de biofiltración se dejó que el proceso evolucionara sin realizar ninguna estrategia que favoreciera la degradación de tolueno. Durante este experimento se alcanzó una máxima C.E. de $120 \text{ g/m}^3\text{h}$, ésta última decreció rápidamente debido al secado y al compactamiento del material de soporte. En el segundo experimento se evaluó la adición de agua al sistema, una vez que la C.E. decrecía, obteniendo incrementos puntuales en el consumo de tolueno, los cuales no pudieron ser mantenidos. Posteriormente, se realizó la adición de medio mineral logrando el mantenimiento de las altas capacidades de eliminación (superiores a $150 \text{ g/m}^3\text{h}$) debido al incremento en la biomasa del biofiltro y al control en las pérdidas de humedad en el reactor. A través de la adición periódica de medio mineral, el biofiltro fúngico fue operado durante 100 días alcanzando una C.E. promedio de $250 \text{ g/m}^3\text{h}$, cuando se obtuvieron niveles importantes de biomasa ($61.8 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{gMS}$) y se establecieron condiciones ambientales apropiadas (humedad promedio igual a 61%).

S. apiospermum probó ser eficiente en la remoción de altas concentraciones de tolueno, por lo cual el siguiente objetivo fue estudiar el sistema enzimático que rige la degradación del tolueno en el sistema de biofiltración. La actividad de la tolueno oxigenasa, que había sido previamente determinada en biomasa proveniente de cultivo líquido y de biofiltros pequeños, fue medida en muestras tomadas a lo largo del biofiltro. Se determinaron valores de consumo de oxígeno de 131.2, 112.5, 112.5 y $93.8 \text{ nmolO}_2/\text{min}$, las actividades volumétricas fueron distintas, mayores en la parte superior del biofiltro y menores en la inferior. Sin embargo la actividad específica en los diferentes niveles fue similar, alrededor de $2.3 \text{ nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biomasa}}$, con excepción del primer nivel donde fue mayor 2.8

$\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biomasa}}$, este hecho pudo deberse a que en la parte superior del biofiltro se tiene una mayor concentración de tolueno que induce el sistema enzimático. Esto indica que la actividad global de las enzimas involucradas en la degradación del tolueno depende fuertemente de la concentración de biomasa y de las condiciones ambientales (contenido de humedad) presentes en cada punto del biofiltro. Se encontró que existe una correlación directa entre la actividad enzimática y la C.E. en el biofiltro. De esta forma, se calculó una C.E. de $215 \text{ g/m}^3\text{h}$ a través de un valor de actividad enzimática igual a $2.0 \text{ nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biomasa}}$, mientras que la C.E. experimental fue de $217 \text{ g/m}^3\text{h}$. La determinación de las actividades enzimáticas en el biofiltro permitió concluir que, bajo las condiciones establecidas, el funcionamiento del sistema de biofiltración fúngico se encuentra limitado solo por reacción biológica.



II. INTRODUCCION



II. INTRODUCCIÓN

La Zona Metropolitana del valle de México es una de las áreas urbanas más contaminadas en el mundo. La contaminación atmosférica es el resultado de una importante actividad humana e industrial (Bravo y col., 1997). La biofiltración es una tecnología de eliminación y control de compuestos contaminantes presentes en efluentes gaseosos, que se caracteriza por sus bajos costos de arranque, operación, por su alta eficiencia y por ser una tecnología limpia, ya que no produce residuos secundarios tóxicos. Debido a lo anterior su aplicación se ha incrementado en comparación con otras tecnologías físico-químicas.

La biofiltración ha sido usada eficientemente para el control y eliminación de sustancias que producen malos olores (H_2S), de compuestos orgánicos volátiles (COV) y de un amplio rango de emisiones tóxicas resultantes de fuentes industriales (en un rango de concentraciones de $0.5\text{-}5\text{ g/m}^3$). En los biofiltros la degradación del compuesto contaminante se lleva a cabo principalmente con bacterias. Sin embargo, los hongos tienen ciertas ventajas, tales como altas tasas de degradación de contaminantes, su forma de crecimiento micelial, su capacidad de adaptación a condiciones adversas de humedad y pH y su versátil maquinaria metabólica, que los hacen potencialmente interesantes para su aplicación en este tipo de sistemas. A diferencia del amplio conocimiento que se tiene de las bacterias, los hongos han sido escasamente estudiados y utilizados en sistemas de biofiltración. Hongos filamentosos, tales como *Cladosporium sphaerospermum* y *Scedosporium apiospermum* han sido encontrados en biofiltros usados para la eliminación de tolueno (Weber y col., 1996., Auria y col., 2000).

El tolueno es un compuesto ampliamente usado en la industria, debido a su amplio uso constituye un contaminante frecuente. En el presente trabajo se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar la eliminación de tolueno usando un sistema de biofiltración inoculado con el hongo *S. apiospermum* y se estudiaron los fenómenos enzimáticos que rigen el proceso de biofiltración. A lo largo de la introducción se tocan los aspectos concernientes al tolueno, sus características, su presencia en el ambiente, las vías metabólicas de degradación de tolueno conocidas, así como las enzimas involucradas en las

mismas. También se describen las características principales del hongo utilizado y los aspectos relevantes de la biofiltración.

1. Características, distribución, toxicidad y degradación del tolueno.

1.1 Características generales del tolueno.

El tolueno es un compuesto aromático ampliamente usado en la industria como solvente en la manufactura de una variedad de productos tales como: pinturas en aerosol, adhesivos, cosméticos, perfumes, anti-refrigerantes, etc. Además, es un componente de la gasolina.

Las principales características del tolueno se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Principales características del tolueno.

Característica	Valor
Fórmula química	C_7H_8
Peso Molecular	92.14 g/mol
Presión de vapor	24.4 mmHg a 25°C
Constante de la ley de Henry	6.61×10^{-3} atm m ³ /mol a 25 °C
Solubilidad en agua	515 mg/L a 20 °C

El tolueno tiene una alta volatilidad asociada a su presión de vapor, es decir que tiene una fuerte tendencia a estar en la fase gaseosa. Debido a esto, la mayor cantidad de tolueno en el ambiente se encuentra en el aire y existe una mínima cantidad en mantos acuíferos y en el suelo.

Este compuesto junto con otros hidrocarburos constituye un precursor del ozono troposférico, el cual es considerado como un compuesto primario de la contaminación atmosférica. Por otro lado, constituye un agente tóxico. Como consecuencia de su amplio uso se ha convertido en un frecuente contaminante. La producción mundial de tolueno es de alrededor de 10 millones de toneladas/año (Gobi International, 2000). El proceso más común de producción de tolueno es mediante la deshidrogenación de la nafta. A través de

este proceso, los ciclo-alcanos son catalíticamente transformados a hidrocarburos aromáticos e hidrógeno, obteniendo aproximadamente un 80% de conversión. El 87% del tolueno producido es obtenido mediante deshidrogenación, el 9% es separado a partir de la pirólisis de la gasolina, el 2% es recuperado como subproducto de la producción de estireno y el 1-2% es separado a partir del alquitrán de hulla (Kirk-Othmer, 1983).

Uno de los principales usos del tolueno es la producción de benceno. Durante 1989, 80,000 toneladas fueron usadas para ese fin, 25,000 toneladas para la síntesis de otros productos químicos y 58,000 toneladas como solventes en pinturas, barnices, agentes de limpieza, pesticidas, adhesivos y para extracciones químicas (Government of Canada, 1996). Las fuentes naturales de tolueno en el ambiente son los volcanes, el petróleo crudo y los incendios forestales. Las fuentes artificiales de tolueno incluyen la combustión interna en los motores de vehículos, tanques de almacenamiento de gasolina, pozos petrolíferos, aguas residuales resultantes de procesos que usan solventes, refinerías, la producción de estireno y el humo del tabaco (Howard, 1990).

1.2 Liberación de tolueno al ambiente.

De acuerdo con el Inventario de Liberación de Tóxicos al Ambiente (Toxic Release Inventory TRI), en 1997 un total de 251 millones de kilogramos de tolueno fueron liberados al ambiente por instalaciones de proceso y de manufactura (TRI97, 1999). El tolueno ha sido identificado en una gran variedad de medios en el ambiente (aire, agua superficial, suelo y sedimentos) y detectado en 959 muestras de 1,591 sitios contaminados y clasificados dentro de la Lista de Prioridades Nacionales (National Priorities List, EPA, USA) de la EPA (Environmental Protection Agency, USA) (HazDat, 2000).

Casi todo el tolueno que es liberado al ambiente se encuentra en el aire. La principal fuente de emisiones es la gasolina, la cual contiene del 5 a 7% de tolueno en peso (Verschueren, 1983). Otras emisiones provienen de los procesos de eliminación de residuos, basados en información obtenida de 40 incineradores de residuos médicos en Estados Unidos y Canadá. Los factores de emisión para el tolueno se encuentran en un rango entre 37 a 178

ppb provenientes de emisiones no controladas y entre 177 a 3000 ppb de emisiones controladas (Walker y Cooper, 1992). Las emisiones generadas por las estaciones de energía eléctrica son menores a las producidas por las máquinas de diesel ($167\text{-}287\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$) y por los automóviles ($15,700\text{-}370,000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$) a 20°C y 1 atmósfera de presión (García y col., 1992).

Este compuesto puede encontrarse en el agua a partir de descargas industriales, de desechos urbanos o derrames y fugas de gasolina. Sin embargo, estas fuentes comprenden solo una pequeña fracción de la cantidad total de tolueno liberado al ambiente (EPA, 1981). En una inspección de los niveles de tolueno en aguas residuales de la industria, la EPA (1982a) encontró valores en un rango entre 1 a 2000 ppb. De acuerdo al Inventario de Liberación de Tóxicos, en 1997, se estimó una liberación de 166,832 Kg al agua a partir de instalaciones de proceso y manufactura, esto corresponde aproximadamente al 0.03% del total liberado al ambiente (TRI97, 1999).

En el caso del suelo, la contaminación con tolueno se debe a derrames o fugas en tanques de almacenamiento de gasolina, así como a la disposición en el campo de residuos del alcantarillado o residuos de refinerías. La presencia de tolueno en el suelo solo es significativa en escala local, ya que la cantidad de tolueno liberado al suelo es pequeña (EPA, 1981). De acuerdo al Inventario de Liberación de Tóxicos, en 1997, las estimaciones de liberación de tolueno en suelo fueron de 1.6 millones de Kg provenientes de 3,062 instalaciones de proceso y manufactura, lo cual consiste en el 0.65% del total de emisiones al ambiente (TRI97, 1999).

1.3 Distribución del tolueno en el ambiente

A pesar de que el tolueno es líquido a temperatura ambiente, es lo suficientemente volátil (presión de vapor igual 24.4 mmHg a 25°C) como para que la cantidad que se libera esté directamente en el aire y aquél que se emite en la superficie del agua o en el suelo tienda a volatilizarse rápidamente. La velocidad de volatilización del tolueno de la superficie del agua depende del clima y de si el agua está estática (vida-media de 1-16 días) o turbulenta

(vida-media 5-6 horas) (Mackay y Leinonen, 1975; Wakeham y col., 1983). En el caso de los suelos, la velocidad de volatilización depende de la temperatura, humedad y tipo de suelo. Bajo condiciones normales mas del 90% del tolueno en la capa superficial de suelo se volatiliza en 24 horas (Balfour y col., 1984, Thibodeaux y Hwang, 1982). Mientras que el tolueno presente en depósitos profundos de suelo dificilmente se volatiliza. Jury y col., 1990, reportan que solo el 0.1-2.6% será volatilizado en un periodo de un año.

La velocidad de transporte del tolueno a mantos acuíferos depende de la capacidad de adsorción del suelo. La migración del tolueno será moderadamente retardada mediante su adsorción en suelos ricos en materia orgánica, pero se lixiviará en suelos con bajo contenido orgánico (Wilson y col., 1981). La presencia de otros componentes de la gasolina puede tener un impacto sobre la migración del tolueno, la adsorción competitiva entre distintos componentes de la gasolina disminuye la interacción entre el tolueno y el suelo, permitiendo que éste se mueva más rápidamente hacia el acuífero (Stuart y col., 1991). Basados en sus propiedades lipofílicas, el tolueno tiene una baja tendencia a bioconcentrarse en tejidos grasos de organismos acuáticos (Franke y col., 1994).

1.4 Niveles de tolueno monitoreados o estimados en el ambiente.

La concentración de tolueno en aire es menor en áreas remotas, pero niveles entre 1.3 y 6.6 ppb son comunes en áreas urbanas y suburbanas. Las emisiones de automóviles son la principal fuente de tolueno en el ambiente, como ya se mencionó en la anterior sección, con niveles que fluctúan en proporción al tráfico de automóviles. El tolueno es también un contaminante de interiores y su concentración en ambientes cerrados es frecuentemente mayor que la que se encuentra en aire de áreas abiertas, en promedio 8 ppb. Su presencia en ambientes cerrados se debe al uso de productos domésticos comunes (pinturas, solventes de pinturas, adhesivos, pegamentos, etc) y al humo de cigarrillos (Montgomery y Kalman, 1989).

El tolueno es ocasionalmente detectado en lugares de suministro de agua para beber, pero esto no es frecuente y los niveles detectados son generalmente menores a 3 ppb. En

contraste, el tolueno es un contaminante muy común de agua y suelos situados en la vecindad de sitios contaminados, con concentraciones promedio en agua de 7-20 ppb y de 70 ppb en suelos.

La forma más común en la que la gente puede ser expuesta al tolueno es mediante la respiración de aire contaminado. Debido a que mucha gente pasa una buena fracción del día en ambientes cerrados, la exposición se debe a los niveles presentes en los mismos. Tomando en cuenta su concentración dichos lugares, una velocidad de inhalación de aire de 20m³/día y absorción de 50% del tolueno inhalado, la dosis típica absorbida es de alrededor de 300 µg/día. La ingestión a partir de alimentos o agua contribuye solo con cantidades menores, sin embargo, el fumar puede constituir una dosis de 1000 µg/día o más. Niveles mayores de exposición pueden darse en individuos que vivan cerca de sitios contaminados o en fuentes industriales de emisión de tolueno, pero esas exposiciones pueden ser estimadas solamente en el sitio mismo. La exposición al tolueno también se da en lugares de trabajo, especialmente en talleres de impresión o pintura, donde el tolueno es usado como solvente. Niveles de tolueno en aire de 100 ppm (equivalentes a una dosis de 3,750 µg/día) en lugares de trabajo, han sido establecidos por la oficina de Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (Occupational Safety and Health Administration, OSHA). Por otro lado, con el fin de proteger a los trabajadores de efectos negativos sobre el sistema nervioso, la Conferencia Americana Gubernamental de Higiene Industrial (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) recomienda un promedio de tiempo de 8 horas para concentraciones de 50 ppm, como límite mayor de tolueno para el aire de lugares de trabajo (ACGIH, 1999).

El tolueno es regulado como un contaminante tóxico del aire (US Congress, 1990) y está sujeto a limitaciones de emisión para varios procesos y operaciones en industrias de manufactura de químicos orgánicos sintéticos (EPA 1983a, 1993b, 1995i). Otras categorías tales como operaciones de manufactura de muebles de madera (EPA 1995g), productores de polímeros y resinas (EPA 1996c) y refinerías de petróleo que pueden liberar tolueno a la atmósfera deben cumplir con los estándares de emisiones para contaminantes tóxicos del aire. Debido a su potencial para causar efectos adversos en la salud de personas expuestas,

el tolueno también es regulado mediante límites máximos en agua para beber establecidos por la EPA. El tolueno puede estar presente en agua para beber debido a una disposición inadecuada de residuos o la filtración desde tanques de almacenamiento. El nivel máximo de tolueno permisible es de 1 mg/L.

1.5 Toxicidad del tolueno

Estudios en humanos y animales indican que el tolueno es absorbido vía los pulmones y el tracto intestinal. La absorción a través de la piel constituye solo el 1% de lo que se absorbe vía pulmonar. La acumulación y distribución del tolueno en el cuerpo esta localizada generalmente en el tejido adiposo, en otros tejidos con alto contenido de grasa y en tejidos altamente vascularizados (EPA, 1994).

La toxicidad en humanos y animales a partir de la exposición a niveles intermedios o altos por periodos cortos de tiempo tiene efectos sobre el sistema nervioso, dichos efectos pueden ir desde dolores de cabeza hasta intoxicación, convulsiones, narcosis y muerte. Dosis repetidas de tolueno generan efectos crónicos sobre el sistema nervioso central y pueden causar daños en el sistema respiratorio superior, el riñón y el hígado (EPA, 1994).

No existe evidencia suficiente que permita concluir que el tolueno es cancerogénico. Puede afectar seriamente el desarrollo de fetos. Sus efectos adversos van desde problemas en el crecimiento, disfunción del sistema nervioso central, hasta retardo en el desarrollo en humanos e incluso miembros extra o ausencia de colas en ratas (EPA, 1994).

El tolueno puede ser tóxico para peces y otros organismos acuáticos pequeños incluyendo bacterias y fitoplancton. El envenenamiento de los peces depende de la temperatura del agua, de la especie del pez y de la concentración de tolueno. Generalmente, los efectos tóxicos del tolueno en organismos acuáticos se han observado con concentraciones entre 10 y 90 mg/L (Environment Canadá, 1996).

Estudios en animales indican que el tolueno no es altamente tóxico, a menos que esté presente en altas concentraciones (EPA, 1994). Tiene algunos efectos en las plantas,

ingresa en ellas vía la raíz. Los tejidos que entran en contacto con el tolueno mueren rápidamente, sin embargo no se acumula en la planta (Environment Canadá, 1996).

En términos del efecto abiótico el tolueno, junto con otros compuestos orgánicos, contribuye a la formación del smog fotoquímico (Environment Canada, 1996).

1.6 Transformación y degradación del tolueno en el medio ambiente.

En la atmósfera el tolueno es degradado rápidamente mediante reacciones con radicales hidroxilo para producir cresol y benzaldehído, los cuales a su vez sufren una ruptura del anillo para producir hidrocarburos simples (Kenley y col., 1973; Hoshino y col., 1978; Davis y col., 1979). La constante de velocidad estimada para este proceso es de alrededor de 0.6 a $2.4 \times 10^{-5} \text{seg}^{-1}$, la que corresponde a una vida-media en la atmósfera de 13 horas. Sin embargo, su vida media puede ser de 10 a 104 horas dependiendo de las condiciones atmosféricas (Howard y col., 1991). El tolueno también es oxidado mediante su reacción con el dióxido de nitrógeno, el oxígeno y el ozono, pero las velocidades de estas reacciones son dos o más órdenes de magnitud menores que la de los radicales hidroxilo (Wei y Adelman, 1969; Altshuller y col., 1971 y Dilling y col., 1976). Bencil nitrato y nitrotolueno son formados a través de reacciones del tolueno atmosférico con óxidos de nitrógeno (Atkinson, 1990).

A pesar de que el tolueno presente en el agua puede ser oxidado mediante reacciones similares a las que ocurren en el aire, las velocidades de estas reacciones son menores (EPA, 1979). La degradación del tolueno en agua ocurre principalmente mediante acción microbiana, la velocidad de biodegradación es una función de muchos parámetros (temperatura, duración del tiempo de aclimatación microbiana, etc). La velocidad media de degradación es menor a 1 día bajo condiciones favorables (Wakeham y col., 1983). En aguas superficiales, el tiempo medio de biodegradación del tolueno fue estimada en un rango entre 4 y 22 días (Howard y col., 1991), mientras que en aguas profundas la biodegradación es favorecida por la presencia de sulfato, nitrato, potasio y fosfato (Armstrong y col., 1991; Hutchins, 1991; Acton y Barker, 1992). El sulfato favorece la

biodegradación de tolueno actuando como un aceptor de electrones alternativo (Acton y Barker, 1992). La velocidad de mineralización de tolueno fue estimada en un rango entre 0.032 a 0.05 ppb/hora (Armstrong y col., 1991). La rápida biodegradación (90% de eliminación en 7 días) ocurre en estratos poco profundos de aguas subterráneas (Wilson y col., 1983) y aguas residuales del alcantarillado (Davis y col., 1996). La degradación *in-situ* es la más importante fuente de eliminación de tolueno en corrientes contaminadas. Estudios de laboratorio acerca de la biodegradación de tolueno *in-situ* muestran resultados comparables con estudios en corrientes e indican que prácticamente toda la biodegradación se da en las superficies que soportan las masas de agua (sedimentos y suelos) (Cohen y col., 1995). Las bacterias son incapaces de degradar tolueno en agua cuando la concentración de éste decrece por debajo del umbral donde el metabolismo del compuesto es demasiado lento para proveer células con energía a la velocidad necesaria para mantener el metabolismo (Roch y Alexander, 1997).

En el suelo el tolueno puede ser degradado mediante bacterias del género *Pseudomonas* y *Achromobacter* (Fewson, 1981). El proceso de biodegradación parece ocurrir en dos fases: en la primera se produce ácido benzoico, en la segunda el anillo aromático sufre una ruptura para producir intermediarios del ciclo de Krebs y posteriormente éstos son degradados a dióxido de carbono o incorporado a bio-moléculas bacterianas (Harayama y col., 1989). Las velocidades de degradación son proporcionales a la concentración inicial de sustrato y alcanzan un máximo a una concentración de 200 ppm según un estudio realizado por Davis y Madsen, 1996. En zonas anaeróbicas del suelo, el nitrógeno o el sulfato pueden actuar como aceptores terminales de electrones (Dolfing y col., 1990; Evans y col., 1991; Beller y col., 1992a, b). Bajo condiciones favorables (presencia de aceptores de electrones, nutrientes y compuestos oxidables), estudios de laboratorio muestran que los BTEX (benceno-tolueno-etilbenceno-xileno) son también degradados por bacterias en ambientes anaerobios (Langenhoff y col., 1996) o limitados por oxígeno (Olsen y col., 1995; Lovely, 1997). Bajo condiciones sulfato-reductoras, menos de 10% del carbono de tolueno es metabolizado a ácido bencil-succínico y ácido bencil-fumárico, mientras que más del 80% es mineralizado a dióxido de carbono (Beller y col., 1992a).

Los microorganismos capaces de degradar tolueno juegan un importante papel en la biorremediación de sitios contaminados con ese compuesto. La toxicidad de dicho compuesto para las células está bien documentado, la exposición de las células al tolueno resulta en la permeabilización de la membrana, el escape o derrame del RNA y proteínas, la desintegración de ribosomas y la inhibición de síntesis de proteínas, la partición de la membrana celular ocasiona una expansión de la misma con la pérdida de su función. A pesar de la toxicidad del tolueno algunos microorganismos, en especial del género de *Pseudomonas*, son capaces de utilizarlo como única fuente de carbono y energía. En un estudio realizado por Vercellone-Smith y Herson, 1997, *P. putida* fue expuesta a diferentes niveles de tolueno, encontrando que una concentración de 4 mg/L promueve el crecimiento, una de 130 mg/L resulta inhibitoria y una concentración de 267 mg/L de tolueno resulta letal.

1.7 Rutas microbianas de degradación de tolueno.

1.7.1 Rutas metabólicas de degradación de tolueno en bacterias.

La habilidad de los microorganismos para catalizar la ruptura enzimática de núcleos benzoicos depende de la presencia de al menos dos sustituyentes hidroxilo en el anillo aromático (Dagley, 1971). En aquellas circunstancias donde el sustrato aromático contiene un solo grupo hidroxilo, la adición enzimática del segundo grupo se debe usualmente a una reacción dependiente de una monooxigenasa, donde un átomo de oxígeno molecular es incorporado al sustrato y el otro es reducido a agua (Rogers y Gibson, 1977).

Las bacterias aeróbicas tienen la habilidad de metabolizar hidrocarburos aromáticos, tales como el tolueno, como única fuente de carbono y energía. El primer reporte de mecanismos bioquímicos para la degradación de tolueno sugería la formación inicial de un epóxido del anillo aromático y la hidrólisis subsecuente del epóxido para formar transdihidrodiol (Walker y Wiltshire, 1953; Marr y Stone, 1961). Posteriores investigaciones mostraron que el intermediario consistía en un cis-dihidrodiol y su formación era catalizada por una

tolueno dioxigenasa, estos estudios se realizaron con *Pseudomonas putida* (Gibson y col, 1970).

El esquema general que resume las vías metabólicas de degradación de tolueno en bacterias se presenta en la Figura 1.1. Cinco vías metabólicas bacterianas de degradación de tolueno son conocidas y han sido ampliamente investigadas, todas consisten en la hidroxilación del anillo aromático en diferentes sitios y estas reacciones son catalizadas principalmente por enzimas oxigenasas y deshidrogenasas. La primera ruta metabólica involucra la mono-oxigenación del grupo metilo, ésta ha sido encontrada y estudiada en *Pseudomonas putida* mt-2 (Worsey y Williams, 1975). Las demás vías se inician a través de la hidroxilación directa del anillo aromático mediante mono o di-oxigenasas. Solo una tolueno dioxigenasa de *P. putida* F1 ha sido identificada, la tolueno 2,3-dioxigenasa. Esta enzima produce cis-tolueno dihidrodiol a través de la adición de un solo oxígeno di-atómico, el dihidrodiol es subsecuentemente deshidrogenado a 3-metil catecol mediante una deshidrogenasa (Gibson y col., 1970; Spain y Gibson, 1988). También han sido detectadas las tolueno mono-oxigenasas que hidroxilan el núcleo aromático en tres posibles posiciones para producir orto, meta y para cresol. Estas incluyen a la tolueno orto-monooxigenasa de *P. (Burkholderia) cepacia* G4 (Shields y col., 1989), la tolueno meta-monooxigenasa de *P. pickettii* PK01 (Kaphammer y col., 1990) y la tolueno para-monooxigenasa de *P. mendocina* KR1 (Gibson, 1971; Richardson y Gibson, 1984; Withed y Gibson, 1991). Según la fuente consultada (Zeng, 2001) en la primera vía metabólica que implica el ataque del grupo metilo, el benzoato es convertido hasta catecol a través de la ruta de degradación de benzoato (*). Por otro lado, la última vía metabólica mostrada en el esquema continua con la transformación del 4-hidroxibenzoato mediante la ruta metabólica de degradación de la vainillina (**). En general, las rutas metabólicas para el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias conforman un esquema similar. Los pasos de conversión iniciales son catalizados por enzimas diferentes en cada bacteria, pero las vías convergen a un número limitado de intermediarios centrales, tales como el catecol y sus derivados. El anillo aromático de estos intermediarios es entonces roto, entrando a rutas metabólicas centrales.

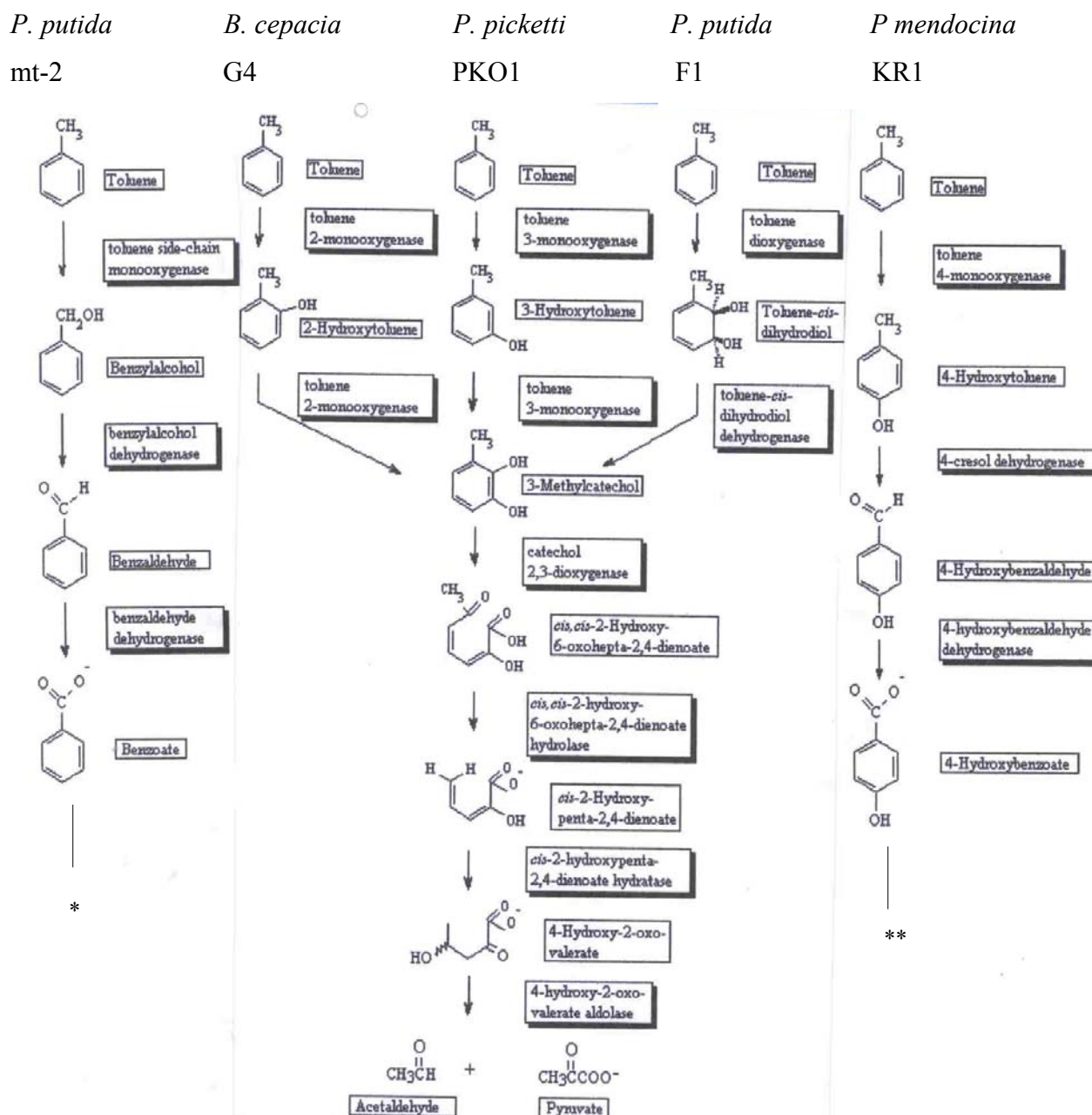


Figura 1.1 Esquema de las diferentes vías de catabolismo de tolueno en bacterias. (*) el benzoato sigue siendo transformado a través de la ruta metabólica de degradación del benzoato, (**) el 4-hidroxibenzoato es subsecuentemente degradado por la vía metabólica de catabolismo de la vainillina. Fuente (Yuemo Zeng, 2001, Toluene pathways map, Universidad de Minnesota. BBDMaster@email.labmed.umn.edu)

1.7.2 Rutas metabólicas de degradación de tolueno en hongos

A diferencia del amplio trabajo realizado sobre las rutas de degradación de tolueno en bacterias, se conoce poco acerca de su utilización en hongos. La degradación parcial de tolueno fue observada en *Mortierella isabellina* y especies de *Helmithosporium*, los cuales fueron precultivados en un medio rico con glucosa y posteriormente el micelio fue incubado en agua con tolueno por 72 horas, dicho compuesto aromático fue transformado a alcohol bencílico (Holland y col, 1988). La degradación de tolueno con el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* fue demostrada por Yadav y Reddy, 1993, mediante el uso de tolueno marcado radioactivamente y determinando la producción de $^{14}\text{CO}_2$. En dicho trabajo, no se reporta la ruta metabólica de degradación de tolueno con dicho hongo, sin embargo los autores mencionan que la degradación del compuesto aromático no se debe al complejo enzimático lignin peroxidasa ya que la oxidación se llevó a cabo bajo condiciones de cultivo no ligninolíticas.

Posteriormente, Weber y col, 1995, reportan el crecimiento del hongo *Cladosporium sphaerospermum* con tolueno como única fuente de carbono y energía. Estos autores realizan un estudio muy completo de la degradación del tolueno y proponen una ruta metabólica de catabolismo del tolueno. *Cladosporium sphaerospermum* fue aislado de un biofiltro de composta usado para remover tolueno de aire contaminado. Dicho microorganismo fue posteriormente crecido en medio líquido con una concentración inicial de tolueno de 52 mg/L, todo el tolueno adicionado fue degradado en aproximadamente 10 días, obteniendo 210 μmol de CO_2 y alrededor de 6 mg de micelio (peso seco). La velocidad de crecimiento fue máxima a pH 7 bajo sus condiciones de cultivo.

Weber y col., 1995, reportan que la ruta de degradación de tolueno en *Cladosporium sphaerospermum* implica el ataque inicial al grupo metilo de dicho compuesto (Figura 1.2). Los experimentos para elucidar la posible ruta incluyeron: el crecimiento del hongo con los diferentes intermediarios de las rutas conocidas, el consumo de oxígeno en presencia de los intermediarios y la determinación de las enzimas involucradas en las diferentes vías metabólicas.

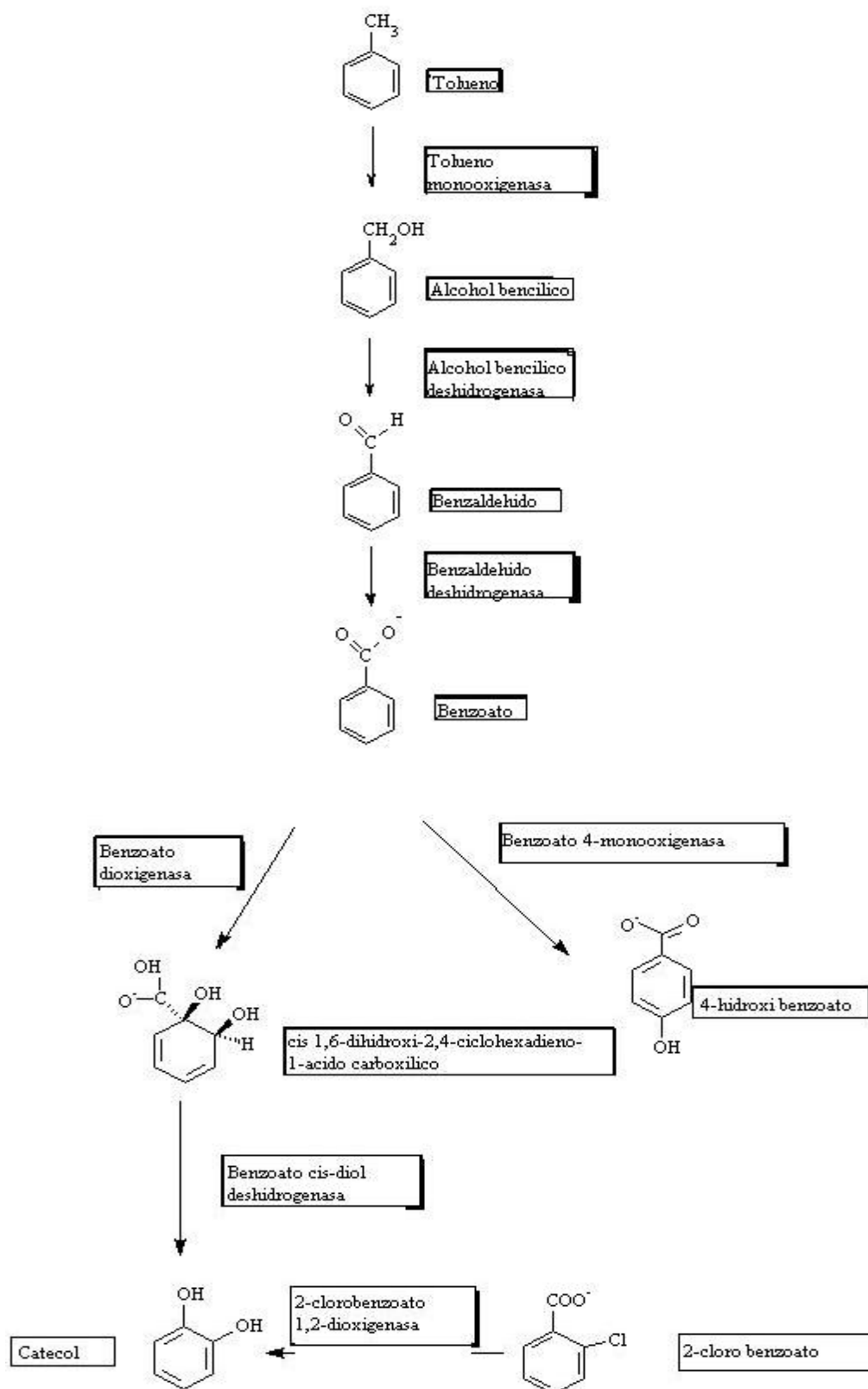


Figura 1.2. Vía de degradación de tolueno propuesta para *Cladosporium sphaerospermum* por Weber y col., 1995.

El hongo creció con alcohol bencílico, benzaldehído, benzoato y catecol como únicas fuentes de carbono y energía, mientras que con 3-metilcatecol no se obtuvo crecimiento. El espectro de sustratos usados para el crecimiento de células de *C. sphaerospermum* indicó que el tolueno es degradado por el ataque inicial del grupo metilo, pasando a benzoato. Otros experimentos que permitieron corroborar la posible ruta consistieron en la determinación de la velocidad de consumo de O₂ en presencia varios posibles intermediarios, utilizando micelio crecido en tolueno, los resultados fueron corregidos con el consumo de O₂ endógeno. Debido a que se apreció un sensible aumento en la velocidad de consumo de O₂ después de la adición de alcohol bencílico, benzaldehído y catecol y a que no se obtuvo actividad con o-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzil alcohol y 3 metil catecol, los autores confirman que el tolueno es degradado mediante la hidroxilación del grupo metilo. Tanto los resultados de crecimiento como los experimentos de consumo de O₂ indicaron que el tolueno es degradado por un ataque inicial del grupo metilo. Las altas actividades medidas para la alcohol bencílico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa confirmaron estos resultados. También se detectaron actividades de catecol y protocatecuato dioxigenasas en extractos celulares de *C. sphaerospermum*, indicando que el catecol es el sustrato de ruptura del anillo. Como la actividad de la protocatecuato dioxigenasa se midió mediante la desaparición del protocatecuato, esta actividad también pudo deberse a la conversión de protocatecuato a catecol. Sin embargo, si éste es el sustrato de ruptura del anillo o es convertido a catecol es aún incierto y se requiere mayor investigación en este sentido (Weber y col., 1995).

Prenafeta-Boldú y col., 2001, realizaron un trabajo acerca de las vías de degradación de tolueno en hongos, utilizando isómeros de fluor-tolueno como sustrato modelo. Los hongos evaluados en dicho estudio fueron 4 deuteromicetos y un ascomiceto capaces de crecer con tolueno como única fuente de carbono y energía, también fueron estudiados *Cunninghamella echinulata* y *Aspergillus niger*, quienes cometabolizan tolueno en presencia de glucosa. A lo largo de los experimentos, células completas fueron incubadas con 2, 3, 4 fluor-tolueno y los metabolitos resultantes se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear. La oxidación del fluor-tolueno en *C. echinulata* fue iniciada tanto en el anillo aromático resultando orto-cresol, como en el grupo metilo del tolueno para formar F-

benzoato. La conversión inicial de los F-toluenos en los otros hongos solo ocurrió en el grupo metilo, obteniéndose los correspondientes benzoatos. Los hongos que usaron al tolueno para generación de energía y producción de biomasa convirtieron los análogos fluorinados a mayores velocidades y a intermediarios más oxidados, todos los cuales fueron productos del metabolismo del grupo metilo. En general, la proximidad del fluor al grupo metilo tuvo un efecto negativo en la velocidad de degradación.

1.8. Enzimas involucradas en la degradación de tolueno

Como se pudo observar en las secciones anteriores las enzimas involucradas en la oxidación microbiana del tolueno son las oxigenasas (mono y di) y las deshidrogenasas, por lo cual en las siguientes secciones se describirán algunos aspectos importantes de dichas enzimas.

1.8.1. Oxigenasas

1.8.1.1 Características generales

Aunque la mayor parte del oxígeno molecular consumido por las células se reduce a agua a expensas de los electrones que fluyen a lo largo de la cadena respiratoria de las mitocondrias, se emplean cantidades pequeñas de oxígeno en reacciones enzimáticas en las que uno o ambos átomos de la molécula de oxígeno se insertan directamente en el sustrato orgánico para formar grupos hidroxilo. Las enzimas que catalizan tales reacciones se denominan oxigenasas y existen dos clases: las dioxigenasas, que catalizan la inserción de ambos átomos de la molécula de oxígeno en el sustrato orgánico y las monooxigenasas que insertan solo uno.

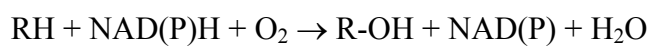
1.8.1.2 Monooxigenasas

Esta clase de enzimas cataliza la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el sustrato orgánico, el otro se reduce a agua. Las monooxigenasas requieren dos sustratos, el orgánico

y otro que cede electrones para la reducción del segundo átomo de oxígeno. Por dicha razón, estas enzimas son también llamadas oxidasas de función mixta y también debido a que el sustrato principal se hidroxila, son denominadas hidroxilasas.

Las monooxigenasas son más abundantes que las dioxigenasas, más complejas en acción y pueden catalizar varios tipos diferentes de reacciones de inserción de oxígeno. Algunas de las reacciones catalizadas por estas enzimas consisten en la inserción de oxígeno en compuestos aromáticos, la hidroxilación terminal, la hidroxilación sub-terminal, la ruptura de uniones de tipo éter y la inserción de oxígeno acoplada a la remoción de un grupo sustituyente, sin embargo solo se describirán con detalle los dos primeros grupos, dentro de los cuales se encuentran algunas de las enzimas vinculadas a la degradación de tolueno.

La estequiometría general de las reacciones de varios tipos de monooxigenasas es la siguiente:



En la cual RH es el sustrato de experimenta la hidroxilación, NAD(P)H es el donador electrónico, R-OH es el sustrato hidroxilado y NAD(P) es el donador electrónico reducido. Uno de los átomos de oxígeno se recupera en el producto hidroxilado y el otro en el agua formada. En la mayoría de las reacciones de las monooxigenasas, el segundo sustrato que aporta electrones para reducir un átomo de oxígeno a agua es el NADH o el NADPH.

Las monooxigenasas pueden iniciar el ataque de compuestos aromáticos. La catálisis mediante monoxigenasas eucarióticas resulta primero en la formación de óxidos de areno, los cuales son convertidos vía dos rutas. La primera a través de la hidratación mediante una hidroxilasa de epóxidos para formar trans-dihidrodiolés (Cerniglia, 1992; Gibson, 1993), los cuales han sido detectados como intermediarios en el metabolismo fúngico de compuestos aromáticos. La segunda es a través de un re-arreglo o isomerización del óxido de areno para formar derivados monohidroxilados de los hidrocarburos aromáticos. Estos últimos pueden ser hidroxilados en posiciones orto o para con respecto al primero grupo

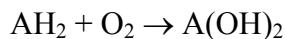
hidroxilo formando catecoles, que constituyen el sustrato de ruptura del anillo mediante la acción de dioxigenasas. Las monooxigenasas bacterianas también pueden hidroxilar compuestos aromáticos, este tipo de reacciones se han detectado en varias ocasiones, especialmente si el sustrato ya se encuentra sustituido. Como se mencionó previamente (sección 1.7.1) la formación de compuestos aromáticos con dos grupos hidroxilo es un requisito para la ruptura oxidativa del anillo bencénico. Si el sustrato aromático inicial ya contiene un sustituyente hidroxilo, la adición del otro grupo hidroxilo produce catecol. La monohidroxilación del anillo aromático usualmente es llevada a cabo por una monooxigenasa, algunos ejemplos de este tipo de enzimas incluyen a la fenol hidroxilasa y a la 4-hidroxi benzoato hidroxilasa.

Uno de los grupos más grandes de monooxigenasas oxida el grupo metilo terminal de alcanos para producir un alcohol primario, esta reacción inicia la biodegradación de n-alcanos. Dos sistemas de enzimas diferentes son conocidos, ambos involucran una transferencia de electrones del NAD(P)H al alcano, el primer sistema consiste en un citocromo P-450 que contiene un grupo hemo, una proteína con fierro, una flavo proteína y la hidroxilasa. El segundo sistema es, en general, una monooxigenasa específica para alcanos, la cual está conformada por una flavo proteína, una proteína férrica sin grupo hemo y la hidroxilasa. El producto final resultante de este tipo de enzimas es posteriormente metabolizado a un aldehído.

El plásmido TOL de *Pseudomonas putida* mt-2 codifica para tres enzimas que convierten el grupo metilo del tolueno, el m-xileno o el p-xileno a un grupo carboxilo. Estas enzimas son la tolueno monooxigenasa, la alcohol bencílico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa. Además de estos genes, el plásmido TOL contiene los genes para las enzimas responsables de la ruptura meta del anillo y los subsecuentes pasos para la utilización del tolueno y el xileno (Worsey y Williams, 1975).

1.8.1.2 Dioxigenasas

Las dioxigenasas, también llamadas oxígeno transferasas, catalizan reacciones del tipo:



En las que la molécula AH_2 es el sustrato y A(OH)_2 es su forma hidroxilada; por lo general, ambos grupos hidroxilo introducidos de esta manera son adyacentes. En este tipo de reacciones, el producto A(OH)_2 puede experimentar posteriormente la ruptura enzimática del enlace carbono-carbono entre los dos grupos hidroxilo. El hecho de que los dos átomos del oxígeno molecular se inserten directamente en el sustrato se ha podido comprobar mediante la utilización del isótopo ^{18}O como trazador.

Las dioxigenasas son importantes en el inicio de la biodegradación de una variedad de compuestos clorinados y nitro-aromáticos. Sus sustratos principales son derivados del petróleo y la lignina, ya que éstos son las principales fuentes de compuestos aromáticos en el ambiente. Muchos de estos compuestos son degradados a catecol o protocatecuato mediante oxigenasas (tanto mono como di oxigenasas); los cuales más tarde son metabolizados mediante dioxigenasas que rompen el anillo aromático ya sea a beta-cetoadipato o a 2-ceto-4-hidroxivalerato. Estos después ingresan al ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Existen dos tipos de dioxigenasas, el primero tiene requerimientos de NADH o NADPH e hidroxila el sustrato. El otro tipo no tiene requerimientos específicos de NAD(P)H y generalmente cataliza la ruptura del anillo aromático. Entre las dioxigenasas que hidroxilan el anillo aromático se encuentran las bacterianas que requieren NAD(P)H y están constituidas como sistemas enzimáticos multi-componentes que contienen de 2 a 4 subunidades, dependiendo del sustrato que utilicen y la fuente de la enzima (Cerniglia, 1992). Cada sub-unidad puede contener de 1 a 2 grupos prostéticos como Fe, las subunidades tienen dos funciones principales: a) la transferencia de electrones a partir del equivalente reductor NAD(P)H y b) la hidroxilación enzimática. Estas enzimas son responsables de la cis-dihidroxilación de compuestos aromáticos para formar cis-dihidrodióles, esta reacción rompe la “aromaticidad” en el producto.

Entre las dioxigenasas que hidroxilan el anillo aromático, existen tres grupos estructuralmente distintos. En el grupo más común, el sistema está compuesto por 4 subunidades: la subunidad I es una flavo proteína reductasa, la II es una ferredoxina [2Fe-2S]. Estas dos forman el componente de transferencia de electrones. Mientras que la subunidad & conforma el componente hidroxilasa catalítico, el cual también es conocido como proteína sulfuro hierro (ISP). Lo anterior describe la organización de la naftaleno dioxigenasa (Cerniglia, 1992) y de la tolueno dioxigenasa (Zylstra y Gibson, 1991). El grupo 2 representado por las benzoato y toluato dioxigenasas, contienen 3 subunidades, la primera media la transferencia de electrones a partir del NAD(P)H a la hidroxilasa, mientras que la subunidad & forma el componente hidroxilasa catalítico (ISP). Finalmente el grupo 3 son enzimas con 2 subunidades, de las cuales una tiene la función de transferencia de electrones y la otra tiene la función hidroxilasa, este último grupo está representado por la ftalato dioxigenasa. La especificidad de estas enzimas está determinada por las proteínas hierro-sulfuro o hidroxilasas terminales.

Otro grupo de dioxigenasas lo constituyen las que catalizan la ruptura del anillo. En compuestos aromáticos dihidroxi-sustituídos, es decir un hidroxilo en posición orto o en posición para con respecto al otro grupo hidroxilo, el anillo puede ser roto o abierto por este tipo de enzimas. Estas pueden tener dos tipos distintos de sustratos, la forma más común y fácilmente rota es la estructura del catecol, con los grupos hidroxilo adyacentes. Todas estas enzimas tienen un grupo Fe, el cual participa en la catálisis, en el sitio activo. Estas enzimas no tienen requerimientos de cofactor. La ruptura del catecol o del protocatecuato puede ocurrir de dos formas, cada una con un mecanismo catalítico distinto.

1.8.1.3 Tolueno mono y dioxigenasas

En lo que se refiere a las monooxigenasas, la tolueno 4-monooxigenasa fue parcialmente purificada (Whited y Gibson, 1991), los resultados indicaron que dicha enzima contiene grupos Fe, similares a la metano monooxigenasa.

Newman y Wackett, 1995, purificaron la tolueno 2-monooxigenasa de *Burkholderia cepacia* G4 y encontraron que esta compuesta por una oxidoreductasa flavo-Fe-sulfuro, una oxidoreductasa NADH, un componente cromófero y un componente hidroxilasa que contiene dos centros binucleares de Fe. En presencia de NADH y oxígeno molecular la tolueno-monooxigenasa oxida tolueno a o-cresol y éste es posteriormente llevado a 3-metil catecol.

También se han realizado algunos estudios en cuanto a las características de la tolueno dioxigenasa, respecto a su estructura y a su funcionalidad. Debido a que posee baja especificidad por el sustrato se ha demostrado que interviene en la degradación de diferentes compuestos aromáticos. El primer trabajo acerca de la purificación de la tolueno dioxigenasa fue realizado por Wackett, 1990, más tarde, Lynch y col., 1996, purificaron la tolueno dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1 encontrando que es una enzima multicomponente que está organizada como se muestra en la Figura 1.3.

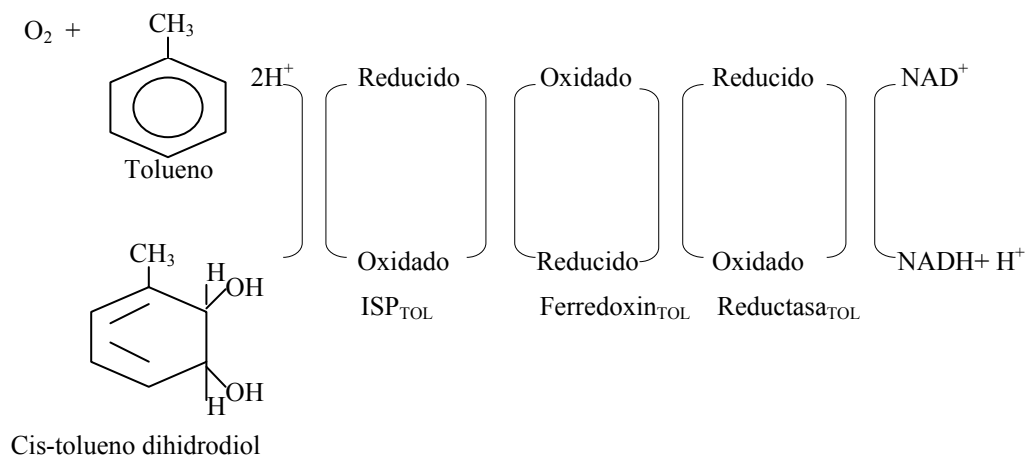


Figura 1.3. Organización estructural de la tolueno dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1 (Lynch y col., 1996).

El componente oxigenasa terminal es una proteína Fe-S-proteína (ISP_{TOL}), el cual tiene una composición de subunidades $\alpha_2\beta_2$. El interés en la tolueno dioxigenasa y sus multicomponentes se debe a que los cis-hidrodiol son precursores quirales en la síntesis de un amplio rango de productos de potencial interés comercial. Además, esta enzima oxida

varios compuestos contaminantes incluyendo al benceno, tolueno, etil-benceno, compuestos aromáticos clorados y compuestos nitro-aromáticos (Lynch y col., 1996).

Robertson y col., 1992, demostraron que la tolueno dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1 y de *Pseudomonas* SJ150 es capaz de oxidar compuestos nitro-aromáticos. Células de estos microorganismos crecidos en tolueno oxidaron el 2-nitro tolueno a 2-nitro alcohol bencílico. Cuando se usó 3-nitro tolueno como sustrato, los metabolitos formados por las células crecidas en tolueno fueron el 3-nitro alcohol bencílico y el 3-nitro benzoato. La degradación del tolueno en *Pseudomonas putida* F1 y *Pseudomonas* SJ150 se inicia con una reacción catalizada por la tolueno dioxigenasa, a través de la cual se obtiene cis-tolueno-dihidrodiol y posteriormente 3-metil catecol. Se esperaban reacciones similares con células de estos microorganismos crecidas en tolueno e incubadas con 2, 3 y 4-nitro tolueno, sin embargo los productos más abundantes formados a partir del 2 y 3-nitro tolueno en ambos casos fueron el 2 y 3-nitro alcohol bencílico. Los autores sostienen que estos resultados demuestran que la tolueno dioxigenasa también es responsable de la oxidación del sustituyente metilo. Esta actividad novedosa de monooxigenasa presentada por la tolueno dioxigenasa extiende el rango de sustratos que pueden ser oxidados por este sistema enzimático.

En cuanto al conocimiento de otros sistemas enzimáticos involucrados en las rutas de degradación del tolueno, Lee y Gibson, 1996 reportan la oxidación de tolueno y etil-benceno con la naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas* sp cepa NCIB9816-4. Los autores mencionan que esta enzima esta formada por un sistema multicomponente, en el cual los electrones son transferidos del NADPH a través de una Fe-S-flavoproteína (reductasa_{NAP}) y una proteína Rieske (2Fe-2S) a un componente oxigenasa terminal ISP_{NAP}. Este último está compuesto por subunidades $\alpha_2\beta_2$ y cada unidad α contiene un centro redox Rieske (2Fe-2S) y un Fe mononuclear, dicha conformación es similar a lo descrito para la tolueno dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1. Los resultados de este trabajo sugieren que la naftaleno dioxigenasa ataca al tolueno oxidando preferencialmente el grupo metilo.

Por otro lado, Feng y col., 1999, llevaron a cabo la purificación de la genisiato 1, 2-dioxigenasa de *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 (P25X) y de *Pseudomonas putida* NCIB 9869 (P35X). El genisiato es un intermediario dihidroxilado, en el cual el segundo grupo hidroxilo se encuentra en posición “para” respecto al primero, en el catecol y en el protocatecuato estos están ubicados en posición “orto”. Encontraron que la P25X tiene la estructura de un tetrámero, mientras la P35X existe como un dímero.

Zhou y col., 1999 realizaron un estudio en el que reportan que la alqueno-monooxigenasa de *Xanthobacter* cepa Py2 es similar a las monooxigenasas aromáticas de tolueno y benceno, encuentran que dicha enzima es capaz de oxidar fenol, benceno y tolueno. La secuenciación y el análisis de los aminoácidos, indicaron que los componentes de la monooxigenasa de *Xanthobacter* son homólogos a los de las monooxigenasas aromáticas y que el orden de los genes es idéntico. El benceno fue convertido por este microorganismo a fenol, el cual se acumuló y posteriormente fue eliminado. El tolueno fue oxidado a una mezcla de orto, meta y para-cresoles y una pequeña cantidad de alcohol bencílico.

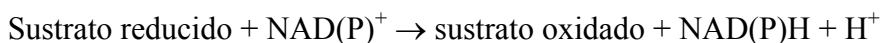
1.8.2. Deshidrogenasas

1.8.2.1. Características generales

En la corriente principal del transporte electrónico desde los sustratos orgánicos al oxígeno molecular, participan cuatro tipos de enzimas de óxido-reducción o de proteínas de transferencia electrónica: 1) las deshidrogenasas piridin-dependientes que necesitan NAD o NADP como coenzima, 2) las deshidrogenasas flavin-dependientes que contienen flavin-adenin-dinucleótido (FAD) o flavin mononucleótido (FMN) como grupo prostético, 3) las ferro-sulfo-proteínas y 4) los citocromos que contienen un grupo prostético ferro-porfirina. A continuación nos restringiremos a la descripción de sólo los dos primeros grupos de enzimas, que son las que están involucradas en la degradación de los sustratos aromáticos de interés en esta revisión.

1.8.2.2 Deshidrogenasas piridin-dependientes

Esta clase de deshidrogenasas necesitan como coenzima al NAD o al NADP, los cuales contienen nicotinamida que es a su vez un derivado de la piridina, por lo que reciben, en general, el nombre de deshidrogenasas piridin-dependientes. Se conocen unas 200 deshidrogenasas que actúan en diferentes aspectos del metabolismo, catalizando las siguientes reacciones generales:

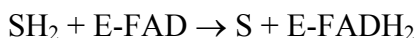
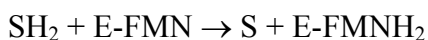


Estas reacciones comprenden la transferencia reversible de dos equivalentes de reducción del sustrato en forma de un ión hidruro (H^-) a la posición 4 del anillo de nicotinamida del nucleótido de piridina, el otro hidrógeno se separa del sustrato en forma de ion H^+ libre. Se ha podido comprobar la transferencia directa de un átomo de hidrógeno desde el sustrato al NAD^+ , mediante el empleo de moléculas de sustrato cuyos átomos de hidrógeno, fueron marcados previamente con deuterio o tritio (Lehninger, 1995).

Los nucleótidos de piridina se hallan unidos de modo no covalente a la proteína deshidrogenasa, siendo ésta una unión relativamente débil. Tanto el NAD como el NADP deben considerarse, por tanto, no como grupos prostéticos fijos, sino como sustratos, ya que en muchos casos se unen y se disocian del centro activo durante el ciclo catalítico. Los nucleótidos de piridina actúan así como transportadores disociables de electrones.

1.8.2.3 Deshidrogenasas flavin-dependientes

Estas enzimas contienen como grupos prostéticos firmemente unidos, un flavin-mononucleótido (FMN) o un flavin-adenin-dinucleótido (FAD), la porción activa del FMN o del FAD que participa en la oxido-reducción es reversiblemente reducido.



La reacción se muestra formalmente como una transferencia directa de un par de átomos de hidrógeno del sustrato, para producir las formas reducidas, designadas como FMNH₂ y FADH₂. Las deshidrogenasas más importantes ligadas a la flavina en la corriente principal de la respiración y del transporte de electrones se encuentran localizadas en las mitocondrias.

Las deshidrogenasas flavin-dependientes difieren significativamente de las piridin-dependientes en que el nucleótido flavínico se halla muy estrechamente unido a la enzima y funciona, por tanto, como un grupo prostético, en vez de hacerlo como coenzima. El flavín nucleótido no abandona la enzima ni durante ni después del ciclo catalítico.

1.8.2.4. Cis-tolueno-dihidrodiol deshidrogenasa.

La oxidación de los cis-dihidrodiol a catecoles es una reacción importante para el metabolismo bacteriano de varios compuestos benzoicos, la deshidrogenasa dependiente de NAD cataliza esta reacción. La cis-tolueno-dihidrodiol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* fue purificada por Rogers y Gibson, 1977, el peso molecular de la enzima es de 104 KiloDaltons (KD), dicha enzima esta compuesta aparentemente por cuatro subunidades idénticas de 27 KD y es específica para NAD. La reacción inicial del mecanismo de la cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa se presenta en la Figura 1.4.

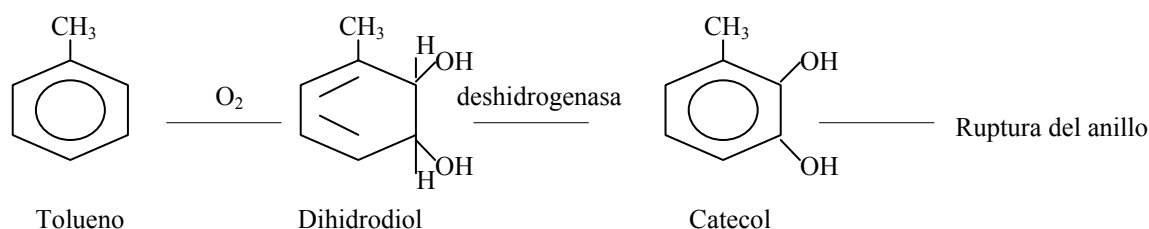


Figura 1.4. Secuencia general para la reacción de deshidrogenasas en el metabolismo bacteriano de compuestos aromáticos (Rogers y Gibson, 1977).

Los análisis cinéticos realizados por Rogers y Gibson, revelaron que la enzima tiene una mayor afinidad por el cis-tolueno-dihidrodiol que por el NAD. La incubación de la enzima purificada con Mn⁺², Mg⁺², Co⁺², Fe⁺² y Fe⁺³ no mostró un efecto significativo de estos metales sobre la actividad enzimática.

1.9 Vías metabólicas de degradación de otros sustratos aromáticos con hongos

El crecimiento fúngico con hidrocarburos aromáticos diferentes al tolueno también ha sido ya reportado. Cerniglia y col., 1978, 1979, 1982, 1984, realizaron varios estudios con el hongo *Cunninghamella elegans*, mostrando que este microorganismo es capaz de degradar una gran variedad de sustratos aromáticos, entre los cuales se encuentran el naftaleno, el benzopireno, el antraceno, el 7-metil benzoantraceno, el 7-hidroxi metil benzo antraceno, el fenantreno y el 1,2-metil naftaleno. Por otro lado, se han llevado a cabo estudios de degradación de n-alquil-bencenos, estireno, p-cresol y fenol (Fedorak y Westlake, 1986; Hartmans y col, 1990; Jones y col., 1993; Jones y col., 1995).

Fedorak y Westlake, 1986, realizaron un estudio con hongos aislados a partir de n-alcanos como sustrato, los cuales fueron crecidos en presencia de n-alquil-benceno para determinar el efecto del tamaño de la cadena adyacente. Los microorganismos no crecieron en presencia de tolueno, debido probablemente a la toxicidad de este compuesto, sin embargo, crecieron en otros compuestos como el dodecil-benceno a partir del cual se acumularon los ácidos benzoico y fenil-acético, estos ácidos fueron los metabolitos más abundantes encontrados en los cultivos fúngicos.

Dos hongos degradadores de estireno fueron aislados por Hartmans y col, 1990 y una de las cepas identificada como *Exophiala jeanselmei*, fue estudiada con mayor detalle por Cox y col, 1993. Los resultados encontrados con este hongo indican que la vía metabólica de degradación de estireno en hongos es similar a la ruta reportada para degradación de estireno con bacterias.

Jones y col., 1993, estudiaron el metabolismo del p-cresol con el hongo *Aspergillus fumigatus*. El microorganismo fue incubado con dicho compuesto y su crecimiento estuvo relacionado con la desaparición del material fenólico, demostrando la habilidad de este microorganismo para usar el cresol como sustrato para crecimiento. La concentración inicial fue de 0.3 mg/mL, concentraciones mayores incrementaron la fase de retardo y una concentración de 0.5 mg/mL inhibió la germinación de esporas. Durante el crecimiento de *A. fumigatus* con p-cresol se tomaron muestras periódicas, éstas fueron acidificadas y

examinadas mediante cromatografía de capa fina. Se observó la utilización gradual del p-cresol con la aparición transiente de compuestos fenólicos. A partir de estos resultados, se identificó como intermediarios tentativos de la ruta de degradación de p-cresol al 4-hidroxi alcohol bencílico, 4-hidroxi benzaldehído, ácido protocatehuico, protocatecuato aldehído y 4-metil catecol (Figura 1.5).

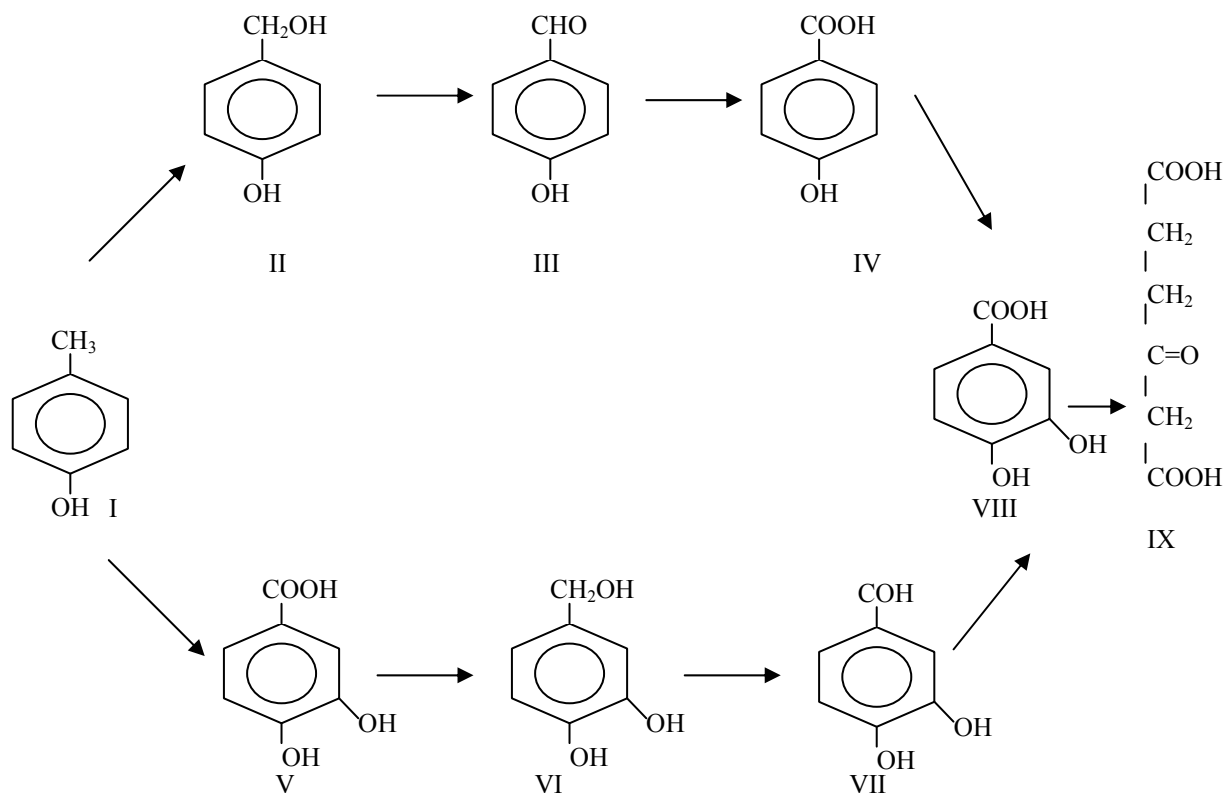


Figura 1.5. Ruta metabólica propuesta para el metabolismo de *Aspergillus fumigatus* en p-cresol. Los intermediarios son los siguientes: I p-cresol, II 4-hidroxi alcohol bencílico, III 4-hidroxi benzaldehído, IV 4-hidroxi ácido benzoico, V 4-metil catecol, VI 3,4-dihidroxi alcohol bencílico, VII protocatecuato aldehído, VIII ácido protocatehuico y IX 3-oxoadipato (Jones y col., 1993).

Estos datos sugieren que el grupo metilo del p-cresol es oxidado a carboxilo como etapa anterior a la ruptura del anillo y que el ácido protocatehuico es el sustrato de ruptura del anillo (Figura 1.5). Se observó el ataque del grupo metilo con la aparición de los correspondientes intermediarios monohidroxilados, mientras la transiente acumulación de 4-metil catecol apunta a la hidroxilación del anillo como posible primer paso. Este último compuesto es el sustrato de la ruptura del anillo en algunos microorganismos, pero la aparición de protocatecuato aldehído sugiere una nueva oxidación del grupo metilo. La

habilidad del micelio para oxidar el grupo metilo del 4-metil catecol fue demostrada incubando el micelio crecido en p-cresol en un medio que contenía 4-metil catecol. Los resultados de cromatografía mostraron la acumulación de protocatecuato aldehído.

En este mismo trabajo, se evaluó el crecimiento de *A. fumigatus* con los intermediarios de la ruta de degradación propuesta, encontrando que todos ellos fueron oxidados. Por otro lado, se determinó el consumo de O₂ en extractos celulares con los intermediarios de la ruta y se observó un incremento en el consumo de O₂ con estos compuestos, confirmando los resultados de crecimiento. También se evaluaron actividades enzimáticas, se detectó actividad deshidrogenasa para el alcohol 4-hidroxi bencílico y para el 4-hidroxi benzaldehído. En ambos casos tanto el NAD como el NADH sirvieron como aceptores de electrones, pero se obtuvieron actividades mayores con NAD. La oxidación del ácido 4-hidroxi benzoico mediante extractos celulares requirió la presencia de NADH y FAD indicando la presencia de una monooxigenasa del tipo flavo-proteína para la hidroxilación del anillo. La protocatecuato dioxigenasa no requirió cofactores.

Jones y col, 1995, también realizaron un estudio donde proponen dos rutas para el metabolismo de fenol con *Aspergillus fumigatus*. Este microorganismo fue capaz de crecer con dicho sustrato como única fuente de carbono y energía, durante su crecimiento se acumularon catecol e hidro-quinona. Los autores sostienen que dos rutas distintas operan simultáneamente produciendo sustratos diferentes de ruptura del anillo aromático. En la primera, el fenol es hidroxilado en posición “orto” para dar como resultado catecol, el cual es roto mediante el mecanismo intradiol para producir 3-oxoadipato. En la otra ruta, es hidroxilado en posición “para”, produciendo hidro-quinona, la cual es entonces convertida a 1,2,4-trihidroxi benceno, resultando maleilil acetato como producto de la apertura del anillo en posición “orto” (Figura 1.6). Los extractos celulares de micelio crecido en fenol contenían actividades enzimáticas para los pasos propuestos. Utilizando una técnica de separación en FPLC (cromatografía líquida de baja presión) lograron aislar dos dioxigenasas, una de ellas activa para 1,2,4 trihidroxi benceno pero no para catecol y la otra activa para ambos sustratos de ruptura del anillo.

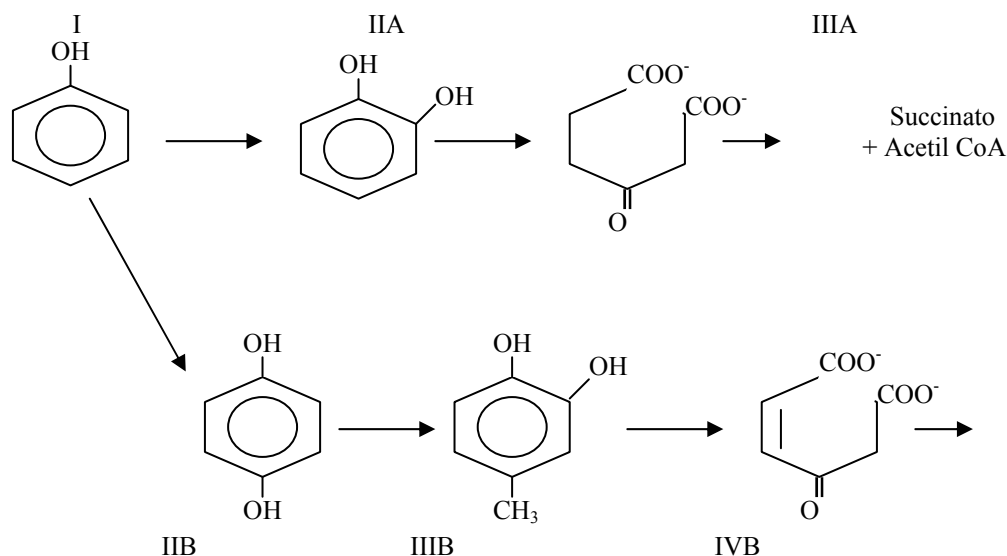


Figura 1.6. Rutas metabólicas propuestas para el metabolismo de fenol con *Aspergillus fumigatus* (ATCC 28282): Los compuestos involucrados son: I fenol, IIA catecol, IIIA 3-oxoadipato, IIB hidroquinona, IIIB 1,2,4 trihidroquinona y IVB maleilil acetato (Jones y col., 1995).

Adicionalmente, se ha demostrado la biodegradación de hidrocarburos poli-aromáticos con hongos de la pudrición blanca, los cuales son capaces de degradar un sin número de moléculas orgánicas, gracias a un inusual sistema de enzimas caracterizado por su grupo de peroxidasas, que catalizan la degradación de complejos polímeros ligninolíticos. El sistema ligninolítico es altamente inespecífico y oxida una gran variedad de compuestos (Paszczynski y Crawford, 1995). Field y col., 1992, realizaron un estudio de la degradación de antraceno y benzopireno con doce cepas puras de hongos de dicho grupo. Todas las cepas aisladas degradaron antraceno, alcanzando porcentajes de eliminación de hasta 99.2%. Durante el proceso de asimilación del antraceno se detectó 9, 10-anthroquinona como intermediario del metabolismo, el patrón de acumulación de esta quinona permitió clasificar a los microorganismos en dos grupos; los que acumulaban la quinona y los que no. Al evaluar dos cepas, una característica del grupo de las no acumuladoras y otra representante del grupo de las acumuladoras de 9, 10-anthroquinona, se encontró que la primera era capaz de metabolizar anthroquinona así como otras quinonas, mientras que la segunda no metabolizaba anthroquinona pero sí otras quinonas. Las doce cepas que degradaron el antraceno también consumieron benzopireno, las mejores degradadoras de

antraceno resultaron también ser las que más benzopireno consumían, alcanzando un máximo de eliminación de benzopireno de 83.1%. Es importante notar que durante el metabolismo de benzopireno no se detectaron metabolitos intermediarios.

Phanerochaete chrysosporium es capaz de degradar un amplio rango de compuestos, entre ellos DDT, hexacloro bifenil, tetracloro dibenceno, p-dioxin, lindano y anilina. Lin y col., 1990, inmovilizaron el micelio del hongo en carbón activado y degradaron eficientemente penta-cloro-fenol (PCP). También fue capaz de degradar hidrocarburos aromáticos simples y policíclicos. De la misma forma, una cepa de *P. chrysosporium* degradó benceno, tolueno etil benceno y xileno (BTEX), un grupo común de contaminantes orgánicos derivados de la gasolina y del combustible de aviación, logrando eficiencias de remoción del 41% para tolueno y 99% para etil benceno. Contrariamente a lo que se esperaba, la degradación de estos compuestos no se llevó a cabo en condiciones ligninolíticas, al parecer el sistema enzimático de peroxidasas no tuvo que ver con la eliminación del benceno y el tolueno (Yadav y Reddy, 1993).

P. chrysosporium también oxida halocarburos como el tri-cloro-etileno. Yadav y col., 2000, reportan que la lignina peroxidasa cataliza la deshalogenación reductiva del CCL₄ con la formación del radical tricloro metil. El sistema degradador de lignina consiste en lignina peroxidasas manganeso dependientes.

1.10 *Scedosporium apiospermum*

Durante estudios realizados por el grupo de investigación de la planta piloto de Bioprocesos de la UAM-I, se observó el crecimiento de una cepa fúngica en un biofiltro operado con vapores de tolueno (Morales y col., 1998). La colonización del biofiltro con dicha población predominante llevó al aislamiento y posterior identificación del hongo *Scedosporium apiospermum* (Auria y col., 2000).

Scedosporium apiospermum es un hongo oportunista comúnmente encontrado en el suelo y en vegetación en estado de descomposición. En 1944, Emmons demostró que *S.*

apiospermum es la forma asexual de *Pseudallescheria boydii*, ésta pertenece a los microascae que es una familia de Ascomicetos, conocidos también como Lophotrichaceae. Esta familia comprende unos 9 géneros y 38 especies de hongos del suelo (Hawksworth y col., 1983).

Las colonias de *S. apiospermum*, previamente conocido como *Monosporium apiospermum*, presentan un crecimiento moderadamente rápido (4-5 días), con aspecto algodonoso blanco al principio para posteriormente tornarse café claro (Figura 1.7A). Las conidias nacen aisladas o en pequeños grupos, conidiosporas simples o divididas pueden encontrarse lateralmente en las hifas (Figura 1.7B).

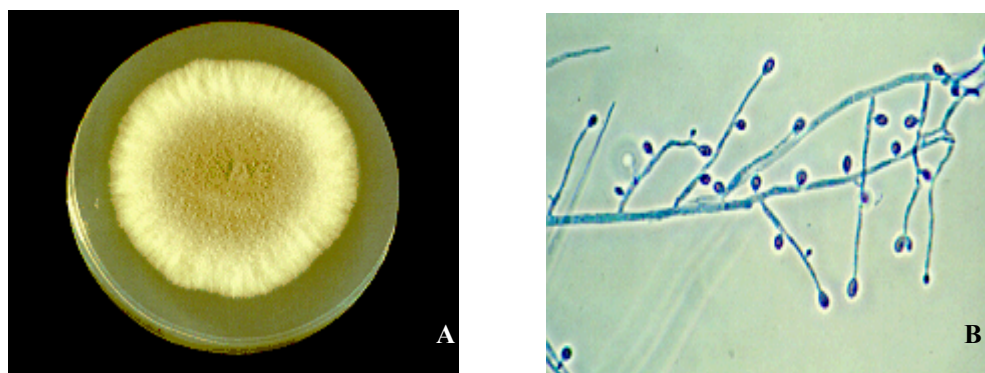


Figura 1.7. Vistas a diferentes escalas del crecimiento de *Scedosporium apiospermum*: A) Superficial en agar (forma y aspecto de la colonia). B) Expansión y distribución de micelio e hifas. Fotos obtenidas en Mycology online (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>).

La formación de la ascocarpa puede ser estimulada en agar con extractos de maíz u otros medios deficientes en nutrientes, sin embargo algunas veces no se produce la cleistotecia. Esta última puede ser amarilla-café, esférica y esta compuesta por hifas cafés. Cuando se rompe se producen numerosas ascosporas, las cuales son cafés, elipsoidales y de 5 x 7 μm de tamaño.

La temperatura adecuada para el crecimiento de *S. apiospermum* oscila entre los 30 a 37 °C y es un microorganismo proteolítico y amilolítico, el cual asimila urea, asparagina, nitrato

de potasio y nitrato de amonio. La glucosa también es utilizada por este hongo, sin embargo no es capaz de asimilar lactosa o maltosa.

La cepa *Scedosporium apiospermum* sp A-4 fue extensamente estudiada por Onodera y Ogasawara, 1989a, dichos autores reportan que el hongo crece en propano y n-butano como únicas fuentes de carbono y energía, catalizando la oxidación de varios alcoholes secundarios a sus correspondientes metil-cetonas. El hongo acumula acetona al crecerlo en propano y 2-butanona. La actividad de la alcohol deshidrogenasa fue medida, encontrando que tiene requerimientos específicos del cofactor NAD y al parecer la oxidación de 1 y 2-propanol se debe a la actividad de una sola alcohol deshidrogenasa. Posteriormente, estos autores reportan la oxidación de hidrocarburos gaseosos con micelio en reposo de *S. apiospermum*. Los n-alcanos gaseosos (C₂ a C₄) fueron oxidados a sus correspondientes alcoholes primarios y secundarios. Para observar si la oxidación de los n-alcanos fue debida a la incorporación de oxígeno molecular, los autores realizaron experimentos de incorporación de ¹⁸O₂, los espectros resultantes mostraron la reacción de incorporación de un átomo de O₂ en el alcohol primario y en el alcohol secundario mediante la acción de una oxigenasa. Estos datos sugieren que la oxidación de los n-alcanos en *S. apiospermum* sp. A-4 se llevó a cabo vía la ruta metabólica que implica un alcohol primario, un aldehído y un ácido monoico así como el alcohol secundario a una cetona (Onodera y Ogasawara, 1989b). Finalmente, Onodera y Ogasawara, 1989c, demuestran que tanto la oxidación de propano como de pentano fueron inducibles en presencia de propano, 1-propanol, 2-propanol, acetona o 3-pentanol. La actividad oxidativa inducible en propano fue reprimida por la glucosa y otros carbohidratos excepto almidón soluble.

1.11 Biofiltración en columnas escala laboratorio similares a sistemas de fermentación en medio sólido (FMS).

Hasta el momento, en la literatura existen pocos trabajos acerca de la degradación de sustratos gaseosos con hongos y el efecto de dichos sustratos sobre el metabolismo. Estos microorganismos han sido estudiados con mayor detalle en sistemas de fermentación

sólido, debido a que este sistema es el más cercano a los ambientes naturales de los hongos (Mitchell y Lonsane, 1992).

La biofiltración se asemeja a la fermentación en medio sólido (FMS) ya que en ambos casos se tiene un soporte sólido, al cual se adhiere una capa de microorganismos y una fase gaseosa que en la FMS aporta solamente oxígeno y en el caso de la biofiltración proporciona además la fuente de carbono y energía para los microorganismos. La FMS generalmente involucra el cultivo de microorganismos miceliales en medios que comprenden tres fases:

- Una fase sólida utilizada como soporte y en algunos casos contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos.
- Una fase líquida unida a la matriz sólida, donde ocurren los fenómenos de transporte de masa.
- Una fase gaseosa.

En el sistema de FMS, la agitación no es favorable puesto que ésta perturba el contacto físico entre el hongo y las partículas de soporte. En condiciones estáticas, la fase gaseosa es importante para regular la temperatura y el contenido de humedad del medio, también constituye una interfase de transferencia de oxígeno y del dióxido de carbono generado por el metabolismo.

Los hongos han sido ampliamente utilizados en FMS desde los procesos clásicos de producción de alimentos orientales fermentados hasta en la obtención de productos de alto valor agregado, como son las enzimas y metabolitos secundarios como por ejemplo el ácido cítrico (Doelle y col., 1992). Los hongos filamentosos tienen características fisiológicas que los hacen ser especies dominantes sobre bacterias y levaduras en procesos de fermentación sólida. Estos microorganismos crecen mejor a bajas actividades de agua comparados con bacterias y levaduras (Corry, 1973). Para muchos hongos filamentosos la actividad de agua óptima para crecer esta en rangos entre 0.93 y 0.98, sin embargo algunas especies crecen mejor a valores mayores. Los rangos mínimos de actividad de agua que requieren estan entre 0.7 a 0.93. Por otro lado, varios hongos filamentosos crecen bien a pH significativamente bajos (Pitt, 1981). Esto es ventajoso ya que el control del pH en FMS o

en procesos de biofiltración es complicado y el metabolismo de los microorganismos frecuentemente causa acidificación (Raimbault y Alazard, 1980). Su modo de crecimiento a través de hifas es la característica que más ventaja les da a los hongos sobre microorganismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos y en la utilización de nutrientes disponibles. El modo básico de crecimiento es una combinación de extensión apical de las puntas de las hifas mas la generación de nuevas hifas a través de la bifurcación (Edelstein y Segel, 1983). Un aspecto importante, es que la extensión solo ocurre en la punta de la hifa, este modo de crecimiento apical es soportado por material transportado desde la región de la hifa detrás de la punta (Oliver y Trinci, 1985). Esto permite una alta velocidad de expansión de la colonia, en ocasiones la velocidad de expansión de la colonia excede la difusión de los químicos del sustrato, lo cual implica que la hifa esta creciendo constantemente en medio fresco de aproximadamente la misma composición y pH del medio inoculado (Bull y Trinci, 1977).

La bifurcación de las hifas permite la máxima eficiencia en términos de la cantidad de biomasa requerida para cubrir la superficie disponible (Bull y Trinci, 1977; Prosser, 1982; Oliver y Trinci, 1985). Las hifas son también capaces de extenderse entre las partículas de sustrato y de colonizarlo (Moo-Young y col., 1983). Además los hongos filamentosos son capaces de regular su frecuencia de bifurcación en respuesta a la concentración del sustrato. A bajas concentraciones la colonia es menos densa y su velocidad de expansión es mayor (Bull y Trinci, 1977), de esta forma maximizan su oportunidad de encontrar regiones con mayores concentraciones de sustrato. Los hongos filamentosos pueden así colonizar rápidamente los soportes sólidos para utilizar eficientemente el sustrato disponible (Doelle y col., 1992).

2. Biofiltración.

Muchos procesos industriales, agrícolas, los sistemas de transporte, la producción de energía, los procesos de tratamiento de aguas residuales y lodos generan emisiones gaseosas contaminantes. Además de los efectos locales e inmediatos como malos olores, formación de humo y cuando contienen sustancias tóxicas, efectos nocivos para la salud. Existen también otros problemas menos inmediatos ocasionados por estos procesos, a saber, la destrucción de la capa de ozono, la lluvia ácida y el efecto de invernadero.

La conciencia pública acerca de la contaminación del aire va creciendo día con día. En muchos países se han establecido regulaciones y creado programas de protección al ambiente, éstos se basan en la prevención de emisiones, así como en el tratamiento de gases contaminantes (Swannell y col., 1991). Como resultado de esto, las industrias se vieron en la necesidad de buscar técnicas de limpieza de sus residuos gaseosos, procurando que éstas resulten simples, baratas y fáciles de operar (Ottengraf y Van den Oever, 1983).

El tratamiento de compuestos orgánicos volátiles (COVs) ha sido llevado a cabo usando tecnologías fundamentadas en mecanismos tanto físicos como químicos. Estas tecnologías incluyen procesos tales como la adsorción de los compuestos contaminantes en carbón activado, la absorción en una fase líquida, la condensación y la incineración térmica o catalítica. La selección de los sistemas de control específico depende de numerosos factores, como la concentración de los COVs, sus características fisicoquímicas, el flujo del efluente gaseoso, las características del gas contaminante, el contenido de la mezcla, la temperatura, la eficiencia requerida y las limitaciones de espacio. Varios efluentes gaseosos pueden ser controlados eficientemente usando tecnologías convencionales, sin embargo aún cuando se obtienen las eficiencias de remoción deseadas, el costo de lograrlo puede ser elevado y pueden producirse desechos o emisiones secundarias. Esto último puede consistir en una fase absorbente contaminada que requiere regeneración o en un efluente líquido contaminado que requiere de un tratamiento posterior. Debido a estas desventajas, en los últimos años ha crecido el interés hacia el uso de métodos biológicos para el tratamiento de residuos gaseosos, ya que estas técnicas han mostrado tener costos relativamente bajos, ser

fácilmente realizables y amigables con el medio ambiente al no producir residuos secundarios (Ottengraf y Van den Oever, 1983; Corsi y Seed, 1995).

Tabla 2.1. Compuestos eliminados de efluentes gaseosos mediante biofiltración. Experiencias de tratamiento de efluentes gaseosos industriales.

Compuesto	Tipo de industria	Velocidad del flujo (m ³ / h)	Eficiencia de eliminación (%)	Referencia
Olor	Rastro	214,000	94-99	Huber, 1992
Olor	Industria de tabaco	180,000		Kersting, 1992
Olor	Aceite vegetal	39,000	97	Eitner, 1992
Olor	Producción de gelatina	35,000	49-93	Kirchner, 1990
Olor	Tostadora de cocoa	4,000	>99	Hofmann, 1989
Olor	Planta de tratamiento de aguas ((PTA)	65,000	80-90	Mildenberger, 1992
C.O.V.	Procesadora de pescado (PP)	6,300	95	Liebe, 1989
C.O.V.	PP	10,300	85	Liebe, 1989
C.O.V.	Tanques de almacenamiento	2,000	90	Mildenberger, 1992
C.O.V.	PTA industrial	5,000	70-90	Mildenberger, 1992
H ₂ S	Gas de composta	300	> 99	Sabo, 1989
Alcoholes	Fundición	30,000	> 99	Maier, 1989
Aromáticos	Fundición	40,000	80	Maier, 1989
Aromáticos	Pinturas	1,500	85-90	Demiriz, 1992
Estireno	Procesamiento de resinas		65	Demiriz, 1992
Fenol	Resinas de fenol		87	Demiriz, 1992
Formaldehido	Producción de madera laminada	1,450	80	Mackowiak, 1992
BTEX	-----	20,000-30,000	70-90	Severin, 1993
BTX	-----	63,600	>95	Baltzis y Androutsopoulou, 1994

Fuente: van Groenestijn y Hesselink, 1993, modificación con información de Corsi y Seed, 1995. C.O.V. Compuestos Orgánicos Volátiles.

Una de las tecnologías con las características mencionadas es la biofiltración. Usando esta tecnología se han tratado exitosamente mezclas olorosas de gases, ácido sulfhídrico, mercaptanos y una gran cantidad de compuestos gaseosos, como se puede observar en la Tabla 2.1. Por otro lado, se ha demostrado que bajo condiciones apropiadas, la biofiltración también puede servir como un método efectivo de control de corrientes gaseosas contaminadas con benceno, tolueno y xileno (BTX) (Corsi y Seed, 1995).

2.1 Características principales del proceso de biofiltración

La biofiltración es una tecnología de control de la contaminación en gases que consiste en el paso de efluentes gaseosos a través de un lecho empacado constituido por un material poroso de soporte que puede poseer o atrapar nutrientes y microorganismos. Estos últimos forman una capa, denominada bio-película, la cual está adherida al soporte.

Los contaminantes son transferidos de la fase gaseosa y son posteriormente absorbidos por la bio-película, en ésta los contaminantes son usados como fuente de carbono y energía.

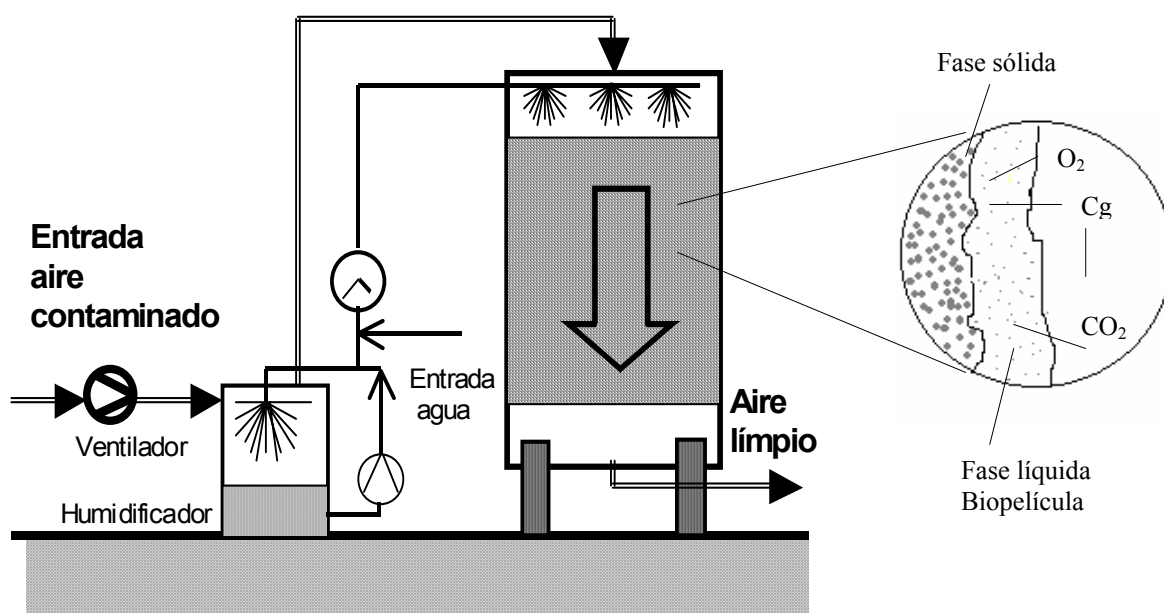


Figura 2.1 Esquema general de la biofiltración. Entrada y salida del contaminante a través de un lecho poroso donde existen microorganismos formando una bio-película (Devanny y col., 1999).

Los productos finales de la degradación de compuestos orgánicos volátiles son CO₂, agua y biomasa (Leson y Winer, 1991; Corsi y Seed, 1995). La utilización de los contaminantes como sustratos, crea un gradiente de concentración en la bio-película, lo cual promueve la difusión de moléculas del contaminante desde la interfase gas-bio-película hasta la interfase bio-película-sólido (Figura 2.1).

En la Tabla 2.2, se señalan las características más sobresalientes de la biofiltración, así como sus principales ventajas y desventajas.

Tabla 2.2. Principales aspectos de la biofiltración.

Características	Áreas de aplicación
Biomasa inmovilizada	Efluentes gaseosos con una concentración del compuesto a degradar $< 5 \text{ g/m}^3$ Compuestos gaseosos con un coeficiente de Henry < 10
Fase acuosa inmovilizada	
Un único reactor	
Ventajas	Desventajas
Gran área superficial gas-líquido	Control pobre de las condiciones de reacción Adaptación lenta a fluctuaciones en la concentración del compuesto en el gas
Fácil operación y arranque	
Bajos costos de operación	

Fuente: van Groenestijn y Hesselink, 1993.

2.2 Ventajas de la biofiltración.

En Europa, la biofiltración ha sido usada exitosamente para controlar olores y compuestos orgánicos volátiles tóxicos. En Alemania, por ejemplo, se tratan mediante biofiltración una gran variedad de efluentes producidos por fuentes tanto industriales como públicas. El desarrollo de la biofiltración tuvo su inicio en los años 70 como respuesta a las estrictas medidas regulatorias impuestas por el gobierno y el soporte financiero de éste. La experiencia en Europa ha demostrado que la biofiltración tiene varias ventajas, principalmente económicas, sobre otras tecnologías para el tratamiento de la contaminación del aire, particularmente cuando la biofiltración es aplicada a efluentes que contienen bajas

concentraciones de contaminantes y compuestos fácilmente biodegradables (Leson y Winer, 1991).

Flujo de aire (m^3/h)

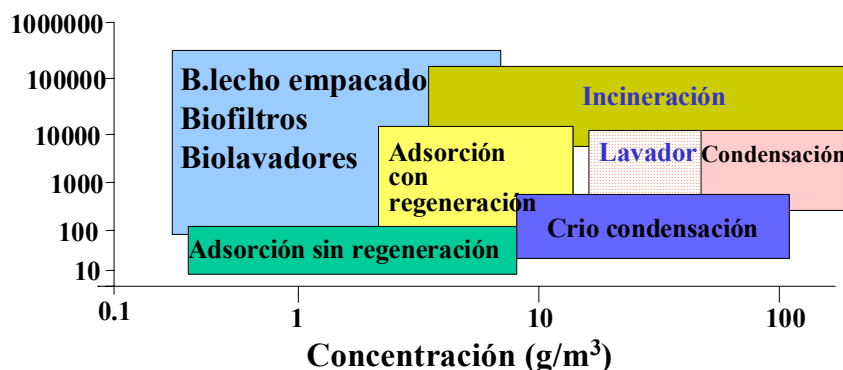


Figura 2.2 Aplicación de varias tecnologías de control de contaminantes basadas en las velocidades de flujo de aire y las concentraciones a tratar. (Kostelz A.M. y col, 1996)

Algunas de las ventajas de la biofiltración son las siguientes (Ottengraff y Van den Oever, 1983):

- Requiere una inversión inicial relativamente baja, pudiéndose lograr eficiencias de eliminación altas.
- Debido a su construcción modular y flexible, los biofiltros se adaptan fácilmente a nuevas condiciones de operación.
- Se obtienen altas eficiencias de remoción de hasta 99%.
- Se requieren consumos bajos de energía.
- A pesar de eliminar un amplio rango de contaminantes, el biofiltro permanece limpio y más importante aún, no implica el manejo de residuos tóxicos.

Debido a estas ventajas la popularidad de esta técnica se ha incrementado en los últimos años. La capacidad de los biofiltros instalados por compañías alemanas y holandesas se ha llegado a incrementar de forma exponencial, hasta llegar a tratar $330,000\text{m}^3/\text{h}$ de gas en 1990 (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Reportes mas recientes de compañías estadounidenses a cerca de la última generación de biofiltros mencionan que se pueden

tratar volúmenes de aire de hasta 136,800 m³/h con concentraciones típicas de 2500 ppm de contaminantes (Reynolds y Grafton, 1999).

2.3 Factores importantes en un biofiltro.

Varios factores físico-químicos y operacionales tienen influencia en el funcionamiento y estabilidad en un biofiltro para el tratamiento de aire contaminado durante largos periodos de operación (van Groenestijn y Hesselink, 1993, Corsi y Seed, 1995; Devinny y col., 1999). En general, los tres parámetros más importantes para un funcionamiento eficiente son el contenido de humedad del medio filtrante, el pH y la temperatura. Otros factores también que deben ser tomados en cuenta son el material de soporte, su tiempo de vida y sus características. El fundamento del tratamiento en los biofiltros es la acción de microorganismos capaces de degradar los compuestos contaminantes. Esto implica que el control de los parámetros operacionales en el biofiltro consiste básicamente en lograr el control de la actividad del proceso biológico (Devinny y col., 1999).

2.3.1 Material de empaque o soporte.

Los biofiltros constan de un medio sólido poroso que soporta a los microorganismos y permite a estos el acceso a los contaminantes presentes en el flujo de aire. Se han evaluado una gran cantidad de materiales de soporte orgánicos, inorgánicos y sintéticos (Devinny y col., 1999). En general el empaque del biofiltro debe tener las siguientes características:

- Una alta capacidad de retención de humedad para prevenir el secado.
- Una alta porosidad para evitar la compactación del material y asegurar la distribución del gas que se introduce.
- Disponibilidad de nutrientes para el buen crecimiento microbiano.

Y en el caso de soportes orgánicos usados en procesos de biofiltración convencionales además deberán contener una diversa y abundante población microbiana y nutrientes suficientes para promover el crecimiento de los microorganismos.

Se han utilizado y estudiado una gran cantidad de materiales de empaque, tales como la corteza, la composta, la turba y el suelo. Estos han resultado efectivos para diferentes contaminantes específicos y efluentes gaseosos (Hodge, 1991; Williams y Miller, 1992; Bohn, 1993). El material de empaque que hasta el momento llena mejor los requerimientos, para la degradación de BTX, es la composta (Corsi y Seed, 1995).

Los materiales de empaque naturales, como la composta, requieren usualmente la adición de materiales inertes para prevenir la compactación, esta puede crear una mala distribución del flujo. Ottengraf, 1986, recomiendan la adición de esféras de poliestireno para reducir las pérdidas de porosidad y prevenir el deterioro del lecho. Williams y Miller, 1992, observan que el 60% en peso de las partículas en el filtro deben tener un diámetro efectivo mayor a 4 mm. Soportes orgánicos, tales como composta, turba, cortezas, entre otros, tienen suficientes nutrientes para mantener la oxidación biológica de compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, la mineralización de material de empaque puede promover la compactación y el incremento en la caída de presión (Devinny y col., 1999).

El uso de materiales de soporte inorgánicos permitirá una distribución más uniforme del gas así como un mejor contacto biológico. Estas características tienen como resultado una operación consistente debido a que existe un mejor control de la caída de presión, así como de la concentración de nutrientes y del pH (Sorial y col., 1995). Sin embargo, en este tipo de soportes los nutrientes deberán ser adicionados. Diversos materiales de empaque sintéticos han sido probados para procesos de biofiltración, estos no contienen nutrientes ni microorganismos por lo cual deben ser adicionados. Los nutrientes en los soportes inorgánicos pueden perderse a través de lixiviados o ser agotados por la biomasa a lo largo del tiempo de operación. Debido a que no hay generación de nuevos nutrientes a partir del material de soporte, tal como ocurre con la descomposición de la composta, los nutrientes adicionados a los soportes inorgánicos deberán ser aplicados continuamente o ocasionalmente a través de los sistemas de irrigación. El control de la adición de agua y nutrientes dependerá de los requerimientos específicos y de las propiedades de absorción del soporte. El carbón activado o las tierras diatomeas son suficientemente porosos para atrapar cantidades suficientes de agua y nutrientes; de esta forma el contenido de agua en reactores empacados

con estos soportes puede ser fácilmente controlado. Los medios sintéticos como anillos de polipropileno no tienen capacidad de retención de agua por lo cual requieren adición continua de ésta para mantener su superficie húmeda. En los últimos años ha sido reportado el uso de materiales tales como vermiculita (Ortiz y col., 1998), cerámica con y sin carbón activado (Bishop y Govind 1995; Sorial y col., 1995), poliuretano (Cox y col., 1993; Loy y col., 1997; van Groenestijn y col., 1995; Moe e Irvine, 1997), tierras diatomeas (Kinney y col., 1996a), entre otros.

En cuanto a las características de la vermiculita Pineda., 1996, reporta que la vermiculita cuya formula ideal aproximada es la siguiente $(Ca, Mg)_{0.16}(Mg, Fe, Al)_3((Al, Si)_4O_{10})(OH)_2, 3.5H_2O$, tiene una porosidad de 0.7 y una la capacidad de retención de agua máxima de 75%. Con un valor de área máxima de transferencia igual a $675m^2/m^3$. Posteriormente, Ortiz y col., 1998, evalúan varios soportes para la remoción de vapores de BTX (benceno, tolueno, xileno), entre los cuales se cuentan la turba, vermiculita, cerámicas porosas y corteza de pino, además una mezcla de dos tercios (en volumen) de vermiculita y un tercio de carbón activado, esta última presentó los mejores resultados para la eliminación de los BTX. La vermiculita mostró propiedades favorables para la biofiltración tales como una importante área superficial (alrededor de $650m^2/m^3$), una baja gravedad específica, una distribución de tamaño de partícula relativamente homogénea y buenas características de drenaje de agua. Estas propiedades resultaron en una baja caída de presión en el biofiltro.

2.3.2 Población microbiana.

Los microorganismos involucrados en la degradación de contaminantes en los biofiltros son numerosos. Entre los cuales se pueden encontrar bacterias, levaduras y hongos. Por ejemplo, la composta muestra una mayor densidad de población que el suelo o la turba (Leson y Winer, 1991). Muchos de los microorganismos encontrados en materiales de empaque de los biofiltros no inoculados, son bacterias. Dependiendo de la composición del flujo gaseoso y las condiciones fisicoquímicas en el filtro se desarrollan diferentes mezclas de poblaciones (Cox y col., 1993). Rieneck, 1992, encontró que muchas de las bacterias

presentes son corineformes y formadoras de esporas, es decir, bacilos y ocasionalmente son *Pseudomonas*. Los *Actinomicetos* son frecuentemente representados por *Streptomyces spp.* Los hongos pueden pertenecer a los géneros *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria* y *Botritis*. De acuerdo a Pearson y col., 1992, el total de bacterias contadas en un biofiltro se encuentra en un rango de 5×10^7 y 3×10^{10} /g de empaque, mientras que los hongos se encuentran en menor cantidad.

Las bacterias y los hongos son, ciertamente, los dos grupos de microorganismos dominantes en los biofiltros. Muchas bio-películas pueden contener un número sustancial de ambos, pero su abundancia varía frecuentemente. Las bacterias tienen la ventaja de la rápida asimilación del sustrato y el crecimiento. Bajo condiciones favorables, las bacterias serán las dominantes, sin embargo los hongos están presentes. Los hongos generalmente crecen más lentamente y su tamaño les da una menor relación superficie-volumen para la asimilación del sustrato. Estos microorganismos frecuentemente son capaces de degradar una gran variedad de contaminantes y pueden soportar condiciones extremas (Devinny y col., 1999). van Groenestijn y col., 1995, mostraron que los hongos pueden permanecer en el sistema a pH igual a 2.5 y con aire en el biofiltro relativamente seco. Castro y col., 1997, observaron colonias de hongos en el biofiltro incluso a temperaturas de operación tan extremas como los 60 a 71°C. Cabe resaltar que los hongos pueden producir filamentos que bloquean el flujo del aire ocasionando el compactamiento de las partículas del material de soporte. El crecimiento excesivo de formas miceliales pueden incrementar la caída de presión e interferir con la adición de medio de cultivo (Devinny y col., 1999). Hugler y col., 1996, caracterizaron una bio-película en un bioreactor de lecho escurrido (biotrickling filter), usado para tratar sulfuros, como una vasta mezcla que contenía hongos, bacterias, levaduras, protozoarios, nematodos y algas. La complejidad ecológica de las bio-películas es ilustrada mediante la discusión de la abundancia de hongos en su bio-reactor. La presencia de estos microorganismo en un proceso de tratamiento de sulfuros inorgánicos no era esperada ya que estos compuestos son rápidamente consumidos por bacterias. Dichos autores sugieren que las posibles explicaciones de que esto sucediera son: que los hongos presentes vivían a partir de la materia orgánica creada por las bacterias sulfo-oxidantes, que los hongos hayan tenido la capacidad de oxidar los sulfuros y que pequeñas cantidades de

sustrato orgánico para los hongos hayan estado presentes en el aire. Lo que es evidente es que los hongos son microorganismos importantes en ese sistema, sin embargo aún es necesario aumentar el conocimiento fundamental acerca de su función en los ecosistemas microbianos. Los organismos filamentosos pueden crecer en los espacios libres del soporte llenos de aire. Su superficie hidrofóbica permanece seca y pueden absorber el sustrato directamente a partir de la corriente de aire. La elevada área superficial de los filamentos puede facilitar la fase de transferencia (Devinny y col., 1999). Braun-Lulleman y col., 1995, sugieren la importancia de la absorción directa de contaminantes en los filamentos de hongos de la pudrición blanca usados en un biofiltro.

Una gran variedad de microorganismos han sido estudiados en conexión con los biofiltros. En particular, algunos investigadores han estudiado la distribución especial de los microorganismos en los biofiltros y han observado que la remoción de compuestos orgánicos volátiles es mayor cuando la densidad de microorganismos es alta (Ottengraf y van den Oever, 1983). La biodegradación de compuestos xenobióticos, puede requerir la inoculación del biofiltro con microorganismos que hayan sido expuestos previamente al contaminante. Suspensiones de carbón activado, de suelo y de microorganismos especialmente cultivados han sido usados como inóculo para la degradación de ese tipo de compuestos (Corsi y Seed, 1995). La presencia de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos es necesaria para la biofiltración de BTX. Wrigth y col., 1997, encontraron que la aclimatación en biofiltros de composta usados para tratar vapores de gasolina fue más rápida cuando se inocularon con cultivos previamente crecidos en gasolina. Leson y Smith, 1997, llegaron a la misma conclusión, sugiriendo que la inoculación disminuye el tiempo de aclimatación y no afecta las eficiencias de remoción.

2.3.3 Efecto de la humedad

El control de la humedad es crucial para mantener el óptimo funcionamiento de un biofiltro. Si un biofiltro alcanza una humedad igual o inferior a 30%, generalmente, ya no es útil para la remoción de compuestos orgánicos volátiles. Una humedad muy baja puede impedir la transferencia de masa e inhibir el crecimiento y metabolismo microbiano.

Demasiada humedad puede ocasionar compactación y favorecer la formación de zonas anaeróbicas. Ottengraf, 1986, encontró que es adecuado un contenido de agua mayor a 40%. Mueller, 1988, sugirió que una humedad óptima se encuentra alrededor de 50% (en base al peso total).

Un problema tecnológico grave en los biofiltros es justamente el secado del material de empaque y por tanto la pérdida de efectividad en la capacidad de remoción. Un método para prevenir este problema consiste en la humidificación del gas que se introduce. Williams y Miller, 1992, recomiendan un grado de saturación del flujo gaseoso mayor a 95%, sin embargo el secado también puede ocurrir debido a la actividad microbiana exotérmica por lo cual a veces se requieren humedades del 99%. En ocasiones se puede adicionar agua al empaque de los biofiltros mediante rociamiento superficial. La frecuencia o velocidad de esta operación dependen de las propiedades físicas del empaque. La adición excesiva de agua puede ocasionar compactación y/o lavado de algunos nutrientes adheridos al soporte.

Una solución interesante a este problema es el uso de hongos debido a que estos microorganismos se desarrollan en hábitats naturales con bajos contenidos de agua. Por otra parte, van Groenestijn y Hesselink, 1993, postulan que las hifas aéreas de los hongos forman una gran área de superficie específica, la cual está en contacto directo con el flujo de aire que pasa a través del biofiltro. De esta forma los contaminantes son transferidos directamente a la superficie de las células sin problemas de transición de fase. Esto podría mejorar la absorción de compuestos hidrofóbicos volátiles. Majcherczyk y col, 1990, realizaron experimentos con hongos de la pudrición blanca, crecidos en paja y otros residuos agrícolas, como soportes, mostraron que dichos microorganismos excretan enzimas oxidasas que catalizan la degradación de la lignina. Estas enzimas extracelulares son inespecíficas y capaces de degradar varios compuestos aromáticos. La eliminación de estireno, de α -pireno y de clorofenol fue posible debido al potencial oxidativo de las enzimas de estos microorganismos combinada con una gran área de superficie biológicamente activa. Uno de los representantes más importantes de los hongos de la pudrición blanca es *Phanerochaete chrysosporium*, este organismo ha mostrado ser capaz

de degradar diversos tipos de compuestos. van Groenestijn y Hesselink, 1993, llevaron a cabo un estudio con un hongo degradador de estireno en un biofiltro empacado con soporte inerte, observando que el biofiltro fúngico alcanzó una actividad alta y constante, no obstante que la humedad del flujo gaseoso que se inyectó al reactor fue de 85% y la humidificación del empaque fue incidental. En otro estudio, Cox y col., 1993, obtuvieron buenas eficiencias de remoción y una capacidad de eliminación de por lo menos 70g de estireno/m³ h en biofiltros con hongos, las eficiencias de remoción que mostraron estos microorganismos fueron del 50% en fase estacionaria (Cox y col, 1993).

2.3.4 Efecto de nutrientes. Limitación de nutrientes en biofiltros.

El crecimiento de los microorganismos presentes en un biofiltro generalmente continua hasta que alguno o todos los nutrientes del empaque se terminen. En este punto la biomasa entra en un estado pseudoestacionario, en el cual los compuestos carbonados aportados por la fase gaseosa son usados para el mantenimiento de las células y el reemplazo de las células muertas. Esta situación puede continuar por varias semanas (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Como las fuentes de carbono proveídas por la fase gaseosa son usualmente abundantes, la cantidad de biomasa en el biofiltro está limitada frecuentemente por la cantidad de nutrientes minerales presentes en el mismo (Don, 1986). La adición de fosfato de calcio o de potasio puede incrementar el grosor de la biocapa. Debido a las limitaciones de difusión del carbono y del oxígeno, esto no siempre implica actividades volumétricas mayores. En general, mayor cantidad de biomasa puede obstaculizar los poros del soporte y de esta forma se dan mayores limitaciones de transferencia de masa (van Groenestijn y Hesselink, 1993).

En un biofiltro los nutrientes inorgánicos son transportados por difusión molecular desde el empaque hasta los microorganismos, las células muertas también pueden ser recicladas como nutrientes en el soporte. Los biofiltros con composta usualmente proveen suficientes nutrientes inorgánicos para la degradación microbiana de compuestos orgánicos volátiles. En algunos casos, la disponibilidad de nutrientes puede convertirse en un factor limitante,

por ejemplo, la adición de nutrientes a un biofiltro usado para remover tolueno incrementó la remoción de dicho compuesto (Don, 1986; Corsi y Seed, 1995).

Varios estudios realizados en biofiltros reportan que después de algún tiempo de operación se da una limitación de nutrientes que afecta el funcionamiento de éstos. Uno de los nutrientes que parece ser particularmente importante es el nitrógeno. Morgenroth y col, 1996, observaron un efecto de los nutrientes en un biofiltro de composta para remover n-hexano del aire. Puesto que el n-hexano es un hidrocarburo de cadena relativamente corta, fácilmente biodegradable, se esperaba que el periodo de aclimatación del biofiltro fuese corto y la capacidad de remoción alta. Sin embargo, se obtuvo un periodo de aclimatación largo y eficiencia de remoción de 80% durante el primer mes de operación. La eficiencia fue decreciendo hasta alcanzar un valor de 50% durante los dos meses siguientes de operación, se propuso que esta disminución en la eficiencia de remoción del biofiltro fue debida a una disminución en la cantidad de nutrientes. La hipótesis fue corroborada, ya que al agregar una solución concentrada de nitrógeno se obtuvo una eficiencia de 99% casi de inmediato. La eficiencia de remoción se mantuvo en ese valor durante los dos siguientes meses. Evidentemente, las razones del largo periodo de aclimatación también pudieron ser las bajas velocidades de crecimiento de los microorganismos dadas las limitaciones en nitrógeno. Asimismo, lo anterior pudo deberse a una baja disponibilidad del sustrato, es decir, a la concentración del hexano soluble y la velocidad de transferencia de masa en la capa de líquido de este compuesto. Hartikainen y col, 1996, reportan que la adición de nitrógeno aumentó la capacidad de oxidar amonio a nitratos en sistemas de biofiltración usados para remover amoníaco. En estos sistemas la efectividad del sistema depende de la capacidad de nitrificación de los microorganismos (oxidación de amonio a nitrato) y su velocidad de nitrificación se ve afectada por factores tales como la temperatura, el pH, los nutrientes y los compuestos inhibidores.

En ambos estudios se observó un efecto positivo de la adición de nutrientes al biofiltro, sin embargo, no se sabe a que nivel la carencia de nutrientes afecta a las poblaciones microbianas presentes. Probablemente tienen que ver con aspectos fisiológicos y

metabólicos de los microorganismos responsables de la degradación del contaminante o bien simplemente la adición de nutrientes permite un aumento en la biomasa.

2.3.5 Efecto del pH del empaque.

Muller, 1988, sugirió que el funcionamiento óptimo de un biofiltro ocurre en un rango de pH entre 6 y 8. Leson y Winer, 1991 y Ottengraf y Dicks, 1992, encuentran que las condiciones óptimas de pH para un biofiltro de composta están entre pH 7 y 8. La oxidación de sulfuro, nitrógeno o compuestos clorados puede ocasionar la formación de ácidos intermedios que disminuyen el pH del empaque con una subsecuente reducción en la eficiencia de remoción. En biofiltros que remueven exitosamente H_2S se han obtenido valores de pH entre 2.5 y 3.5 (Schelchshorn y Vinke, 1989). Algunos autores han usado la producción de ácidos como reguladores del pH. El crecimiento de los hongos se vió favorecido cuando se presentaron condiciones de pH bajo, lo cual puede afectar positiva o negativamente el funcionamiento del biofiltro (Cox y col, 1993).

2.3.6 Efectos de la temperatura.

La temperatura del biofiltro se ve afectada por las reacciones biológicas exotérmicas, así como por la temperatura del flujo gaseoso que es introducido. La temperatura por sí misma afecta la actividad microbiana y juega un papel importante en la evaporación del agua del empaque. Las temperaturas óptimas para biofiltros aeróbicos se encuentran entre los 25 y 35 °C, el cual es un rango de temperatura mesofílico (Leson y Winer, 1991). Debido a esto es necesario reducir la temperatura de algunos efluentes usando intercambiadores de calor.

2.3.7 Efecto del sustrato.

La máxima concentración de sustrato en el reactor depende de la concentración del contaminante en la fase gaseosa y de su coeficiente de Henry (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Ottengraf y col., 1986, reportan que la biodegradación de compuestos xenobióticos se incrementa cuando la complejidad de la composición del efluente gaseoso decrece. Sin

embargo, muchos efluentes gaseosos residuales consisten de sustratos múltiples. En cuanto a este punto existen dos posiciones; algunos autores reportan que la degradación de ciertos compuestos se inhibe en presencia de otros, mientras que otros postulan la necesidad de la presencia de co-sustratos para la biodegradación de compuestos alifáticos altamente clorinados y poliaromáticos. Por ejemplo, la degradación del metanol parece inhibirse en presencia del terbutanol (van Lith, 1989), algo similar ocurre con el tolueno y el clorobenceno, a pesar de que ambos son fácilmente biodegradables como compuestos únicos. La degradación del tolueno se inhibe en presencia del clorobenceno (Engesser, 1992). Algunos compuestos difíciles de degradar son convertidos a productos más oxidados por enzimas que pertenecen a rutas metabólicas que son inducidas por sustratos completamente diferentes. La adición de co-sustratos resulta en la producción de biomasa que posee la ruta metabólica requerida (van Groenestijn y Hesselink, 1993). De esta forma la biodegradación del benceno parece ser más lenta cuando éste es el único constituyente del flujo gaseoso, mientras la presencia de otros compuestos parece incrementar su biodegradación (Leson y Winer, 1991).

2.3.8 Factores que afectan la velocidad de eliminación del contaminante.

La biofiltración consiste en una combinación de procesos, de transferencia de masa (absorción a partir del gas) y de biodegradación. Por tanto, la degradación del compuesto no solo dependerá de la biodegradabilidad propia del mismo sino también de la transferencia de masa en la interfase gas-líquido y de los coeficientes de difusión del sustrato y el oxígeno.

La transferencia de masa en la interfase gas líquido se puede describir mediante la siguiente formula (Van't Riet y Tramper, 1991):

$$F'' = K_t a (C^* - C)$$

$$C^* = C_g / H$$

Donde:

F'' = Velocidad de transferencia de masa ($\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$)

K_t = Coeficiente de transferencia de masa interfacial (m s^{-1})

a = Área interfacial por unidad de volumen ($\text{m}^2 \text{m}^{-3}$)

C^* = Concentración en la fase líquida en equilibrio con la fase gaseosa (mol m^{-3})

C = Concentración de la fase líquida (mol m^{-3})

C_g = Concentración en la fase gaseosa (mol m^{-3})

H = Coeficiente de Henry

El área interfacial “ a ” depende de la estructura del material de soporte, es decir, del tamaño de partícula y del área del poro, mientras K_t es dependiente de los eventos cerca de la interfase, de la difusión, etc. La transferencia de masa depende también de las características físicas y químicas del flujo gaseoso y de los compuestos a degradar (van Groenestijn y Hesselink, 1993). La cantidad de contaminante absorbido en el biofiltro depende del coeficiente de Henry. Los compuestos pobremente solubles con coeficientes de Henry > 10 son difícilmente degradados mediante la biofiltración (Kok, 1992).

Desde el punto de vista biológico la degradación de un compuesto en un biofiltro depende del tipo de microorganismo, de la cantidad de biomasa y de las condiciones metabólicas y regulatorias celulares (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Después de la inoculación, los microorganismos que son capaces de crecer con el o los compuestos orgánicos presentes en la fase gaseosa se acumularán en el biofiltro formando una bio-película. Además de la fuente de carbono necesaria para la producción de biomasa y energía se requiere oxígeno como aceptor de electrones. Generalmente, el oxígeno es continuamente alimentado mediante la corriente de aire de entrada. Otros elementos necesarios para producir biomasa son proveídos lentamente desde el material de empaque. Se espera que estos compuestos sean reciclados en la bio-película, es decir que los elementos producidos a partir de muerte celular serán usados nuevamente por células en crecimiento. El crecimiento de microorganismos que requieren factores de crecimiento depende de la producción de dichos factores a través de la muerte celular. El crecimiento continuará hasta que algunos elementos tales como carbono, nitrógeno, fósforo u oxígeno se agoten. En ese momento, la biomasa alcanza la fase estacionaria, en la cual el carbono es solamente usado para el

mantenimiento de las células. La situación estacionaria se alcanza en algunas semanas. Debido a que la velocidad de consumo de sustrato en células en estado estacionario es generalmente menor que en células en crecimiento se espera que el decremento en el funcionamiento del biofiltro sea pequeño (van Groenestijn y Hesselink, 1993).

Como la fuente de carbono usualmente es alimentada en abundancia a través de la corriente gaseosa, la cantidad de biomasa en el biofiltro estará limitada por la cantidad de nutrientes minerales presentes (Don, 1986). La adición de fósforo de potasio o calcio puede incrementar el grosor de la bio-película. Sin embargo, este hecho no necesariamente resulta en mayores actividades volumétricas debido a la limitación en la difusión de compuestos carbonados y de oxígeno. En general un exceso de biomasa causa taponamiento del poro y limitaciones en la transferencia de masa.

A pesar de aún no haber sido estudiados con detalle, se espera que los procesos en los biofiltros estén influenciados por interacciones microbianas tales como la simbiosis, la competencia y la inhibición debida a la producción de antibióticos. La competencia será especialmente importante en el caso del tratamiento de mezclas de componentes en la corriente gaseosa. Los microorganismos que tienen una alta especificidad por sustratos fácilmente degradables excluirán mediante competencia por oxígeno, nutrientes y área a organismos seleccionados por su capacidad de consumir compuestos difíciles de degradar. Los microorganismos que degradan compuestos complejos se desarrollarán con dificultad. Los compuestos pobremente degradables serán convertidos solo cuando otros compuestos han sido totalmente removidos, esto puede ocurrir en las partes más profundas del biofiltro o en un segundo biofiltro (van Groenestijn y Hesselink, 1993). La actividad microbiana depende también de factores tales como la temperatura, el pH, el contenido de humedad y la concentración de sales.

También puede darse una inhibición de la actividad microbiana debido a una alta concentración del sustrato o a la presencia de subproductos. La máxima concentración de sustrato en el bioreactor dependerá de la concentración en la fase gaseosa y del coeficiente de Henry, es necesario evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad

microbiana. La acumulación de intermediarios o compuestos orgánicos oxidados incompletamente pueden afectar también la actividad microbiana y el funcionamiento del biofiltro.

Velocidades de eliminación pobres pueden ser causadas por largas fases de retardo, por diauxia o por represión catabólica. Las fases de retardo pueden ser un problema durante la fase de arranque, mientras que la diauxia puede retardar la eliminación de compuestos de difícil degradación si un sustrato alternativo más fácilmente asimilable está presente (Harder y Dijkhuizen, 1982). Algunos compuestos pobremente degradables, xenobióticos, son convertidos mediante enzimas que pertenecen a otra vía metabólica que solo se inducen en presencia de otro sustrato. La adición de esos co-sustratos resultará en la producción de biomasa que cometabolizan el compuesto xenobiótico, sin la adición del co-sustrato no habrá desarrollo de biomasa activa.

2.3.9 Efecto del flujo del gas.

Bohn, 1993, reportó que altas velocidades de flujo pueden ocasionar la ruptura o el secado del material de empaque del biofiltro. De la misma forma, Barshter, 1993, observó el secamiento del soporte debido a altas velocidades del flujo gaseoso. El incremento del flujo del gas puede tener un fuerte impacto negativo en la capacidad de remoción. Un incremento en el flujo del gas sin un incremento en la concentración del contaminante equivale a un incremento en la masa de entrada con un potencial exceso en la capacidad de reacción (capacidad de eliminación) del biofiltro (Corsi y Seed, 1995).

2.3.10 Aclimatación del biofiltro.

El tiempo de aclimatación puede ser definido como el tiempo que el biofiltro tarda en entrar en estado pseudo-estacionario. El tiempo de aclimatación depende de varios factores, la complejidad del gas, las propiedades de los contaminantes específicos y las características del material de empaque. Este puede tener una duración de 1 a 3 semanas (Corsi y Seed, 1995). Este tiempo de aclimatación puede ser menor si se inoculan microorganismos

especializados en la degradación del compuesto a remover (van Groenestijn y Hesselink, 1993).

También existen algunas condiciones regulatorias celulares, tales como largas fases de retardo, diauxia y represión catabólica que no permiten una velocidad óptima de eliminación del sustrato. Las largas fases de retardo pueden ocasionar problemas en el arranque del biofiltro y si un sustrato más atractivo esta también presente la diauxia puede retardar la degradación de un compuesto pobremente degradable (Harder y Dijkhuizen, 1982).

2.3.11 Biofiltración con hongos.

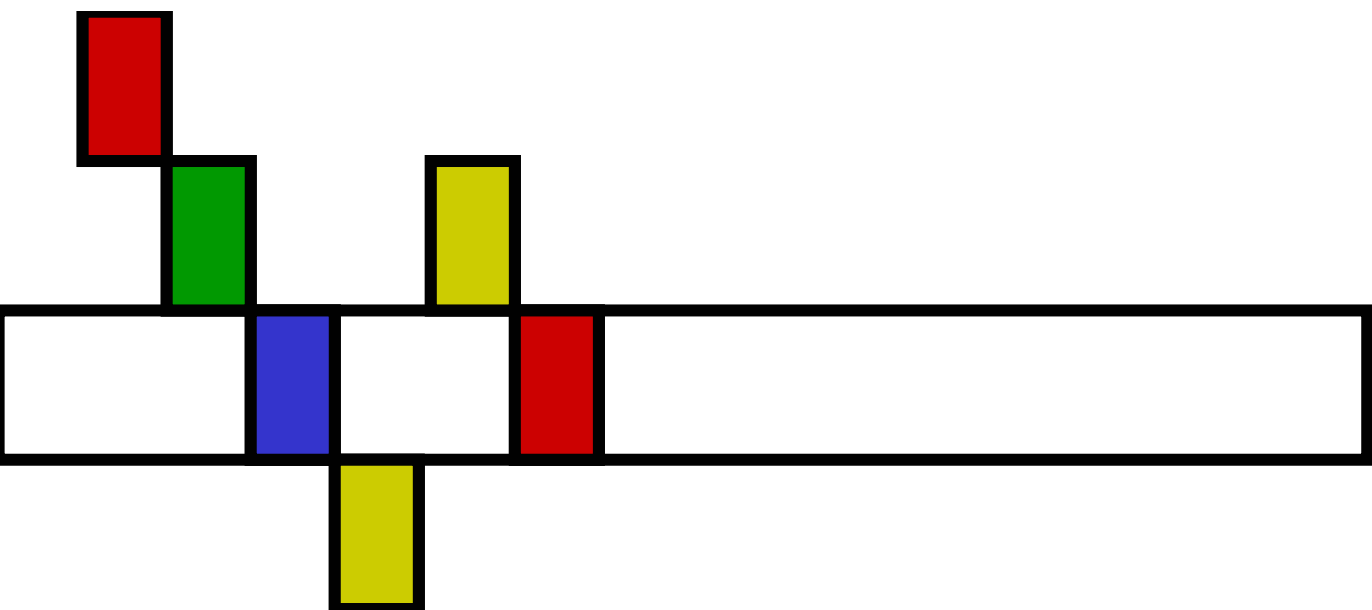
Van Groenestijn y Hesselink, 1993, realizaron un trabajo con un hongo degradador de estireno, observando una actividad degradativa alta y constante en el biofiltro, aunque la humedad relativa del aire alimentado fue tan solo del 85% y que la humidificación del empaque fue incidental. Cox y col., 1993, obtuvieron eficiencias de remoción de 100% y una capacidad de eliminación de estireno de $70 \text{ g/m}^3\text{h}$ con hongos. Posteriormente, Cox y col., 1997 reportan la operación de un biofiltro con perlita como soporte inerte, en el cual se encontraba adherida una población microbiana que contenía *Exophiala jeanselmei* como principal microorganismo degradador de estireno. El biofiltro alcanzó una capacidad de eliminación de $62 \text{ g/m}^3\text{h}$ que fue mantenida durante un año. A altas concentraciones de estireno la capacidad de eliminación se incrementó hasta $91 \text{ g/m}^3\text{h}$ mediante el incremento en la concentración de oxígeno en el gas de 20 a 40%.

Weber y Hartmans, 1996, operaron dos biofiltros usados para la eliminación de vapores de tolueno con diferentes poblaciones, encontrando que con el reactor inoculado con el cultivo bacteriano se obtiene una velocidad de remoción de tolueno igual a $30.5 \text{ g/m}^3\text{h}$, mientras que para el biofiltro fúngico se alcanzan valores de remoción mayores $49 \text{ g/m}^3\text{h}$.

Mas recientemente, Woertz y col., 1999, reportan la operación de un bioreactor fúngico que alcanzó capacidades de eliminación de tolueno máximas de hasta $285 \text{ g/m}^3\text{h}$, las cuales son

3 a 7 veces mayores que las típicas que se encuentran en sistemas de bacterianos de biofiltración. Posteriormente, Woertz y col, 2001, utilizan un bioreactor fúngico degradador de tolueno para eliminar óxido nítrico (NO) de una corriente gaseosa contaminada, logrando la remoción del 93% de 250 ppm del NO con un tiempo de residencia de 1 min cuando 90 g/m³h de tolueno fue suministrado.

En general, los sistemas de biofiltración fúngicos alcanzan consumos más altos de contaminantes comparados con los sistemas bacterianos clásicos. Asimismo este tipo de microorganismos muestra una mayor tolerancia a mayores concentraciones de compuestos tóxicos, así como una mejor adaptación a condiciones de baja humedad y diferentes pHs.



III. JUSTIFICACION



III. JUSTIFICACION.

Debido a que las actividades humanas han resultado ser altamente agresivas al medio ambiente, en los últimos años se ha visto la necesidad de crear medidas regulatorias para el control y eliminación de contaminantes en aguas, suelos y aire.

Las tecnologías biológicas de control del aire, tales como la biofiltración, han mostrado ser muy efectivas y tener ventajas sobre otro tipo de técnicas convencionales (Ottengraf y van den Oever, 1983; Corsi y Seed, 1995). Mediante esta técnica se tratan actualmente un sin número de contaminantes presentes en efluentes gaseosos de diversos tipos de industrias, especialmente en Europa y en los últimos años también en los Estados Unidos (Leson y Winer, 1991; Devanny y col., 1999).

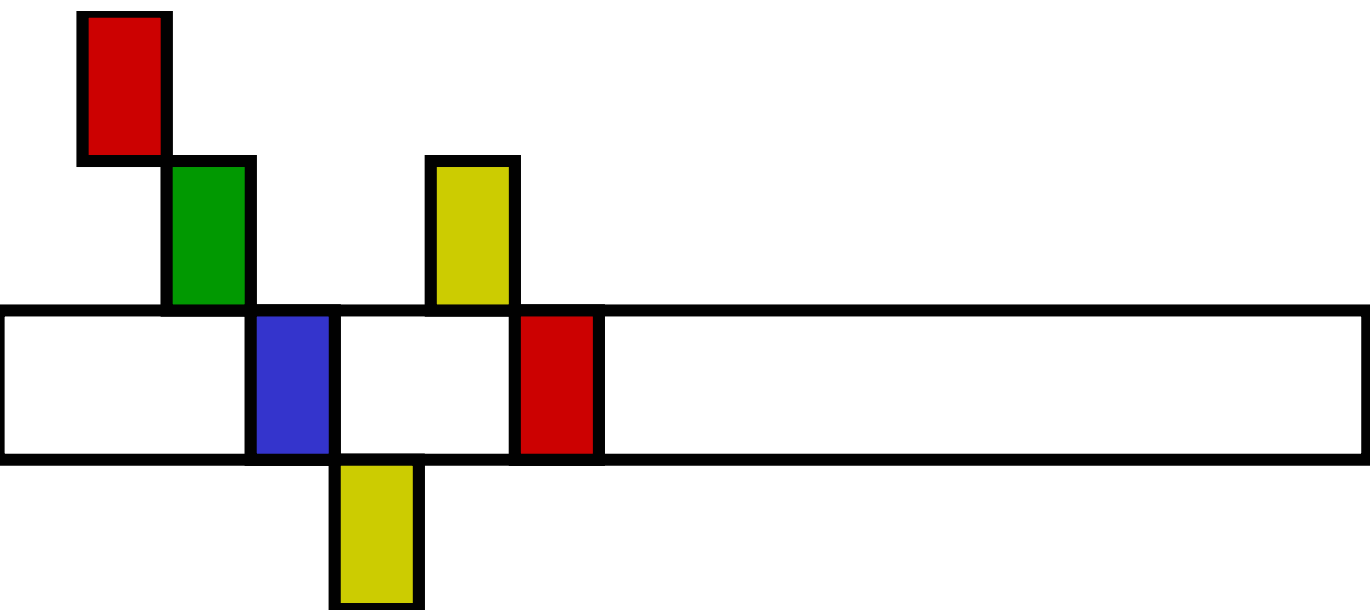
Se han realizado una gran cantidad de estudios dirigidos a establecer y mejorar las condiciones para el buen funcionamiento de los biofiltros, evaluando una serie de soportes, consorcios microbianos usados como inóculos y moléculas a degradar. De acuerdo a lo revisado en la literatura, existen algunos factores críticos que pueden afectar el buen funcionamiento del proceso de biofiltración; el secado del material de empaque, el descenso del pH observado en la degradación de algunos compuestos, la limitación de nutrientes y la baja disponibilidad de compuestos hidrofóbicos, son algunos de ellos. Se han evaluado varias posibilidades para solucionar y mejorar estos aspectos, una posibilidad que resulta muy interesante y hasta ahora poco explorada es el uso de hongos en sistemas de biofiltración.

Los hongos filamentosos se desarrollan en hábitats naturales donde, al igual que en un biofiltro, existe poca disponibilidad de agua (Michell y Lonsane, 1992). Además tienen un sistema metabólico muy versátil que los hace capaces de crecer y aprovechar una gran variedad de sustratos complejos difíciles o imposibles de degradar con otros microorganismos. van Groenestijn y Hesselink, 1993, postulan que las hifas aéreas de los hongos forman una gran área específica dentro del biofiltro lo que podría mejorar la absorción de compuestos hidrofóbicos volátiles debido a que se disminuyen los problemas

de transferencia de fase. Los hongos predominaron sobre las bacterias, en un estudio realizado en biofiltros a escala piloto, cuando se presentó un descenso en el pH (Cox y col., 1993). Aún son pocos los trabajos realizados con hongos en biofiltros, Majcherczk y col., 1990, realizaron experimentos con hongos de la pudrición blanca, mostrando que el sistema enzimático inespecífico que poseen estos microorganismos es capaz de degradar distintos tipos de compuestos aromáticos.

Los sistemas de biofiltración han sido estudiados como cajas negras y su comprensión es pobre con respecto a las interacciones dinámicas y al metabolismo de los microorganismos que conforman las poblaciones (van Groenestijn y Hesselink, 1993). La actividad biológica local y global en los biofiltros dependerá de varios aspectos, entre ellos la capacidad máxima que tenga el microorganismo o la población para degradar el contaminante y de los fenómenos limitantes que existan en el sistema, éstos pueden ser fenómenos de transferencia que dependen del área superficial, los flujos, la cantidad de sustrato, el contenido de agua, la presencia de nutrientes, etc. Los fenómenos de reacción biológica que están regidos por el número de microorganismos, el tipo, el estado fisiológico, la posición y la dinámica de las poblaciones. En los últimos años se ha ido incrementando el interés en los mecanismos metabólicos que rigen el proceso de biofiltración. El conocimiento del estado fisiológico de los microorganismos puede ofrecer una llave para el entendimiento de la regulación metabólica, es decir, la expresión de las enzimas vinculadas a las rutas metabólicas de degradación del compuesto tóxico así como la relación entre las enzimas, la actividad enzimática y su papel dentro de la ruta metabólica. Más aún, las actividades metabólicas intracelulares y los cambios en estados fisiológicos son más intensivos que los cambios en el ambiente celular que son usualmente determinados como parámetros de control del bioproceso.

Los métodos de investigación fisiológica aplicada a hongos han sido hasta ahora pobremente desarrollados (Lestan y col., 1994) por lo que se requiere mucho más trabajo en el entendimiento de mecanismos de degradación así como en la regulación fisiológica y enzimática involucrada en la mineralización de los contaminantes.



IV. OBJETIVOS



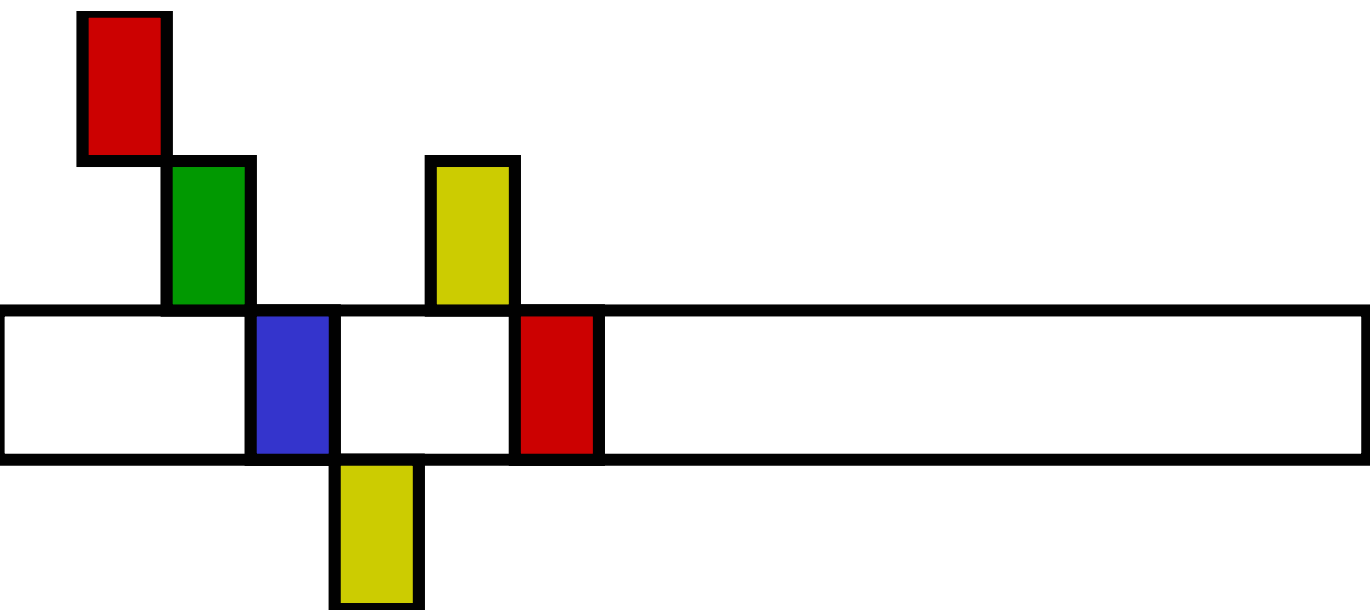
IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Evaluar la aplicación de *Scedosporium apiospermum* en procesos de biofiltración de tolueno, relacionando su capacidad degradativa en el biofiltro con su actividad enzimática.

4.2 Objetivos particulares.

- Caracterizar el crecimiento *S. apiospermum* con tolueno como única fuente de carbono y energía y determinar los parámetros que lo rigen en líquido y sólido.
- Establecer la vía metabólica de degradación de tolueno en el hongo. Evaluar los posibles intermediarios de la ruta metabólica.
- Determinar algunas de las actividades enzimáticas asociadas al consumo de tolueno en *S. apiospermum*.
- Establecer las condiciones más adecuadas para el crecimiento de *S. apiospermum* en biofiltros a menor escala (cultivo sólido) como primer paso para su aplicación en un sistema de biofiltración de mayor escala.
- Evaluar la operación de un biofiltro inoculado con *S. apiospermum*.
- Optimizar el funcionamiento del biofiltro fúngico mediante adición de agua y de nutrientes para alcanzar altos consumos de tolueno.
- Mantener las altas tasas de degradación de tolueno en el sistema fúngico de biofiltración durante largos periodos de operación.
- Relacionar y explicar el funcionamiento del sistema de biofiltración fúngico a través de la determinación de actividad enzimática.



V. MATERIALES Y METODOS



V. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Microorganismo.

Todos los experimentos del presente trabajo fueron llevados a cabo con *Scedosporium apiospermum* TB1. Esta cepa fúngica fue aislada de un biofiltro operado durante 6 meses para tratar una corriente de aire contaminada con tolueno (Auria y col., 2000).

El microorganismo fue propagado en agar papa dextrosa (PDA). La cepa fue mantenida usando la técnica de conservación de esporas en glicerol (20% v/v) a 4°C.

5.2 Suspensión de esporas.

Matraces de 250 mL con 30 mL de PDA fueron inoculados con 0.5 mL de suspensión de esporas de *Scedoposrium apiospermum* conservadas en glicerol (20%) e incubados a 30°C, durante 8 días. Posteriormente, las esporas fueron resuspendidas de los matraces utilizando 30 mL de una solución de Tween 80 (0.05% v/v) y con un agitador magnético. La suspensión de esporas fue posteriormente diluida (1/10 v/v) para colocarla en una cámara de Neubauer, obteniendo el volumen de inóculo necesario para tener una concentración constante de esporas de 2×10^7 esporas/mL ó 2×10^7 esporas/g de materia seca en el caso de fermentación sólida o biofiltración, respectivamente.

Cuentas promedio de 55 esporas por cuadro fueron obtenidas en un microscopio (American Optical, 1031), con el objetivo de 40X. Las esporas que normalmente se obtuvieron en este medio y bajo las condiciones de incubación fueron alrededor de 2.5×10^8 esporas/mL.

5.3 Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado a lo largo de este proyecto, tanto para los experimentos en medio líquido como para los de sólido y biofiltración, fue el siguiente en g/L.

NaNO ₃	18
KH ₂ PO ₄	1.95
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.57
CaSO ₄ 2H ₂ O	0.375
CaCl ₂	0.0825
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0225

Solución de Oligoelementos (g/L): $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.012; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.013; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0023, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0015; H_3BO_3 0.0015. Este medio de cultivo tiene una formulación similar al medio comercial Czapek (American Type Culture Collection, 2000). Otros medios empleados fueron: Agar nutritivo y agar papa dextrosa (PDA). Para algunos de los experimentos de medio sólido y biofiltración se incrementó la concentración de sales al doble.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15 psi de presión, durante 15 minutos.

5.4 Sistemas de cultivo

5.4.1 Crecimiento de *Scedosporium apiospermum* en medio líquido.

Para estos experimentos, 0.1 L de medio mineral (sección 5.3) fue colocado en botellas Wheaton de 0.613 L de volumen total y posteriormente estas fueron inoculadas con una suspensión de esporas para obtener una concentración final de 2×10^7 esporas/mL de medio (sección 5.2). Las botellas fueron selladas con tapas de teflón, a las cuales se les acondicionaron válvulas Mininert (VICI, Precision Sampling Inc., Baton Rouge, LA) para facilitar la inyección del tolueno (40 μL , lo cual corresponde a una concentración inicial igual a 51.5 mg/L_T) y la obtención de muestras del CO_2 producido. Las botellas se incubaron en un agitador con temperatura controlada a 150rpm y 30°C. También se evaluó el crecimiento del hongo con glucosa (1g/L) y con glucosa más tolueno

5.4.2 Crecimiento de *Scedosporium apiospermum* en biofiltros de escala laboratorio (cultivo sólido).

Columnas de vidrio de 15 cm de largo y 4 cm de diámetro (Volumen de empaque 0.25 L) fueron empacadas con 54 g de vermiculita húmeda (soporte inerte) inoculada con esporas de *S. apiospermum* (2×10^7 esp/gMS). La humedad inicial fue de 70% y se alcanzó

mezclando la vermiculita con el mismo medio mineral usado para el crecimiento del hongo en cultivo líquido.

Las columnas empacadas fueron colocadas en una cámara equipada con un dispositivo de control de temperatura a 30°C. Cada columna fue unida a un burbujeador a través del cual se hace pasar la corriente de aire con una concentración entre 5 y 15 g/m³. A su vez, cada uno de los burbujeadores se encuentra conectado a una serie de válvulas que permiten controlar un flujo de aire entre 80 y 100 mL/min en cada columna (tiempo de residencia 3.36 min). Las válvulas se encontraban colocadas en un distribuidor de aire a través del cual se inyecta aire húmedo y aire con tolueno. El sistema de cultivo sólido se presenta en la Figura 5.1.



Figura 5.1. Sistema de biofiltros escala laboratorio (FMS). 1 Humidificador; 2 Evaporador; 3 Distribuidor de aire; 4 Columnas.

5.4.3 Crecimiento de *Scedosporium apiospermum* bajo condiciones de biofiltración.

5.4.3.1 Material de soporte.

Se usó como soporte vermiculita, debido a las ventajas que mostró este soporte inerte en estudios previos (Ortiz y col., 1998) y a que los objetivos del presente estudio requerían el uso de un soporte que no ocasionara interferencias en la determinación de biomasa y de actividad enzimática. La vermiculita fue mezclada con el medio mineral descrito en la sección 5.3. En el primer experimento la concentración del medio de cultivo fue duplicada. Una mezcla de carbón activado granular y vermiculita (15:85) fue usada como material de empaque en el tercer, cuarto y quinto experimento. El material de empaque fue inoculado en todos los experimentos a una concentración de 2×10^7 esporas/g materia seca inicial. El pH y el contenido de humedad iniciales fueron de 4.5 y 70%, respectivamente.

5.4.3.2 Reactor

Los experimentos de biofiltración se realizaron en un reactor de vidrio de 1 metro de longitud por 8 cm de diámetro (Figura 5.2). El volumen empacado fue de 2.9 L.

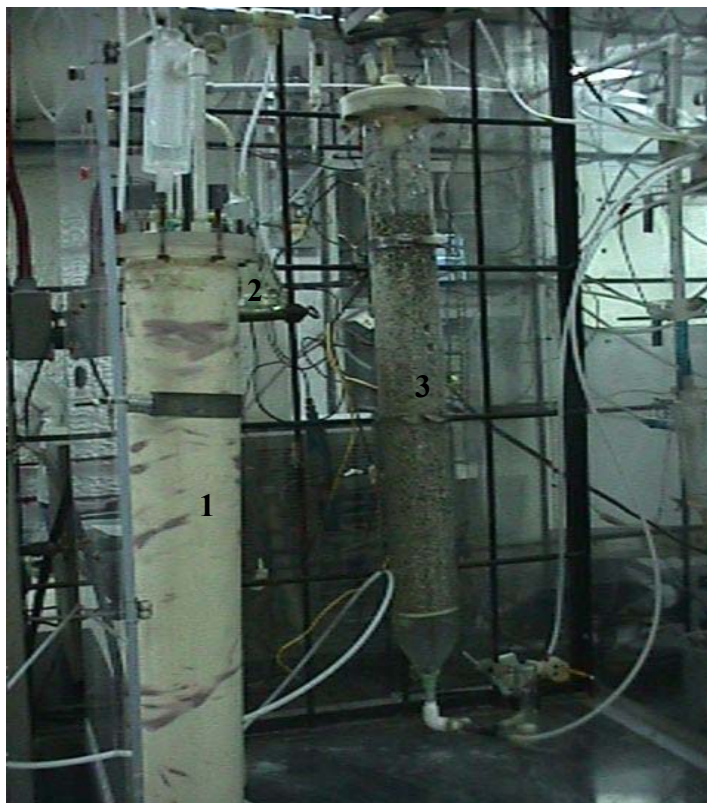


Figura 5.2 Sistema de biofiltración fúngico. 1. Humidificador, 2. Evaporador, 3. Biofiltro.

El biofiltro fue empacado con material de soporte inoculado. Aire contaminado con tolueno fue mezclado con aire saturado con agua para obtener una concentración de tolueno en la entrada de 6 g/m^3 . La corriente de aire con tolueno fue introducida por la parte superior del reactor. El flujo del aire fue establecido y regulado a 2.5 L/min usando un controlador de flujo másico (60061, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). El tiempo de residencia en el bioreactor fue de 1.15 min . En los cuatro últimos experimentos se adicionó agua o medio de cultivo mediante aspersión.

El sistema de biofiltración y los sistemas adicionales de control y monitoreo se encontraban distribuidos de la forma que se presenta en el siguiente esquema (Figura 5.3)

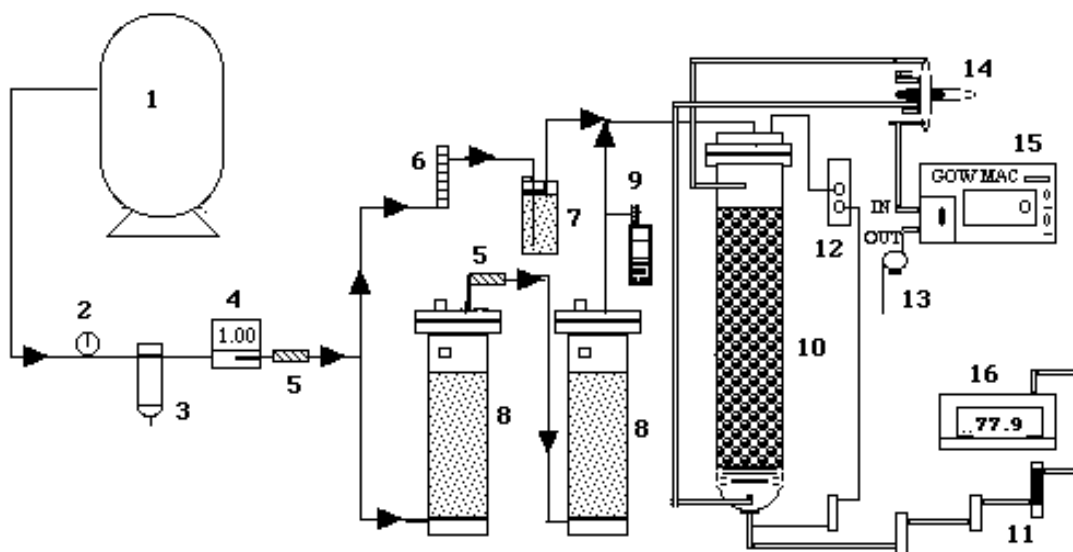


Figura 5.3. Esquema general del sistema de biofiltración. 1) Compresor, 2) Manómetro, 3) Filtro de agua y aceite, 4) Controlador de flujo másico, 5) Válvula check, 6) Rotámetro, 7) Evaporador de tolueno, 8) Humidificador 9) Sensor de Humedad, 10) Biofiltro, 11) Trampas de humedad 12) Transductor de presión, 13) Bomba de succión, 14) Válvula neumática, 15) Cromatógrafo de gases, 16) Analizador infrarrojo (CO_2).

La caída de presión fue determinada usando un transductor de presión (22370, 1E11-2, Omega Engineering Inc., Stanford, USA). Se utilizó un sistema de captura de datos en línea para seguir la evolución del flujo de aire, la temperatura, la producción de CO_2 y la caída de presión (Figura 5.4).

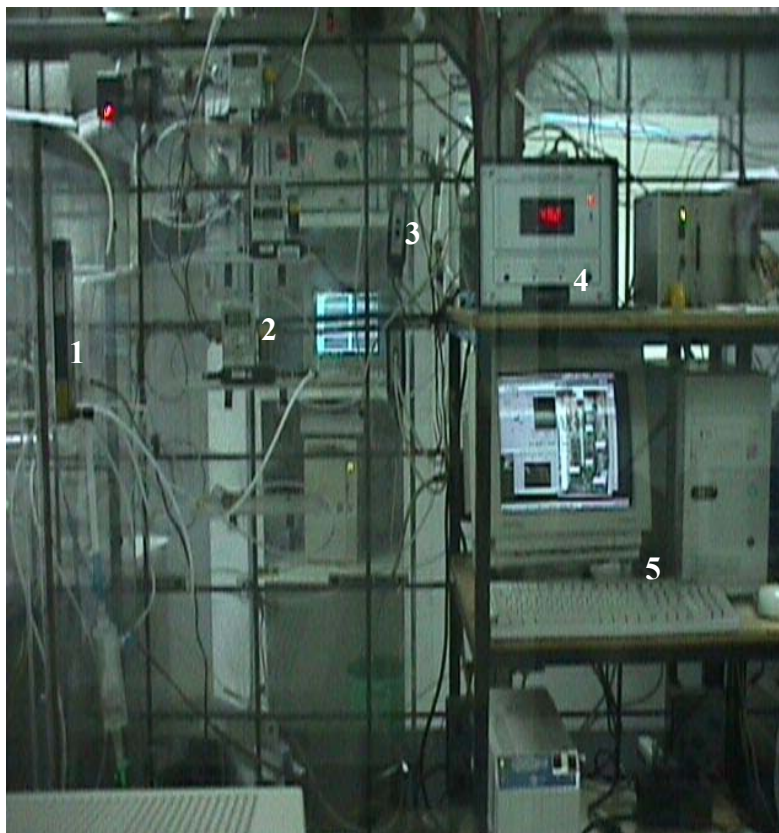


Figura 5.4. Esquema del sistema de captura y obtención de datos en línea.
1 Sistema de biofiltración. 2 Controlador de flujo másico. 3 Transtuctor de presión. 4 Detector de CO₂ infrarojo. 5 Sistema de adquisición de datos.

5.4.3.3 Definiciones

Para efectos de comparación con datos de la literatura, el consumo de tolueno en los experimentos de cultivo sólido y biofiltración se expresan como Capacidad de Eliminación (C.E.). La CE se define como sigue:

$$C.E. \text{ (g/m}^3\text{h)} = \frac{(\text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la entrada} - \text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la salida}) * \text{Flujo de aire}}{\text{Volumen del reactor}}$$

Otro término que se usará en biofiltración y que tiene que ver con el consumo del contaminante es la eficiencia, la cual esta dada por:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la entrada} - \text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la salida}}{\text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la entrada}} * 100$$

y también es importante definir la carga

$$\text{Carga (g/m}^3\text{h)} = \frac{\text{Concentración}_{\text{tolueno}} \text{ en la entrada} * \text{Flujo de aire}}{\text{Volumen del reactor}}$$

5.5 Métodos analíticos.

5.5.1 Determinación de tolueno.

La concentración de tolueno en los tres sistemas de cultivo utilizados fue determinada en un cromatógrafo de gases, equipado con un detector de ionización de flama (GowMac, Series 580, Bridgewater, NJ, USA) y una columna de acero de 1/8 de pulgadas x 16 pies de largo (Silar 10C, Grapac GC 80/100, Alltech, Beerfield, IL, USA). Las condiciones del análisis fueron las mismas reportadas por Morales y col., 1998.

En los experimentos de cultivo líquido se inyectaron muestras de 100 μL de la fase gaseosa. Para compuestos volátiles se debe tener en cuenta, tanto la concentración en fase gaseosa como la presente en la fase líquida en el sistema (Reardon y col., 2000) y estas estarán dadas por la ley de Henry. A partir de las determinaciones realizadas con muestras tomadas de la fase gaseosa (“head space”) podemos obtener la concentración en dicha fase. Conociendo la concentración en la fase gas y usando un coeficiente de partición m para el tolueno a 30 °C igual a 0.3 (Leighton y Calo, 1981), podemos determinar la concentración de tolueno en el líquido y por tanto la concentración total de tolueno en el sistema completo, según la siguiente relación:

$$m = \frac{C_g}{C_l} \quad (\text{ec. 1})$$

donde m es el coeficiente de partición, C_g y C_l son las concentraciones de tolueno (mg/L) en fase gaseosa y líquida, respectivamente.

Conociendo las concentraciones de tolueno en las 2 fases, la concentración total de tolueno en el sistema estará dada por:

$$\text{Concentración}_{\text{Experimental}} = \frac{C_g * v_g + C_l * v_l}{v_g + v_l} = \frac{\text{Concentración total}_{\text{tolueno}}}{\text{Volumen total sistema}} = \left[\frac{mg_{\text{tolueno}}}{L_T} \right] \quad (\text{ec. 2})$$

Todas las concentraciones de tolueno (**ec. 2**) presentadas en las gráficas de resultados fueron obtenidas a partir de las relaciones anteriores y serán denotadas por mg/L_T refiriéndose al volumen total del sistema. Los cálculos detallados para la determinación de la concentración total de tolueno en el sistema de cultivo líquido se presentan en el Anexo 1.1.

En las columnas (biofiltros pequeños) se tomaron muestras (100 µL) en la entrada y en la salida. Las muestras fueron analizadas utilizando el equipo de cromatografía de gases de ionización de flama y las condiciones de operación descritos en la primera parte de esta sección. Los resultados obtenidos se presentan como C.E.

La concentración de tolueno en la entrada y la salida del biofiltro fueron determinadas en muestras (250 µL) tomadas en línea a través de una válvula de 16 puertos conectada al inyector automático del cromatógrafo y el consumo de tolueno se reporta también como C.E..

5.5.2 Determinación de O₂ y CO₂

Las determinaciones de las concentraciones de O₂ y CO₂ en el sistema de cultivo en líquido y en los biofiltros pequeños se realizaron mediante cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Gow Mac serie 550 equipado con una columna concéntrica CTR1 (Alltech, USA) conectada a un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector 50°C, la del detector 50°C. Mientras que la columna se mantuvo a 30°C. El gas acarreador utilizado fue Helio, a un flujo de 60 mL/min. El volumen de muestra inyectado fue de 100 µL.

El CO₂ producido y el O₂ consumido para la oxidación de tolueno y/o de glucosa en cultivos líquidos fue determinado a partir de muestras tomadas en la fase gaseosa. Las áreas obtenidas mediante el integrador, fueron relacionadas con curvas de referencia para determinar los porcentajes de CO₂ y O₂. A partir del porcentaje se puede obtener la concentración de CO₂ en la fase gaseosa. Sin embargo, para ser consecuentes en la presentación de los resultados, la concentración de CO₂ también se expresará en concentración referida al volumen total del sistema. La concentración de CO₂ en la fase líquida se obtiene a partir de la misma relación (**ec. 1**) usada para el tolueno, con un coeficiente de partición para el CO₂ igual a 1.1977 (adimensional). De forma similar al tolueno la concentración de CO₂ estará dada por la siguiente relación:

$$\text{Concentración}_{\text{Experimental}} = \frac{C_g * v_g + C_l * v_l}{v_g + v_l} = \frac{\text{Concentración total CO}_2}{\text{Volumen total sistema}} = \left[\frac{\text{mgCO}_2}{L_T} \right] \quad (\text{ec. 3})$$

Los datos de CO₂ presentados en las gráficas de resultados fueron obtenidos tomando en cuenta la relación (**ec. 3**) y se presentan nuevamente en función al volumen total del sistema (mg/L_T). Cálculos detallados a cerca de la obtención de las concentraciones de CO₂ se presentan en el Anexo 1.2. Los balances de carbono (Anexo 1.5) también están basados en las concentraciones totales de tolueno y CO₂ obtenidas de la forma que se acaba de describir.

Por otro lado, también se debe tomar en cuenta que de acuerdo al pH en el que se encuentre el medio de cultivo, una parte del CO₂ disuelto en la fase líquida puede estar como H₂CO₃, HCO₃⁻ y como CO₃²⁻. Las concentraciones de las distintas formas de CO₂ disuelto en el líquido fueron calculadas para un valor de pH del medio igual a 8 y fueron consideradas en las concentraciones totales de CO₂ obtenidas en los diferentes experimentos en medio de cultivo líquido. Los cálculos y consideraciones para obtener estos datos se presentan en el Anexo 1.3.

Las muestras para la determinación de CO₂ en las columnas fueron tomadas usando bulbos de 500 mL, estos fueron colocados a la salida de cada columna y las muestras gaseosas

fueron inyectadas en el equipo descrito en los párrafos anteriores, bajo las mismas condiciones de análisis.

La concentración de CO₂ a la salida del biofiltro fue medida con un detector de Infrarojo (3400 Gas Analyzers, California Analytical Instruments Inc., USA), los valores reportados corresponden a la diferencia entre la concentración de CO₂ a la salida y a la entrada (ambiente).

5.5.3 Determinación de glucosa.

La glucosa fue determinada en muestras del sistema de cultivo líquido, tomadas a diferentes tiempos. El análisis de la concentración de glucosa se realizó usando un analizador enzimático de glucosa y lactato (YSI, 2300, Stat Plus).

Para ser consistentes y para efectos de comparación, las concentraciones de glucosa en el sistema se presentan en función al volumen total del sistema y no al volumen del líquido. De esta forma, la concentración de glucosa esta dada por:

$$\text{Concentración}_{\text{Experimental}} = \frac{\text{Masa}_{\text{total}}}{V_{\text{total}}} = \left[\frac{mg_{\text{glucosa}}}{L_T} \right] \quad (\text{ec. 4})$$

Los cálculos de la concentración de glucosa se detallan en el Anexo 1.4.

5.5.4 Determinación de la biomasa.

5.5.4.1 Determinación por peso seco.

La concentración de biomasa fúngica obtenida a partir de la utilización del tolueno o de la glucosa en medio líquido fue medida por peso seco.

La biomasa producida a diferentes tiempos de cultivo fue filtrada, usando un matraz kitasato de 500 mL conectado a una bomba de vacío, en membranas de 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore). Las cuales fueron previamente puestas a peso seco y pesadas.

Posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada, las membranas conteniendo la biomasa fueron colocadas en una estufa a 90°C, durante 24 horas. Después de este tiempo fueron nuevamente pesadas y la biomasa fue calculada por diferencia de peso.

5.5.4.2 Determinación a través de la proteína del micelio.

La biomasa final, tanto en experimentos de cultivo sólido como de biofiltración, fue obtenida mediante la determinación de la proteína, para lo cual un gramo de material de empaque fue mezclado con 5 mL de ácido fosfórico (0.5M). Las muestras fueron introducidas en un baño con agua hirviendo durante 7 min y posteriormente centrifugadas (5000 rpm, 15 min), como fue reportado por Córdova y col., 1996. La proteína en solución fue cuantificada usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad). La curva de calibración de proteína fue obtenida a partir del micelio de *Scedosporium apiospermum* cultivado en líquido.

5.6 Metabolismo de degradación de tolueno

5.6.1 Crecimiento de *Scedosporium apiospermum* en presencia de los intermediarios de la vía metabólica de degradación de tolueno.

Los cultivos con los diferentes intermediarios se realizaron en botellas serológicas (Figura 5.5) de 125 mL de volumen total, con 30 mL de medio de cultivo inoculados con la suspensión de esporas del (2×10^7 esp./mL). Las botellas fueron selladas con válvulas de teflón Mininert (VICI, Precision Sampling Inc., Baton Rouge, LA) y los distintos sustratos fueron inyectados (5-6 μ L), para posteriormente incubarlas en un agitador con temperatura controlada a 30°C y 150 rpm.

Durante este análisis se determinó la producción de CO₂ a diferentes tiempos de cultivo, de la forma descrita en la sección 5.5.2. El análisis se llevó a cabo por duplicado para cada uno de los sustratos.



Figura 5.5. Sistemas de crecimiento en líquido con intermediarios.
1 Botella serológica. 2 Válvulas Mininert. 3 Medio de cultivo inoculado.

La biomasa en este grupo de experimentos fue determinada por peso seco.

5.6.2 Consumo de oxígeno con los distintos intermediarios.

El equipo utilizado para estos experimentos fue un dispositivo de medición de oxígeno disuelto (YSI, modelo 52, Yellow Springs, Ohio, USA), se muestra en la Figura 5.6.



Figura 5.6. Sistema de análisis de consumo de oxígeno. 1 Botellas especiales de distintos volúmenes, 2 Electrodo tipo Clark que embona perfectamente en la boca esmerilada de las botellas. 3 Panel de control del dispositivo de medición de oxígeno disuelto (YSI 52).

Dicho equipo tiene acoplado un electrodo tipo Clark (YSI, modelo 5739) con agitador integrado y compensa automáticamente cambios de temperatura en la muestra. Los análisis de consumo de oxígeno en presencia de los diferentes intermediarios y los consumos de O₂ debido a actividad de oxigenasas, se realizaron con biomasa obtenida en cultivo líquido, crecida con tolueno.

La biomasa fue previamente filtrada, lavada con agua destilada y colocada en botellas de boca esmerilada (Figura 5.6), en las cuales embona perfectamente el electrodo. Las botellas de 60 mL fueron llenadas (volumen completo) con solución amortiguadora de fosfatos (0.05M, pH=7.0) y biomasa en suspensión. El sistema experimental fue incubado a 30°C en un baño a temperatura controlada y cada uno de los intermediarios fue adicionado inmediatamente antes de realizar la prueba. Una vez que el sustrato fue adicionado, la botella se tapó herméticamente introduciendo el electrodo, se inicio la agitación y se tomaron las lecturas de oxígeno (mg/L), cada 30 segundos, durante 20 minutos.

5.6.3 Determinación de actividades enzimáticas.

5.6.3.1 Actividad de oxigenasas.

La actividad de oxigenasas fue determinada en biomasa (entre 25 y 30 mg en cada análisis) obtenida en cultivo líquido, después de 5 días de incubación con tolueno. La biomasa fue previamente filtrada, lavada y resuspendida en solución amortiguadora de fosfatos (0.05M, pH=7.0), para posteriormente ser colocada en botellas de 60 mL a volumen completo. Las botellas fueron incubadas en un baño a 30°C, temperatura controlada, se adicionó el tolueno y se sellaron introduciendo el electrodo de determinación de O₂. Posteriormente se inicio la agitación, tomando las lecturas de oxígeno (mg/L) cada 30 segundos, durante 20 minutos. Estos análisis se realizaron con el mismo equipo de determinación de oxígeno disuelto (YSI, modelo 52, Yellow Springs, Ohio, USA) descrito en la sección 5.6.2.

Los datos de consumo de oxígeno obtenidos con diferentes concentraciones de tolueno (28.9, 58.7 y 86.7 mg/L) y sin tolueno (respiración endógena) fueron graficados contra el

tiempo. A partir de dichas gráficas se obtuvo la velocidad de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2/\text{min L}$)

Una vez que finalizó cada uno de los análisis de consumo de oxígeno, la biomasa usada fue filtrada, lavada y colocada en una estufa a 90°C , durante 24 horas. La determinación de la biomasa (peso seco), permite expresar la actividad de oxigenasa como actividad enzimática específica. Los resultados de actividad oxigenasa se presentan en $\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{micelio}}$ y los cálculos realizados para obtenerla se presentan en el Anexo 2.1.

5.6.3.2 Actividad de deshidrogenasas.

El micelio del hongo producido en cultivo líquido fue filtrado y lavado. Aproximadamente 1 g de micelio fue colocado en un mortero y molido con nitrógeno líquido. La biomasa desintegrada fue resuspendida en solución amortiguadora Tris-HCl (0.1 M, $\text{pH}=7.5$ y 0.4 mM de ditioeritrol (Sigma)) y colocada en tubos Ependorf para ser centrifugada a 14000 rpm, a 4°C , durante 10 minutos en una centrifuga con temperatura controlada (Bio-Rad). El sobrenadante (extracto enzimático) fue recuperado y conservado en hielo para ser inmediatamente utilizado en los análisis enzimáticos.

La actividad enzimática de deshidrogenasa fue medida espectrofotométricamente mediante el seguimiento de la reducción del NAD a 340 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A. La mezcla de reacción de 3 mL contenía en μL : 2700 de solución amortiguadora Tris-HCl (0.1M, pH 7.5) con MgCl_2 (5mM) y cofactor NAD ó NADP (0.4 mM); 2 de alcohol bencílico y 300 de extracto enzimático. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para reducir 1 μmol de NAD por minuto. Las actividades específicas fueron expresadas como unidades enzimáticas por mg de proteína. Los cálculos para la obtención de los valores de actividad enzimática se presentan en el Anexo 2.2.

La concentración de proteína en los extractos enzimáticos fue determinada usando el reactivo comercial de Bradford (Bio-Rad).

5.7. Población microbiana

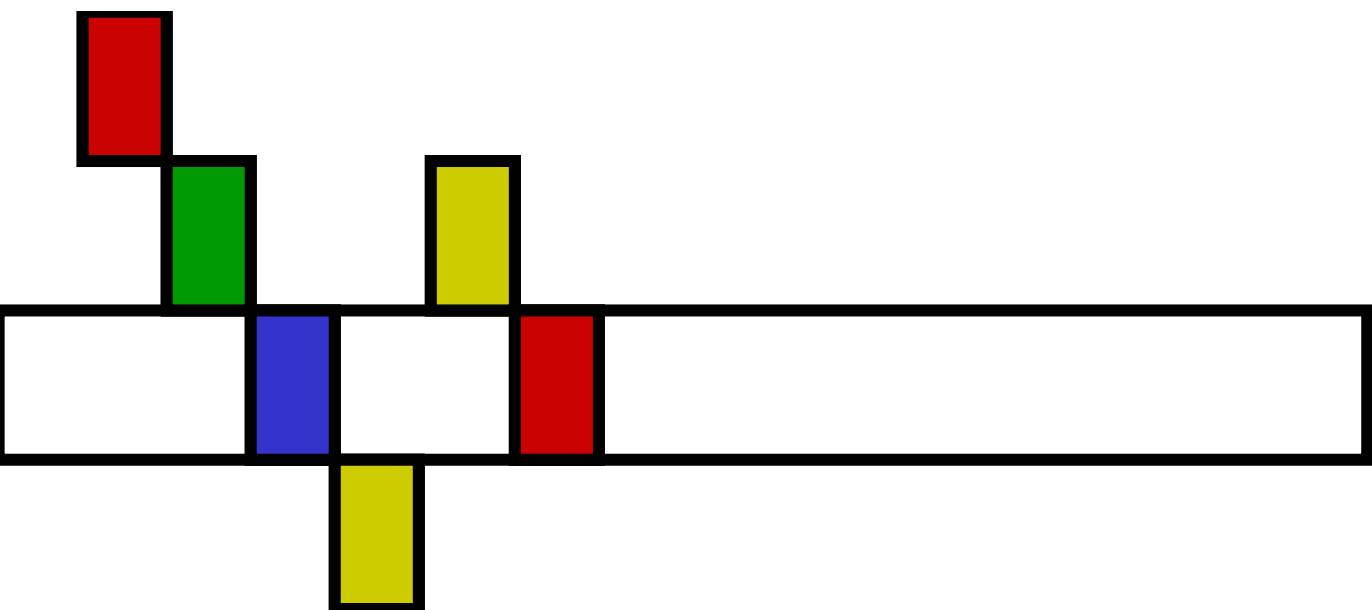
Para determinar la población microbiana presente en el biofiltro, 1 g de material de soporte fue mezclado con 10 mL de solución salina (0.9% NaCl) y homogenizado durante 15 minutos con un agitador magnético. Se preparó una serie de diluciones de la muestra homogenizada y alícuotas de 0.1 mL fueron colocadas en cajas de petri conteniendo Agar nutritivo (para aislar bacterias) y Agar papa dextrosa (para aislar colonias de hongos). El número de colonias que crecieron fueron contadas. Las cuentas microbianas fueron reportadas como ufc/g de materia seca.

Se realizaron experimentos paralelos en el sistema de cultivo sólido descrito previamente (Volumen de empaque 0.235 L; flujo de aire 0.07L/min; tiempo de residencia 3.36 min) para determinar el efecto del crecimiento de bacterias en el consumo del tolueno en el sistema fúngico. El soporte fue preparado como se menciona en las secciones anteriores y 54 g fueron empacados en los reactores. El aire contaminado con tolueno fue inyectado usando un sistema similar al del biofiltro. En este sistema se utilizaron simultáneamente hasta ocho pequeños reactores.

La población microbiana y su efecto sobre la degradación de tolueno se evaluó por duplicado, adicionando cloramfenicol al sistema para inhibir el crecimiento bacteriano se usaron controles sin antibiótico.

5.8 Microcosmos.

Se utilizaron microsistemas para evaluar las velocidades de degradación de tolueno. Los experimentos fueron realizados en botellas serológicas de 125 mL, las cuales fueron cerradas con válvulas de teflón Mininert (VICI, Precision Sampling Inc., Baton Rouge, LA). Cuatro gramos de material húmedo fueron introducidos en las botellas serológicas previamente esterilizadas. Cinco μL de tolueno líquido fue inyectado para obtener una concentración inicial de tolueno en fase gaseosa de 35 g/m^3 . El tolueno fue periódicamente medido en la fase gaseosa mediante cromatografía de gases. El modelo de Gompertz fue usado para analizar la velocidad máxima de consumo (V_{max}), tal como es descrito por Acuña y col., 1998.



VI. RESULTADOS



VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización del crecimiento de *Scedosporium apiospermum* con glucosa y con tolueno.

6.1.1 Caracterización del crecimiento de *Scedosporium apiospermum* en cultivo líquido.

En la primera etapa se evaluó, como sistema modelo, el crecimiento de *S. apiospermum* en cultivo líquido. Lo anterior permite obtener parámetros que caracterizan el crecimiento y el consumo o degradación de los sustratos, tales como la tasa específica de consumo, el rendimiento y la forma de distribución del sustrato consumido. En la Figura 6.1.1, se muestra el crecimiento característico de *S. apiospermum* en medio líquido con tolueno y con glucosa. Para efectos de comparación, los resultados de consumo de tolueno, de glucosa, la producción de CO₂ y de biomasa se presentan en concentraciones referidas al volumen total del sistema (mg/L_T).

En lo que se refiere a la degradación de glucosa, el microorganismo la consumió totalmente (163.1 mg/L_T) en un plazo de 24 horas, produciendo 76 mg/L_T de CO₂ y 80 mg/L_T de biomasa a partir de este sustrato, ver Figura 6.1.1A.

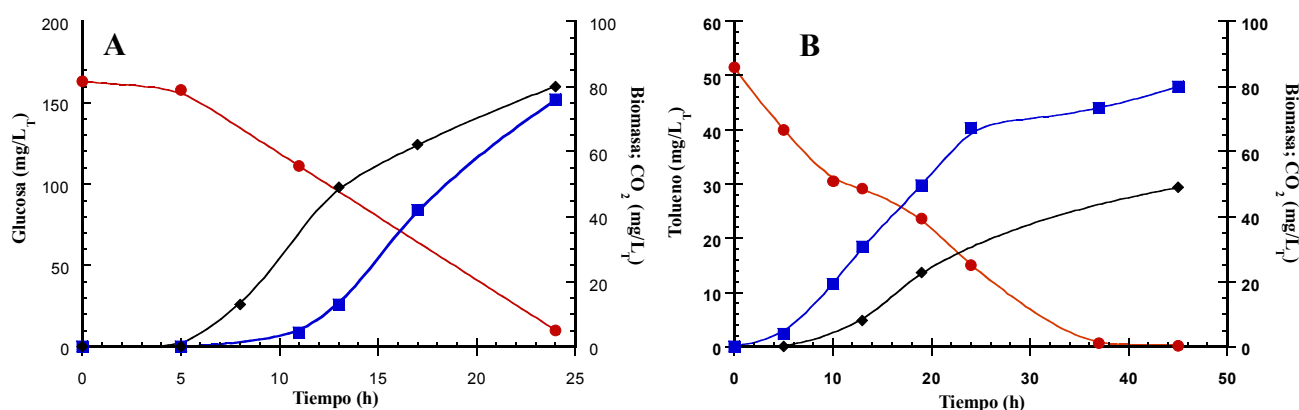


Figura 6.1.1 Crecimiento de *S. apiospermum* en cultivo líquido. A) Consumo de glucosa como única fuente de carbono (●), producción de CO₂ (■) y biomasa (◆); B) Consumo de tolueno (●), producción de CO₂ (■) y biomasa (◆). Las concentraciones se presentan en función del volumen total del sistema.

A partir de los datos experimentales se realizó un balance de carbono. La fracción de carbono inicial correspondiente a la glucosa como único sustrato (39.6 mg de C) fue recuperada como CO₂ (12.7 mg de C) y como biomasa (24.5 mg de C). De acuerdo a lo anterior, se observa que el 32% del carbono de la glucosa fue usado para producir CO₂, mientras que el 62% fue utilizado para la formación de micelio. El balance de carbono fue prácticamente cerrado ya que se recuperaron 37.2 mg de C de los 39.6 mg de C iniciales. El rendimiento de biomasa en función a la glucosa consumida ($Y_{x/s}$) fue igual a 0.5 $\text{mg}_{\text{biomasa}}/\text{mg}_{\text{glucosa}}$.

Los resultados obtenidos con tolueno como única fuente de carbono y energía se presentan en la Figura 6.1.1B. Se observa que el microorganismo inicio el consumo de tolueno a las 5 horas de cultivo y a partir de las 10 horas el consumo del compuesto aromático, la producción de CO₂ y biomasa estuvieron asociados. Los 51.5 mg/L_T de tolueno iniciales fueron consumidos en 45 horas, produciendo 80 mg/L_T de CO₂ y 49 mg/L_T de biomasa fúngica.

Los datos de crecimiento con tolueno se utilizaron para realizar el balance en base a carbono. La fracción inicial de carbono que corresponde al tolueno adicionado al sistema fue de 28.8 mg de C, 13.4 mg del carbono del tolueno fue oxidado hasta CO₂, mientras que 15 mg de carbono se usaron para la formación de biomasa, la suma de ambos corresponde a una recuperación de 28.4 mg del carbono inicial. De acuerdo a lo anterior, el 46.5% del carbono del tolueno consumido fue oxidado hasta CO₂ y el 52% fue utilizado por el microorganismo para la formación de biomasa. Finalmente, con los datos obtenidos se calculó un rendimiento $Y_{x/s}$ de 0.95 $\text{mg}_{\text{biomasa}}/\text{mg}_{\text{tolueno}}$ para tolueno.

Existen numerosos estudios a cerca de la degradación de tolueno con cepas bacterianas en cultivos líquidos, así como de los parámetros que rigen dicho consumo (Vecht y col., 1988; Chang y col., 1993; Pedersen 1996; Reardon y col., 2000). Sin embargo, aún son pocos los trabajos realizados con hongos, los resultados de Weber y col., 1995 permiten comparar lo encontrado con *S. apiospermum*. Dichos autores, crecen a *Cladosporium sphaerospermum* en cultivo líquido con tolueno como única fuente de carbono y energía, observando que

este microorganismo consume 5.2 mg de tolueno en 240 h, produciendo 9.24 mg de CO₂ y 6 mg de biomasa (peso seco). El balance de carbono, muestra que se recuperaron 53% del carbono de tolueno como CO₂, mientras que en el presente estudio se recuperó el 46.5%. Por otro lado, la tasa específica de degradación de tolueno con *C. sphaerospermum* fue de 3.6 mg_{Tol}/h g_{biom}, mientras que *S. apiospermum* consumió 31.57 mg de tolueno en 45 h y se obtuvieron 30 mg de biomasa, éstos permiten calcular una tasa específica de degradación igual a 23.4 mg_{Tol}/h g_{biom}. La tasa de consumo fue 6 veces mayor para *S. apiospermum*.

De acuerdo a los resultados anteriores se estableció que el microorganismo es capaz de utilizar la glucosa y el tolueno como únicas fuentes de carbono y energía. Por otro lado, se evaluó el uso de glucosa inicial para favorecer la germinación de las esporas y una vez que se obtenía micelio constituido se adicionó el tolueno, de esta forma se esperaba favorecer el consumo de este compuesto una vez que se contaba con biomasa inicial. Sin embargo, quedaba la duda en cuanto a la posible represión del sistema enzimático responsable de la degradación de tolueno al estar presente la glucosa, ya que se ha reportado que la presencia de glucosa no permite la inducción de enzimas, tales como la tolueno 2 y 4 mono-oxigenasas de *Psuedomonas putida* F1 (Sun y Wood, 1997). Para estas pruebas se usó 1 g/L de glucosa (equivalente a 161.4 mg/L_T), la cual según se demostró en los primeros experimentos era consumida por *S. apiospermum* en 24 horas, una vez que esta fuente de carbono fue consumida se inició la adición de tolueno en el sistema de cultivo líquido.

En la Figura 6.1.2 se presenta el consumo de la glucosa inicial (161.4 mg/L_T), la producción de CO₂ a partir de la misma, el consumo de tolueno y la producción de CO₂ debida al consumo de este segundo sustrato. Al igual que en el primer experimento, la glucosa (161.4 mg/L_T) fue consumida durante las primeras 24 horas produciéndose 92.5 mg/L_T de CO₂ y 81.6 mg/L_T de biomasa. Una vez que la glucosa fue consumida (24 horas), se adicionó tolueno 51.5 mg/L_T, la degradación del compuesto aromático se inició rápidamente después de 4 horas tal como se puede observar en la Figura 6.1.2. El tolueno fue completamente utilizado en las siguientes 24 horas de cultivo y la degradación del mismo estuvo correlacionada con la producción de CO₂. Después de este tiempo se obtuvieron 70.4 mg/L_T de CO₂ y 43.7 mg/L_T de biomasa y la tasa específica de degradación de tolueno en este experimento fue de 48.7 mg_{Tol}/h g_{biom}.

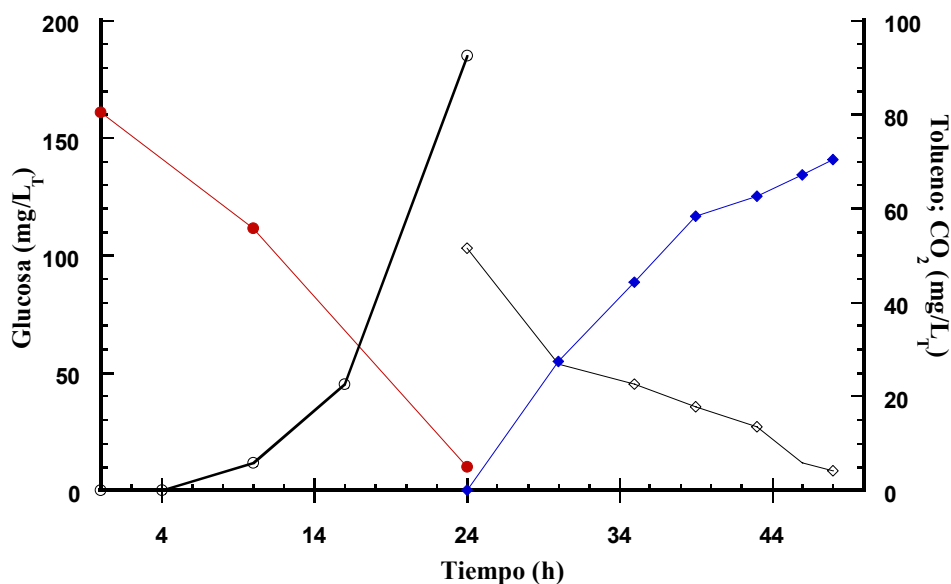


Figura 6.1.2 Consumo de glucosa inicial (●), consumo de tolueno (◇) y producción de CO₂ con glucosa (○) y con tolueno (◆), obtenidos con *S. apiospermum* en cultivo líquido.

Los cálculos de recuperación de carbono tanto de la glucosa como del tolueno y los rendimientos de *S. apiospermum* para ambos sustratos se presentan en la Tabla 6.1. Estos datos nos permiten comparar la eficiencia de nuestra cepa fúngica con las reportadas para otros microorganismos, especialmente bacterias que son microorganismos que poseen la capacidad de degradar tolueno y han sido ampliamente estudiados.

Tabla 6.1 Comparación de las fracciones de carbono recuperadas y rendimientos en *S. apiospermum* con glucosa o tolueno en cultivo líquido

Sustrato	Cantidad inicial sustrato (mg)	Fracción de C inicial (mg)	Fracción de C CO ₂ (mg)	Fracción de C biomasa (mg)	Porcentaje de C recuperado como CO ₂	Porcentaje de C recuperado como biomasa	Y _{x/s} (mg _{bio} /mg _{sust.})
Glucosa	98.9	40	15.5	25	39	62	0.50
Tolueno	31.6	29	11.8	13.4	41	46	0.85

En la Tabla 6.1 se puede observar que la distribución de carbono consumido a partir de la glucosa fue similar a la encontrada en el primer experimento. Sin embargo, en el caso del tolueno, la recuperación del carbono fue ligeramente diferente a la obtenida en el primer experimento, determinando una menor cantidad de biomasa final. Lo cual repercutió en el rendimiento de biomasa en función a sustrato, 0.85 mg_{biomasa}/mg_{tolueno} cuando el hongo fue

crecido con glucosa inicial comparado con el 0.95 mg_{biomasa}/mg_{tolueno} obtenido al crecerlo con tolueno como único sustrato.

Los rendimientos de biomasa (Y_{x/s}) determinados con *S. apiospermum* en presencia de glucosa y tolueno se comparan con los reportados para otros microorganismos en la siguiente tabla.

Tabla 6.2 Comparación de rendimientos de glucosa y tolueno en diferentes microorganismos

Microorganismo	Sustrato	Y _{x/s} (mg _{biomasa} /mg _{sustrato})	Referencia
<i>P. chrysogenum</i> (1)	Glucosa	0.43	Pirt y Callow, 1960
<i>Candida utilis</i> (1)	Glucosa	0.51	Johson, 1967 ^a
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC33015 (2)	Tolueno	1.05	Vecht y col., 1988
<i>P. fragi</i> (2)	Tolueno	1.22±0.1	Chang y col., 1993
<i>P. fluorescens</i> (2)	Tolueno	0.99±0.25	Chang y col., 1993
<i>P. putida</i> O1 (2)	Tolueno	0.64	Oh y col., 1994
<i>P. putida</i> F1 (2)	Tolueno	1.28±0.13	Reardon y col., 1995
<i>P. putida</i> 54G (2)	Tolueno	0.9±0.13	Mirpuri y col., 1997
<i>C. sphaerospermum</i> (3)	Tolueno	1.15 [*]	Weber y col., 1995

Fuente: (1) Pirt, 1975; (2) Pedersen 1996 (Tesis de doctorado); Weber y col., 1995 ^{*} calculado a partir de datos proporcionados por los autores.

El rendimiento Y_{x/s} de *S. apiospermum* con glucosa (0.5 mg_{biomasa}/mg_{glucosa}) fue mayor al encontrado para *Penicillium chrysogenum* y similar al reportado para *Candida utilis* en presencia de este sustrato. En cuanto a dicho rendimiento con tolueno, éste fue similar al de *P. putida* G54, mayor al de *P. putida* O1 y menor a los reportados para el resto de cepas de *Pseudomonas* y para *Cladosporium sphaerospermum*. El hecho de que el rendimiento de biomasa obtenido para *S. apiospermum* sea menor no resulta desventajoso para el proceso de biofiltración, ya que en varios estudios se ha establecido que una excesiva cantidad de biomasa puede causar taponamiento del reactor y como consecuencia la pérdida de la

capacidad de eliminación del contaminante (Weber y Hartmans, 1996; Song y Kinney, 2000).

A partir del experimento con glucosa inicial (Figura 6.1.2), se puede concluir que la presencia de ésta no impide la inducción del sistema enzimático responsable de la degradación de tolueno en el microorganismo, tal como ha sido reportado para algunas cepas de *Pseudomonas* para las cuales la actividad de la tolueno mono-oxigenasa es completamente inducible por la presencia de tolueno y se reprime con glucosa. Por otro lado, esta última favoreció la germinación de las esporas permitiendo la constitución de cierta cantidad de biomasa, lo cual inició rápidamente el consumo de tolueno en 4 horas, reduciendo la fase de retardo. La glucosa también disminuyó el tiempo en el cual la misma cantidad de tolueno fue eliminada por completo, ya que el tolueno fue consumido en 24 horas usando glucosa inicial, mientras que cuando usó este sustrato como única fuente de carbono y energía, la degradación se llevó a cabo en 45 horas. Esto último se muestra en la Figura 6.1.3 donde se observan las velocidades de degradación de tolueno obtenidas con *S. apiospermum* usando tolueno como única fuente de carbono y glucosa como sustrato inicial.

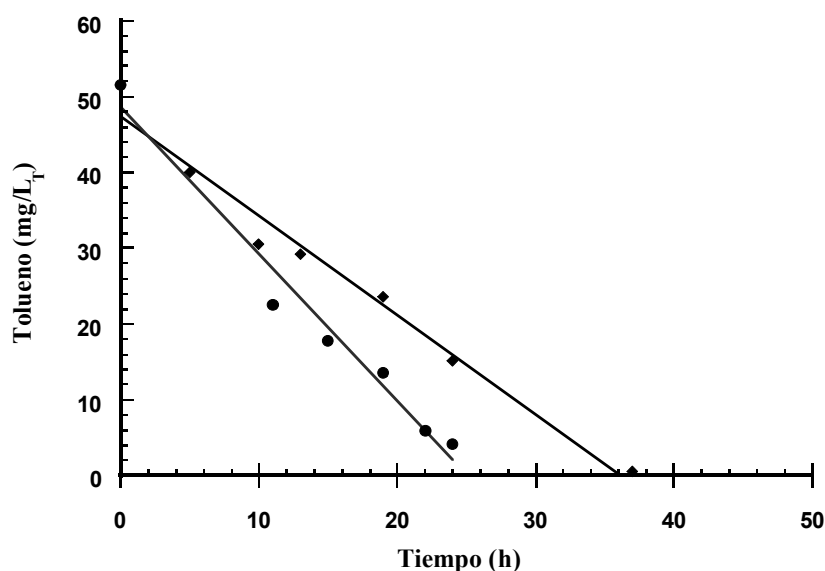


Figura 6.1.3 Consumo de tolueno obtenido con *S. apiospermum* al usar glucosa como sustrato inicial y posteriormente tolueno (●) y al usar tolueno como única fuente de carbono (◆) en cultivo líquido.

La velocidad de consumo del compuesto aromático fue mayor al usar glucosa como sustrato inicial (1.93 mg/h L_T), comparada con la determinada cuando el tolueno fue la única fuente de carbono y energía (1.31 mg/h L_T), tal como se puede observar en la Figura 6.1.3

A nivel de los experimentos de biofiltración se espera que la presencia de glucosa inicial favorezca la germinación de las esporas del hongo, lo cual implica una rápida colonización del reactor que asegura que la población fúngica sea la predominante, reduciendo el tiempo de arranque y/o adaptación mejorando el funcionamiento general del sistema de biofiltración y no tendrá un efecto negativo sobre la inducción de la actividad del sistema enzimático responsable de la degradación de tolueno.

Posteriormente, se determinó la velocidad de consumo de tolueno en diferentes etapas del cultivo líquido realizando adiciones sucesivas de este compuesto, los resultados se muestran en la Figura 6.1.4.

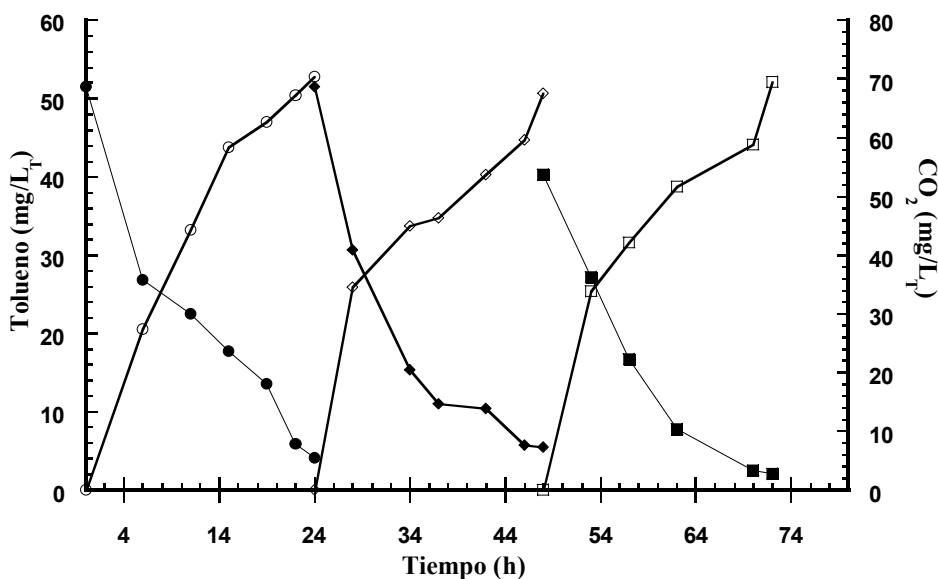


Figura 6.1.4 Consumo de tolueno y producción de CO₂ en tres adiciones sucesivas de tolueno en cultivo líquido de *S. apiospermum*. Consumo de tolueno (●) y producción de CO₂ (○) durante la primera adición; consumo de tolueno (◆) y producción de CO₂ (◇) segunda adición y consumo de tolueno (■) y producción de CO₂ (□) tercera adición.

La cantidad de tolueno (51.5 mg/L_T) agregada en cada una de las tres adiciones sucesivas fue consumida en 24 horas y la producción de CO_2 estuvo asociada a la oxidación del compuesto, tal como se puede observar en la Figura 6.1.4. La velocidad de consumo del tolueno en las diferentes adiciones fue calculada mediante la obtención de la pendiente de la curva de consumo. La velocidad de consumo de tolueno fue de 1.93 mg/h L_T en la primera adición, para posteriormente incrementarse hasta 2.27 mg/h L_T durante la segunda adición y en la tercera adición la velocidad fue de 2.34 mg/h L_T de tolueno. Esta última corresponde a una tasa específica de consumo de tolueno igual a $18.7 \text{ mg}_{\text{Tol}}/\text{h g}_{\text{biom}}$ calculada a partir de la biomasa final. Las velocidades de consumo de tolueno permiten obtener un valor de capacidad de eliminación aproximado, que se podría alcanzar en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum*. Este cálculo se realizó usando el mismo procedimiento reportado por Acuña y col., 1998, relacionando la velocidad al flujo de aire y el volumen del reactor. De esta forma, dada la velocidad de consumo de tolueno determinada durante estos experimentos se puede obtener una capacidad de eliminación de $120 \text{ g/m}^3\text{h}$ en el biofiltro, lo cual hace muy interesante el uso potencial de este microorganismo en biofiltros. Las capacidades de eliminación reportadas para biofiltros bacterianos se encuentran en rangos, entre 30 y $80 \text{ g/m}^3\text{h}$ (Severin y col., 1993; Morales y col., 1994; Medina y col., 1995).

6.1.2 Caracterización del crecimiento de *Scedosporium apiospermum* con tolueno en biofiltros a escala laboratorio.

En la siguiente etapa se realizaron experimentos con el objeto de crecer al hongo en biofiltros a menor escala (cultivo sólido), como primer paso para establecer las condiciones en un sistema fúngico de biofiltración de tolueno. De esta forma, el primer experimento estuvo dirigido a determinar si el hongo es capaz de crecer en este tipo de sistema, así como de degradar tolueno y caracterizar el crecimiento bajo las nuevas condiciones. Se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa inicial encontrando que la concentración más adecuada es 10 g/L . En este experimento se creció al hongo usando dicha concentración y una vez que el microorganismo la consumió, se inició la alimentación de tolueno a través del aire de entrada a una concentración igual a 6 g/m^3 , lo cual equivale a una carga en un rango entre 120 a $160 \text{ g/m}^3\text{h}$, este rango se debe a variaciones en el flujo de aire entre 80 y

100 mL/min. Los experimentos en los biofiltros pequeños se realizaron en el sistema descrito en la sección 5.4.2 de materiales y métodos. El consumo de tolueno se expresa en términos de la capacidad de eliminación C.E., (definida en la sección 5.4.3.3 de materiales y métodos).

Los resultados obtenidos usando este sistema se presentan en la Figura 6.2.1, *S. apiospermum* utilizó la glucosa durante las primeras 24 horas y a las 37 horas se inició la alimentación de tolueno. Este sustrato se empezó a consumir durante el segundo día de cultivo obteniendo una C.E. igual a 50 g/m³h, la cual se fue incrementando hasta alcanzar un valor de 100 g/m³h durante el cuarto día. Posteriormente la C.E. siguió aumentando hasta 150 g/m³h después del décimo día de cultivo. La producción de CO₂ estuvo correlacionada con el consumo del sustrato. En la Figura 6.2.1 se puede observar un pico de producción de CO₂ en las primeras horas de cultivo que corresponde al CO₂ producido a partir de la glucosa.

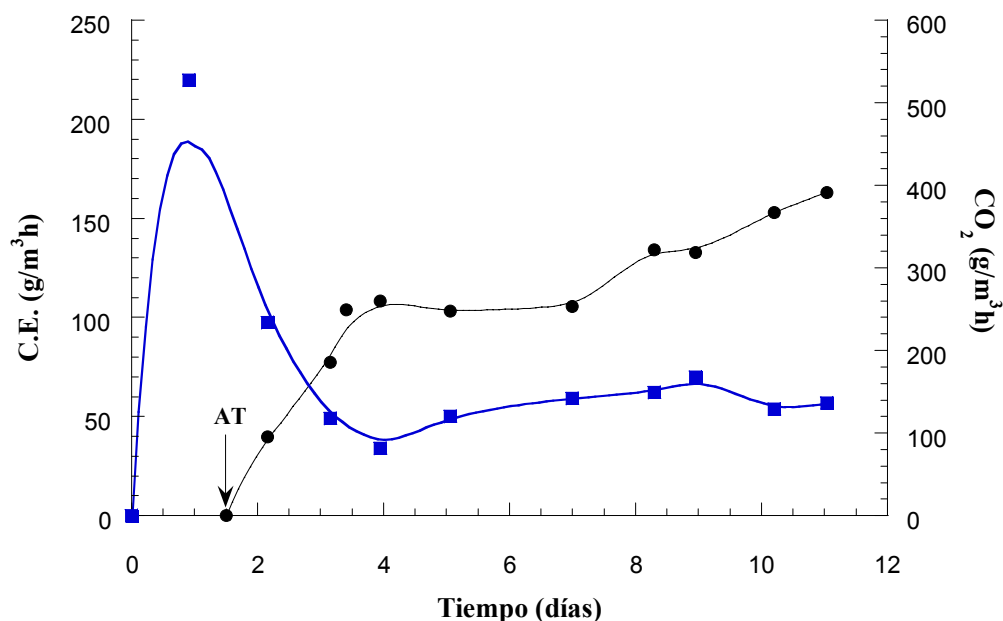


Figura 6.2.1 Evolución de la capacidad de eliminación (●) y de la producción de CO₂ (■), de *S. apiospermum* en cultivo sólido con 10g/L de glucosa inicial. AT inicio de la alimentación de tolueno a través de la fase gaseosa.

Durante este experimento se consumieron 24.9 kg de tolueno /m³_{reactor} y se produjeron 46.3 kg de CO₂/m³_{reactor}, lo cual indica que el 55.6% del tolueno consumido fue recuperado

como CO₂. Asimismo, se obtuvieron 23.6 mg/gMS de biomasa ($2 \text{ kg}_{\text{biomasa}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}$), lo que equivale a un 14% del tolueno consumido.

Por otro lado, las pérdidas de humedad del sistema fueron mínimas, puesto que el proceso fue iniciado con 70% de humedad y el porcentaje final de humedad 65%, lo cual permitió que el microorganismo se encuentre bajo condiciones adecuadas para su crecimiento y actividad metabólica. Otros de los factores que permitieron un buen desarrollo y una alta actividad degradativa del hongo fueron: que bajo las condiciones de cultivo sólido el crecimiento de los hongos se ve favorecido, debido a que estas condiciones se asemejan a las de sus medios naturales (Mitchell y Lonsane, 1992) y que el tipo de crecimiento micelial permite crear una importante área superficial que facilita la disposición del compuesto contaminante volátil y por tanto su degradación (Devinny y col., 1999).

Existen reportes a cerca de que bajo las condiciones de cultivo sólido se puede incrementar la concentración de sustratos sin afectar a los microorganismos (Solis-Pereira y col., 1996). Se realizó un segundo experimento en cultivo sólido en el cual se incrementó la concentración inicial de glucosa a 20 g/L y de tolueno en la corriente gaseosa a 15 g/m³, con el fin de determinar concentraciones mayores de glucosa y/o tolueno que soporta el hongo. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 6.2.2, el consumo de tolueno se inició durante el tercer día de cultivo, alcanzando una C.E. de 200 g/m³h durante el sexto día y ésta se incrementó hasta 250 g/m³h el día 7, manteniéndose en este valor durante cuatro días. La producción de CO₂ a partir del consumo de tolueno se inició simultáneamente al consumo de este sustrato alcanzando valores de 350 g/m³h.

La determinación del tolueno consumido, del CO₂ y de la biomasa producidos nos permiten realizar el balance de carbono recuperado. Durante todo el proceso de operación se consumieron 33.1 kg de tolueno /m³_{reactor}, obteniendo 57.5 kg de CO₂ /m³_{reactor} y 33 mg de biomasa /gMS ($3 \text{ kg}_{\text{biomasa}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}$). Es decir se recuperó el 52% del tolueno consumido como CO₂ y el 9% como biomasa.

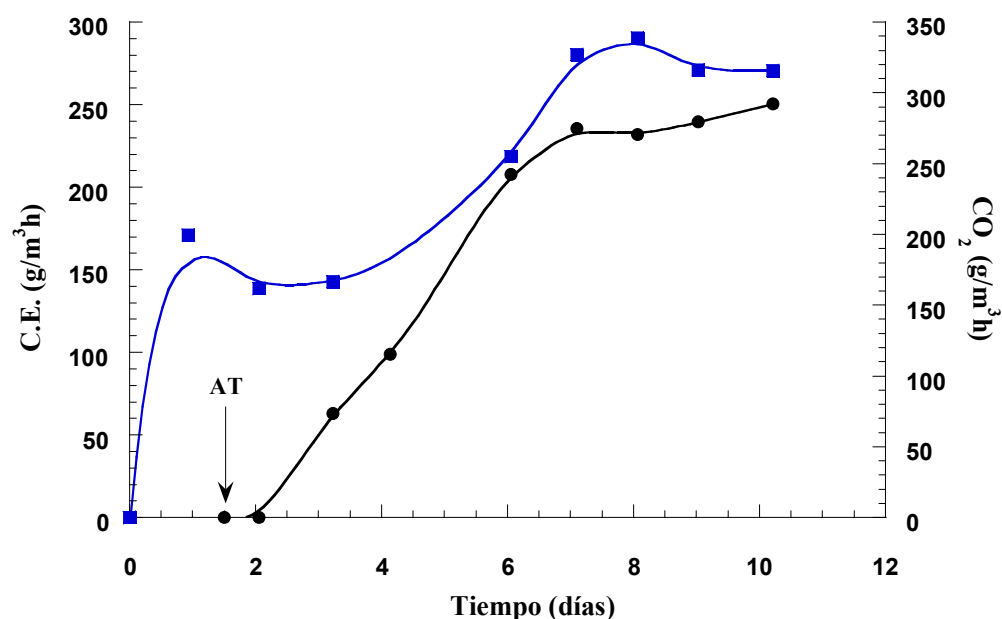


Figura 6.2.2 Evolución de la capacidad de eliminación (●) y de la producción de CO₂ (■) obtenidos con *S. apiospermum*. Efecto de la mayor concentración de glucosa (20g/L) y tolueno (15 g/m³).

La recuperación del CO₂ producido a partir de la glucosa inicial fue menor que la obtenida durante el primer experimento, probablemente debido a que al existir altas concentraciones de tolueno el microorganismo los usa para la formación de materiales de reserva. Bajo estas nuevas condiciones se alcanzaron capacidades de eliminación muy altas de hasta 300 g/m³h, casi el doble que lo obtenido en el experimento anterior. Este incremento pudo deberse a una mayor cantidad de biomasa inicial producida al aumentar la concentración de glucosa, es decir a mayor biomasa mayor actividad metabólica o bien, una mayor concentración del sustrato volátil (tolueno) promueve una mayor actividad enzimática y metabólica. Los resultados mostraron que la biomasa fue mayor (33 mg/gMS) a la obtenida en el primer experimento, sin embargo los experimentos realizados hasta el momento no nos permiten concluir que el incremento en la C.E. se debió a la mayor cantidad de biomasa o a que las altas concentraciones de tolueno promovieron una mayor actividad enzimática.

Durante los experimentos en el sistema de cultivo sólido se obtuvieron altas C.E. que hacen que el uso de este hongo sea de interés para evaluarlo bajo condiciones de biofiltración. Las C.E. obtenidas con *S. apiospermum* fueron entre 5 y 8 veces mayores que las reportadas en

la literatura para sistemas bacterianos de biofiltración de tolueno, las cuales se encuentran en un rango entre 30-80 g/m³h (Severin y col., 1993; Morales y col., 1994; Medina y col., 1995). La alta eficiencia que mostró este microorganismo para degradar tolueno hace que resulte interesante estudiar el sistema enzimático presente en el hongo, tratando de explicar a través del estudio metabólico la capacidad de degradar tolueno. Existen pocos estudios a cerca de los sistemas metabólicos de degradación presentes en hongos a diferencia del amplio conocimiento que se tiene de estos sistemas en bacterias, sobretodo del género de *Pseudomonas*. De esta forma, en la siguiente parte del presente trabajo se realizaron experimentos dirigidos a elucidar la posible ruta o rutas metabólicas presentes en *S. apiospermum*, así como a determinar las actividades enzimáticas vinculadas a dichas rutas de degradación de tolueno, que según reportan otros autores para bacterias son principalmente oxigenasas y deshidrogenasas.

6.1.3 Metabolismo fúngico vinculado a la degradación de tolueno. Evaluación de la posible ruta de degradación de tolueno en *Scedosporium apiospermum*.

La segunda etapa del presente trabajo consistió en el estudio del metabolismo de *S. apiospermum* para la degradación de tolueno. Son dos los objetivos principales que se persiguieron durante el análisis experimental de la secuencia metabólica de degradación del tolueno: El primero consistió en la identificación de la posible ruta bioquímica. El segundo objetivo fue la de identificación de algunas de las enzimas vinculadas a la misma. La elucidación experimental de una ruta metabólica se aborda mediante una sucesión de métodos que comienza con el microorganismo intacto. El comienzo y el final de algunas rutas metabólicas principales ha sido identificado a partir del estudio de los balances metabólicos de entrada y salida con el microorganismo completo (Lehninger, 1995). La cuantificación del CO₂ como producto final de la oxidación de distintos sustratos permite realizar dichos balances.

De manera similar a lo reportado por Weber y col., 1995, en el presente trabajo se realizaron los siguientes experimentos:

- Crecimiento y producción de CO₂ de *S. apiospermum* en microcosmos, usando los intermediarios de la vía de degradación que implica el ataque inicial al grupo metilo; alcohol bencílico, benzaldehído, benzoato y catecol (ruta 1, Figura 1.1, pag. 11). Y los intermediarios de la vía de degradación que implica el ataque al anillo aromático; o-cresol, m-cresol, p-cresol y protocatecuato (Figura 1.1, pag. 11), como fuentes de carbono y energía.
- Evaluación del consumo de oxígeno con biomasa de dicho microorganismo fúngico, crecido inicialmente en tolueno (en líquido y en sólido), con los distintos intermediarios. Estos experimentos se llevaron a cabo con “células en reposo” (análisis llevados a cabo en solución amortiguadora, donde se considera que no habrá crecimiento del microorganismo).

Paralelamente se establecieron las técnicas para determinar las actividades enzimáticas que estuvieran vinculadas a la vía metabólica de degradación del compuesto aromático. Así, se presentarán en primer lugar los resultados de producción de CO₂ y biomasa con los diferentes intermediarios y en segundo lugar los resultados obtenidos en los experimentos de consumo de oxígeno con dichos intermediarios. Finalmente, en la siguiente sección se presentarán y discutirán los experimentos realizados en cuanto a las actividades enzimáticas vinculadas a la ruta de degradación de tolueno.

6.1.3.1 Crecimiento y producción de CO₂ con los intermediarios de las diferentes rutas metabólicas de degradación de tolueno, como única fuente de carbono y energía

En la primera parte de la segunda etapa se evaluó el crecimiento y la producción de CO₂ de *S. apiospermum* en presencia de los diferentes intermediarios como única fuente de carbono y energía. El crecimiento del hongo con dichos intermediarios sugiere que el microorganismo posee la maquinaria metabólica necesaria para reconocer y utilizar los compuestos que están involucrados en la degradación de tolueno. Reportes acerca del metabolismo fúngico señalan que la ruta de degradación de tolueno en estos microorganismos consiste en el ataque inicial al grupo metilo (Weber y col., 1995; Prenafeta-Boldú y col., 2001), por lo cual, se evaluaron inicialmente los intermediarios identificados para dicha ruta y posteriormente se realizaron pruebas con los intermediarios involucrados en las otras vías metabólicas, en las que el ataque biológico se da directamente en el anillo aromático para obtener dihidroxi-dioles (cresoles).

Los experimentos fueron realizados en microcosmos donde se inyectaron los intermediarios y se determinó la evolución de la producción de CO₂ y la biomasa final. En la Figura 6.3.1A, se muestra la producción de CO₂ a partir de los intermediarios de la vía que implica el ataque inicial del grupo metilo. El microorganismo creció con todos los intermediarios evaluados después de una fase de retardo de aproximadamente 10 horas. Las producciones máximas de CO₂ fueron mayores con alcohol bencílico, benzaldehído y catecol (13.1, 14.9, 16.6 mg CO₂), respectivamente. Mientras que las producciones máximas fueron menores con el tolueno y el benzoato (11.3 y 4.8 mg CO₂), esto pudo deberse a que el tolueno

presenta algunos problemas de transferencia en la fase líquida y a que el benzoato tiene algunos efectos de inhibición de crecimiento fúngico.

En la Figura 6.3.1B se presenta la producción de CO_2 a partir de la utilización de m, o y p cresoles, los cuales constituyen los intermediarios de las vías metabólicas que implican el ataque al anillo aromático para obtener como resultado dihidroxialcoholes y el protococatecuato. En general, las producciones máximas de CO_2 con estos intermediarios fueron menores que las obtenidas con el primer grupo de intermediarios. La producción máxima de CO_2 con m, p-cresol y protococatecuato (12.7, 11.5, 12.0 mg CO_2) fueron similares a la obtenida con tolueno (11.3 mg), ver Tabla 6.3.1, mientras que con el o-cresol la producción de CO_2 fue la menor (4.1 mg).

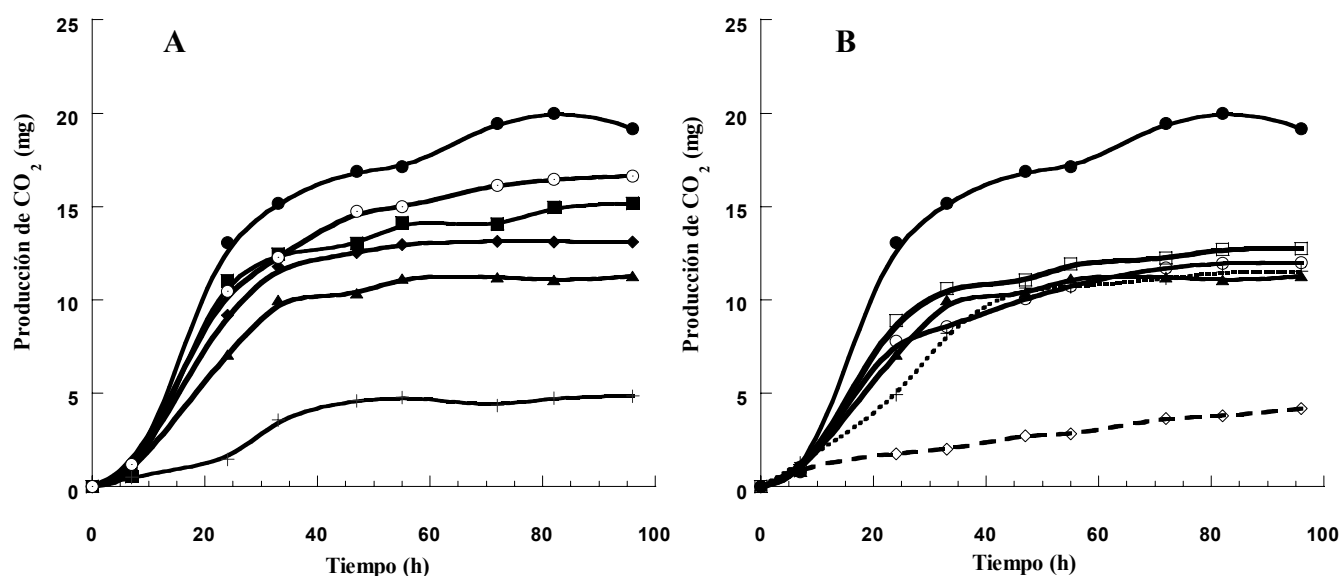


Figura 6.3.1 Producción de CO_2 a partir de los diferentes intermediarios de las rutas metabólicas de degradación de tolueno (con una masa inicial de sustrato de alrededor de 5 mg). Glucosa (●) y tolueno (▲) como control. A) Intermediarios de la vía de degradación que implica el ataque inicial del grupo metilo; Alcohol bencílico (◆), benzaldehído (■), benzoato (+), catecol (⊙); B) Intermediarios de la vía de degradación que implica el ataque al anillo aromático; o-cresol (◇), m-cresol (□), p-cresol (+), protococatecuato (○).

En este grupo de experimentos también se determinaron las biomásas finales obtenidas con los distintos intermediarios después de 4 días de cultivo, éstas se presentan en la Tabla 6.3.1. La mayor cantidad de biomasa se determinó al crecer al microorganismo con glucosa. En cuanto al primer grupo de intermediarios se obtuvieron 5.2 mg de biomasa con tolueno y los valores de biomasa fueron similares con alcohol bencílico y benzaldehído,

alrededor de 3 mg., mientras que con benzoato se produjeron solamente 2.4 mg (Tabla 6.3.1).

Tabla 6.3.1. Producción de CO₂, biomasa finales y fracciones de carbono correspondiente a cada una de ellas, en presencia de los intermediarios de las diferentes vías de degradación de tolueno.

Fuente de carbono	Sustrato (mg)	Carbono en el sustrato (mg de C)	Micelio (mg)	Carbono en el micelio (mg de C)	CO ₂ producido (mg)	Carbono en el CO ₂ (mg de C)	Carbono recuperado* (mg C)
Glucosa	30	12	14.4	7.2	19.1	5.2	12.4
Tolueno	6.26	5.7	5.2	2.6	11.3	3.1	5.7
Alcohol bencílico	6.26	4.9	3.1	1.5	13.1	3.6	5.1
Benzald.	6.26	5.0	3.0	1.5	15.2	4.2	5.3
Benzoato	6.26	4.3	2.4	1.2	4.8	1.3	2.5
Catecol	6.49	4.3	3.8	1.9	16.6	4.5	6.4
m-Cresol	6.05	4.7	3.0	1.5	12.7	3.5	4.9
p-Cresol	6.05	4.7	3.6	1.8	11.5	3.1	4.9
o-Cresol	6.05	4.7	0.2	0.1	4.1	1.1	1.2
Protocat.	8.63	4.7	3.9	1.9	12.0	3.3	5.2

* el carbono recuperado corresponde a la suma del carbono del sustrato usado para la producción de CO₂ y el carbono utilizado para la formación de biomasa.

En el caso de los cresoles, con p y m-cresol se determinaron 3.5 mg de micelio, estos coincidieron con los medidos para alcohol bencílico y benzaldehído. Con el o-cresol la producción de biomasa fue muy baja y estuvo asociada con la poca producción de CO₂. Las producciones de biomasa en presencia de catecol y protocatecuato fueron mayores a las obtenidas con los demás intermediarios, esto parecería deberse a que estos sustratos se encuentran más reducidos que los metabolitos anteriores en la ruta metabólica. El balance en base a carbono fue cerrado con la mayoría de los intermediarios, excepto con el benzoato y el o-cresol, este último sustrato no favoreció el crecimiento. En algunos casos se estableció un exceso de carbono recuperado, esto pudo deberse a la interferencia de otros compuestos volátiles producidos durante el metabolismo del hongo en el análisis del CO₂.

En un experimento similar Weber y col., 1995, encuentran que *Cladosporium sphaerospermum* es capaz de crecer en presencia de alcohol bencílico, benzaldehído, benzoato y catecol, mientras que no observaron crecimiento con 3-metil catecol. Los resultados de estos autores sugieren que la vía metabólica de degradación del tolueno presente en *C. sphaerospermum* corresponde a la que se inicia con el ataque al grupo metilo. A diferencia de lo obtenido por esos autores, nuestros resultados indican que probablemente existe más de una vía de degradación del tolueno presente en *S. apiospermum*. Sin embargo la producción de CO₂ fue mayor con los intermediarios de la vía de ataque al grupo metilo, lo que indica que dicha ruta esta presente y se ve favorecida. Para corroborar los presentes resultados, sería necesario realizar un estudio que nos permita detectar específicamente algunos de los intermediarios de la ruta. Prenafeta-Boldú y col., 2001, estudian el catabolismo de tolueno en cinco cepas de hongos deuteromicetos y en una cepa de hongo ascomicetos, las cuales fueron capaces de crecer en tolueno como única fuente de carbono y energía, así como en *Cunninghamella echinulata* y en *Aspergillus niger* que degradan el tolueno por cometabolismo con glucosa. Todas las cepas fúngicas evaluadas fueron incubadas con 2, 3 y 4 fluoro-tolueno, encontrando y caracterizando el patrón de acumulación de los distintos compuestos intermediarios a través de resonancia magnética nuclear. La conversión inicial de los fluoro-toluenos mediante las cepas que crecieron en tolueno como única fuente de carbono y energía ocurrió preferentemente en el grupo metilo para obtener ¹⁹F benzoatos. La oxidación de fluoro-tolueno en *C. echinulata* fue iniciada tanto en el anillo aromático obteniendo ¹⁹F o-cresol, como en el grupo metilo para formar ¹⁹F-benzoato. Esto último, obtenido con *C. echinulata*, corrobora el hecho de que podría existir más de una ruta de degradación de tolueno en *S. apiospermum*.

En bacterias, Johnson y Olsen, 1997, reportan que *Burkholderia* JS1 y una cepa mutante (JS150) derivada de la primera tienen la habilidad de usar múltiples vías metabólicas para el metabolismo de compuestos aromáticos substituidos. Esta habilidad se refleja en la gran cantidad de compuestos aromáticos que estas cepas pueden usar como sustratos de crecimiento. *Burkholderia* JS150 sintetiza tres oxigenasas distintas para 4 vías de ruptura del anillo aromático, esto ha sido establecido a través de la producción de plásmidos y la determinación de fragmentos de DNA que codifican para las tres enzimas, tolueno-2-

monooxigenasa (Tb2m), tolueno-4-monooxigenasa (Tb4m) y la tolueno dioxigenasa reportada previamente. Al crecer a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c, cepa clonada a partir de JS150, en un medio que contenía tolueno y glucosa, se acumularon metabolitos polares en el medio. Al analizarlos, encontraron que éstos consistían en una mezcla de isómeros de cresol; predominando el o-cresol, sin embargo una concentración significativa de p-cresol también fue detectada.

6.1.3.2 Consumos de oxígeno en presencia de intermediarios de la vía metabólica de degradación de tolueno en *S. apiospermum*.

Para completar el esquema de experimentos descritos en la primera parte de esta sección, se determinó el consumo de oxígeno utilizando un electrodo de tipo Clark. Estos experimentos se realizaron usando micelio crecido con tolueno (células en reposo), en presencia de los diferentes intermediarios, para evaluar la actividad metabólica del microorganismo con enzimas que fueron constituidas durante su crecimiento previo. La velocidad específica de consumo de oxígeno depende de la actividad biológica de la biomasa (Deront y col., 1998).

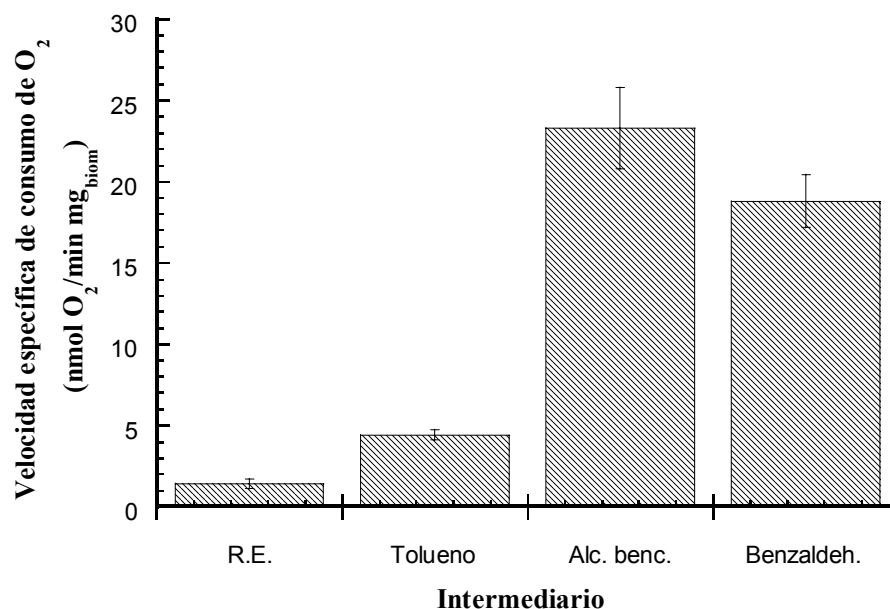


Figura 6.3.2 Consumo de oxígeno en presencia de los diferentes intermediarios de la ruta metabólica propuesta para la de degradación de tolueno en *S. apiospermum*. Respiración endógena (RE) debida a tolueno residual o a presencia de material de reserva o metabolitos.

Las velocidades de consumo de oxígeno fueron de 0.08, 0.4 y 0.32 (mg O_2 /min L) para el tolueno (T) alcohol bencílico (AB), benzaldehído (BA), respectivamente (Figura 6.3.2).

Estas velocidades corregidas por biomasa y volumen de reacción (60mL de solución amortiguadora de fosfatos) equivalen a 4.6, 23.3 y 18.8 (nmolO₂/min mg_{biom}). La mayor fue la obtenida con el alcohol bencílico y es aproximadamente 5 veces mayor a la obtenida con tolueno.

Se obtuvo un importante consumo de oxígeno en presencia de todos los intermediarios evaluados, comparado con el obtenido con tolueno. Lo cual indica, que una vez que se logra modificar la molécula de tolueno, la actividad de las enzimas se facilita en presencia de los intermediarios. Al parecer la modificación del tolueno es el paso limitante en la degradación de dicho compuesto.

El consumo de oxígeno en presencia de los intermediarios también se evaluó en biomasa producida en sólido. Los resultados de estos consumos se resumen en la Tabla 6.3.2, en este caso no solo se adicionaron como sustratos el AB, el BA y el T, también se evaluaron el m, p y o-cresol, intermediarios en las rutas que producen dihidroxidioles.

Tabla 6.3.2 Velocidades de consumo de oxígeno obtenidas con biomasa de *Scedosporium apiospermum* producida en cultivo sólido en presencia de los distintos intermediarios de la vía metabólica de degradación de tolueno.

Compuesto intermediario	Velocidad de consumo de O ₂ (mg/min L)	Velocidad específica de consumo de O ₂ (nmol/min mg _{biom})
Tolueno	0.08 (150) ^a	9.9
Alcohol bencílico	0.11 (206) ^a	13.6
Benzaldehído	0.09 (167) ^a	11.0
Meta-cresol	0.068 (127) ^a	8.4
Para-cresol	0.052 (97) ^a	6.4
Orto-cresol	0.01 (18) ^a	1.2

^a velocidad de consumo de oxígeno en unidades de (nmolO₂/min).

En la Tabla 6.3.2 se observa que de forma similar a lo ocurrido con la biomasa de cultivo líquido, la mayor velocidad de consumo se obtuvo en el sistema en el cual se usó alcohol bencílico, mientras que con los cresoles las velocidades fueron menores. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los experimentos de crecimiento en presencia de los

diferentes intermediarios, ya que también existe consumo de oxígeno en presencia de los cresoles. Sin embargo, las velocidades de consumo con estos últimos fueron menores que las obtenidas con alcohol bencílico y benzaldehído, esto indica que la degradación de tolueno en *S. apiospermum* ocurre a través la vía de ataque inicial al grupo metilo. Al parecer, como ya se mencionó, existe mas de una ruta de degradación del tolueno en el hongo. Las velocidades de consumo de oxígeno que obtienen Weber y col., 1995 para *C. sphaerospermum* son de alrededor de 150 nmolO₂/min mg_{biom} para tolueno, alcohol bencílico y benzaldehído, respectivamente y menores a 5 nmolO₂/min mg_{biom} para el m, p y o-cresol.

Para *Pseudomonas cepacia* G4 100R, Shields y col., 1991, reportan consumos de oxígeno iguales a 40 nmolO₂/min mg_{proteína} en presencia de tolueno, 230 nmolO₂/min mg_{proteína} con o-cresol y 163 nmolO₂/min mg_{proteína} al usar fenol. Dicha cepa bacteriana degrada tolueno a través de la dihidroxilación del anillo aromático para producir o-cresol y 3 metil-catecol como intermediarios.

6.1.4 Actividades enzimáticas asociadas a la vía metabólica de degradación de tolueno en *S. apiospermum*

6.1.4.1 Determinación de actividad de oxigenasas

Como se puede observar en el esquema (Figura 1.1, pag. 11) que resume el conocimiento a cerca de las cinco vías metabólicas bacterianas de degradación de tolueno, muchas de las reacciones son catalizadas por oxigenasas. Entre ellas la tolueno mono-oxigenasa actúa en el grupo metilo presente en *Pseudomonas putida* mt-2, las 2, 3 y 4 tolueno mono-oxigenasas que hidroxilan el núcleo aromático en tres posibles posiciones para producir o, m y p-cresol y la tolueno 2,3-dioxigenasa de *P. putida* F1. El conocimiento que existe en cuanto a actividades enzimáticas vinculadas a la degradación de tolueno en hongos es menor comparado con el vasto trabajo reportado para bacterias. Hasta donde sabemos, solamente existe un trabajo realizado por Weber y col., 1995, quienes miden actividades

oxigenasas y deshidrogenasas vinculadas a la degradación de tolueno en *Cladosporium sphaerospermum*.

El oxígeno molecular es el reactivo en las dos formas de catabolismo del tolueno, por lo cual una de las metodologías para la determinación de la actividad de oxigenasas consiste en la cuantificación del consumo de oxígeno como lo reportan Sun y Wood, 1997.

La determinación de la actividad enzimática de oxigenasas nos permitió completar el esquema de estudio de la actividad metabólica fúngica descrito en la sección 6.1.3 (pag. 85). Para establecer la técnica de determinación de actividad oxigenasa vinculada a la ruta de degradación de tolueno se usó biomasa producida en cultivo líquido, para tener un control estricto sobre las condiciones de producción de la misma. Los resultados de actividad enzimática obtenidos con la biomasa producida en cultivo líquido serán usados posteriormente como referencia o control para comparar datos obtenidos en sistemas más susceptibles a interferencias externas, tales como los biofiltros pequeños (cultivo sólido) o el sistema de biofiltración. El consumo de oxígeno se determinó con la biomasa obtenida en líquido en solución amortiguadora de fosfatos (0.05M, pH=7), con el fin de medir la actividad enzimática oxigenasa. Los experimentos se realizaron utilizando concentraciones crecientes de tolueno, asimismo se determinó la magnitud de la respiración endógena (RE).

En la Tabla 6.4.1 se observan los valores promedio de la velocidad de consumo de oxígeno, la biomasa (peso seco) y la actividad oxigenasa específica.

Tabla 6.4.1. Velocidades de consumo de oxígeno y actividad oxigenasa en presencia de concentraciones crecientes de tolueno y en ausencia de sustrato (RE)

Concentración de tolueno (mg/L)	Velocidad de consumo de oxígeno (mgO ₂ /Lmin)	Biomasa (mg)	Actividad oxigenasa (nmolO ₂ /min mg _{biom})
0 (RE)	0.018 (36)	25.5	1.4
28.9	0.081 (118)*	31.3	3.8
58.7	0.086 (127)*	28.9	4.4
86.7	0.096 (147)*	30.6	4.9

* velocidad de consumo de oxígeno en unidades de (nmolO₂/min).

Los datos de actividad oxigenasa específica presentados en la Tabla 6.4.1 fueron corregidos restándoles el valor que corresponde a la respiración endógena, de esta forma se obtuvieron **3.8, 4.4 y 4.9 (nmolO₂/min mg_{biom})**, para 28.9, 58.7 y 86.7 mg/L de tolueno, respectivamente. Los resultados muestran que al incrementar la concentración de tolueno se incrementó la velocidad de consumo de oxígeno y por tanto la actividad enzimática.

La actividad oxigenasa máxima determinada para *S. apiospermum* con tolueno como sustrato fue igual a 4.9 nmol/min mg_{biom}. A fin de comparar la actividad enzimática de la tolueno mono-oxigenasa de *S. apiospermum* con las reportadas para otros microorganismos se debe considerar que el micelio del hongo contiene alrededor de 28% de proteína (Guerra y col., 2000 y de acuerdo con análisis realizados en el presente trabajo), por lo cual su actividad enzimática corresponde a 24.4 nmol/min mg_{proteína}.

En la Tabla 6.4.2 se presenta una recopilación de las actividades oxigenasas medidas para diferentes cepas microbianas. En la tabla se puede observar que existe una gran divergencia en los valores de actividad enzimática dependiendo de la cepa microbiana, de las condiciones de cultivo, del método de determinación y de las distintas formas de expresarla. En la tabla se presentan datos de la actividad de la tolueno 2 y 4 monooxigenasa en nmol/min para *P. aeruginosa*, similares a los obtenidos con el hongo. El valor de actividad oxigenasa de *S. apiospermum* fue mayor al reportado para *P. putida* F1 y menor comparado con las dioxigenasas de bacterias y hongos. Esto pudo deberse a que al realizar los análisis con el microorganismo íntegro, la actividad enzimática determinada fue menor que la obtenida con extractos, ya que al usar extractos la enzima se encuentra en mayor contacto con el sustrato y no se tiene que superar las limitaciones de difusión del sustrato al interior de la célula. Sin embargo, se ha corroborado que la actividad enzimática coincide con la actividad metabólica medida para este hongo en diferentes sistemas de cultivo (ver sección 6.1.5).

Tabla 6.4.2 Actividades oxigenasas en diferentes cepas microbianas con distintos sustratos

Microorganismo	Sustrato o inductor	Enzima	Actividad enzimática (nmol/min mg _{proteína})	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i> F1	(arginina-tolueno)	TDO	7	Shields y col., 1989
<i>P. putida</i> F1	(arginina-tolueno)	C2,3DO	420	Shields y col., 1989
<i>P. cepacia</i> G4	(lactato-tolueno)	TDO	0.1	Shields y col., 1989
<i>P. cepacia</i> G4	(lactato-tolueno)	C2,3DO	0.05	Shields y col., 1989
<i>P. aeruginosa</i>	(tolueno)	T2OM	108 ^a	Johnson y Olsen, 1997
<i>P. aeruginosa</i>	(fenol)	T2OM	182.7 [*]	Johnson y Olsen, 1997
<i>P. aeruginosa</i>	(tolueno)	T4OM	267.5 [*]	Johnson y Olsen, 1997
<i>P. aeruginosa</i>	(fenol)	T4OM	106.2 [*]	Johnson y Olsen, 1997
<i>P. cepacia</i> G4 (<i>cepa silvestre</i>)	(catecol)	C2,3DO	6550	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 100	(catecol)	C2,3DO	5290	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 100	(catecol)	C2,3DO	3390	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 103	(catecol)	C2,3DO	1680	Shields y col., 1991
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	(catecol)	CDO	118	Weber y col., 1995
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	(protocatecuato)	PDO	145	Weber y col., 1995
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(para-cresol)	PDO	190	Jones y col., 1993
<i>S. apiospermum</i>	(tolueno)		24.4	Presente trabajo

TDO tolueno dioxigenasa, C2,3DO catecol 2,3-dioxigenasa, T2MO y T4MO tolueno 2- y 4-monooxigenasa, CDO catecol dioxigenasa, PDO protocatecuato dioxigenasa. * Actividad enzimática en (nmol/min).

A partir de la relación de Michaelis-Menten (Figura 6.4.1), se pueden obtener las constantes cinéticas K_m y V_{max} que caracterizan la actividad de la tolueno oxigenasa de *S. apiospermum*. De acuerdo al ajuste, los valores de K_m y V_{max} fueron de 14.8 mg/L (0.17 M) y 5.8 nmol/min mg_{biomasa}, respectivamente. La velocidad de la actividad enzimática depende de la concentración de tolueno en un rango entre 0 y 60 mg/L.

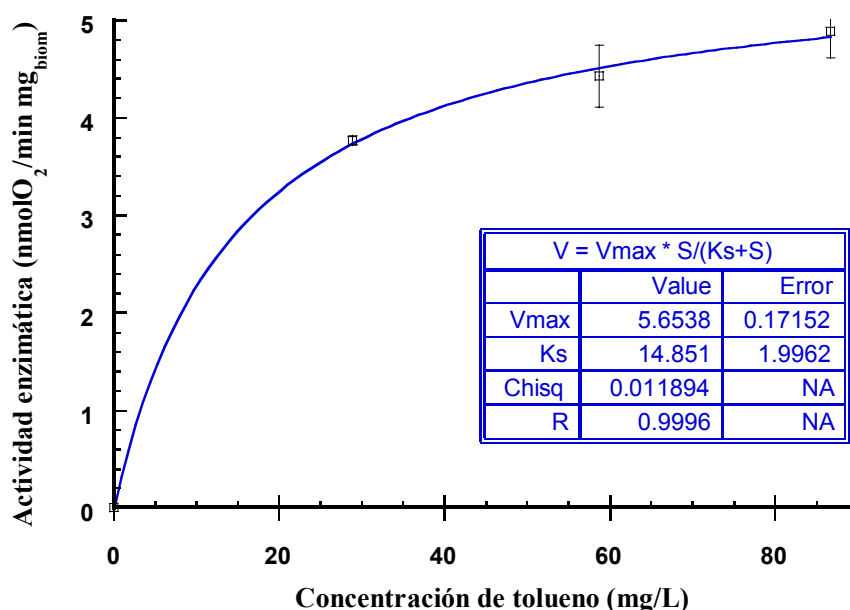


Figura 6.4.1. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la tolueno oxigenasa de *S. apiospermum*.

El valor de K_m fue alto comparado con los reportados en la literatura y sugiere una baja afinidad de la enzima por el sustrato. Sin embargo, esto pudo deberse a que los análisis se realizaron con el microorganismo completo existiendo problemas de transporte a través de la membrana. Esto último no tiene efecto sobre el valor de V_{max} , ya que este parámetro está regido por el exceso de sustrato presente para la reacción enzimática requisito que fue cubierto al realizar estos experimentos.

Recientemente, Shingleton y col., 2001 determinaron la actividad de la tolueno dioxigenasa (TDO), medida en cultivos por lote de *P. putida* TVA8 y encuentran que ésta depende de la concentración de tolueno entre 0 y 30 mg/L. Para obtener una medida de la actividad de la TDO y su posterior uso en una cinética de inhibición de Michaelis Menten, se estableció

una correlación entre la concentración de tolueno y la inducción de la actividad de la TOD medida mediante bioluminiscencia.

6.1.4.2. Determinación de actividad de deshidrogenasas.

Otra de las actividades enzimáticas vinculadas a la ruta de degradación de tolueno es la actividad de las deshidrogenasas, específicamente la alcohol deshidrogenasa cataliza el paso de conversión del alcohol bencílico a benzaldehído. Por tanto, se determinó la actividad de la alcohol bencílico deshidrogenasa en extractos enzimáticos obtenidos de biomasa de *S. apiospermum* producida en cultivo líquido y sólido. Los extractos enzimáticos fueron obtenidos usando nitrógeno líquido (ver sección 5.7.3.2.). La actividad deshidrogenasa se midió espectrofotométricamente a 340nm, longitud a la cual se detecta la forma reducida de los cofactores (NAD y NADP) indispensables para la actividad de estas enzimas.

Los resultados obtenidos con extractos enzimáticos de biomasa producida tanto en cultivo líquido como en cultivo sólido se muestran en la Figura 6.4.2 A y B, respectivamente.

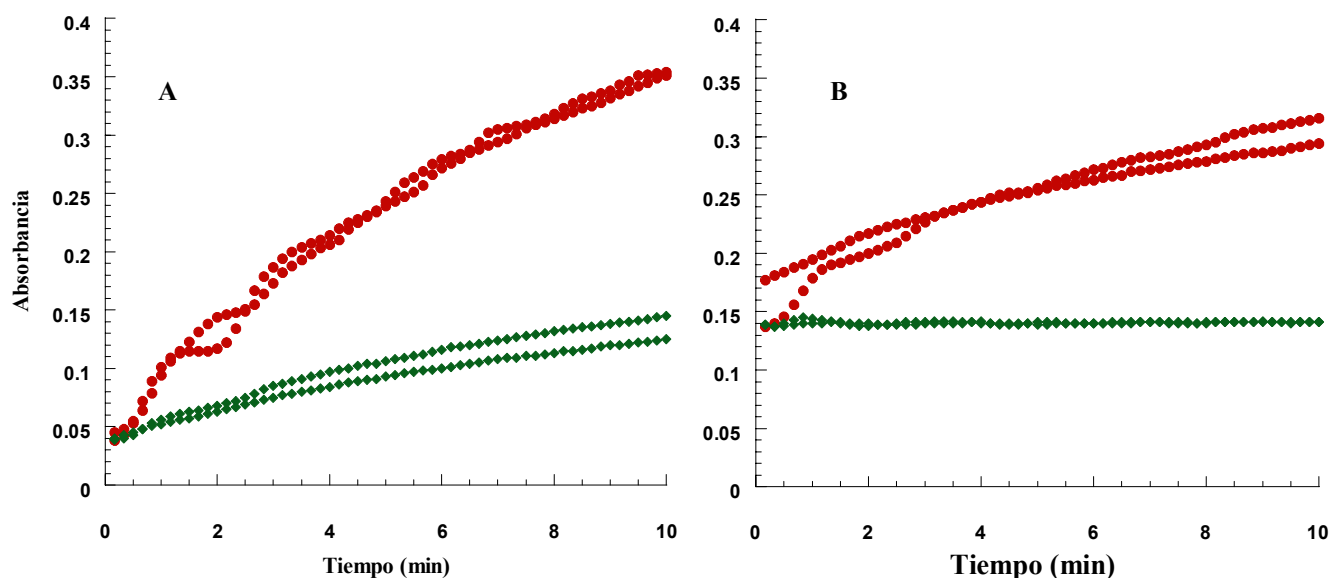


Figura 6.4.2 Evolución de la formación de la forma reducida del cofactor NAD H⁺ (●) y NADPH⁺ (◆), respectivamente en: A Extractos enzimáticos de biomasa producida en cultivo líquido; B Extractos enzimáticos de biomasa producida en cultivo. Valores de absorbancia a 340nm, usando alcohol bencílico como sustrato.

En la gráfica 6.4.2, se presenta la formación de NAD H^+ o NADP H^+ y las velocidades de formación obtenidas con estos dos cofactores. Se observa que la velocidad de aparición de la forma reducida fue mayor al usar NAD como cofactor, esto sugiere que la alcohol bencílico deshidrogenasa del hongo tiene una mayor especificidad por este cofactor.

En la Tabla 6.4.3 se presentan los datos utilizados para calcular la actividad deshidrogenasa. La actividad fue mayor en biomasa obtenida de cultivo sólido.

Tabla 6.4.3 Datos tomados en cuenta para calcular la actividad deshidrogenasa

Sistema experimental	Cofactor	Velocidad de aparición de forma reducida (Abs/min)	Proteína (mg)	Actividad deshidrogenasa ($\text{nmol}_{\text{NADH}}/\text{min mg}_{\text{prot}}$)
Extr. De líquido	NAD	0.048	1.4	16.2
	NADP	0.013	1.4	4.6
Extr. De sólido	NAD	0.023	0.31	36.3
	NADP	0.00011	0.31	0.2

La actividad enzimática de la alcohol bencílico deshidrogenasa obtenida en cultivo líquido con *S. apiospermum* fue igual a 16.2 ($\text{nmol}_{\text{cofactorreducido}}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$), este valor se encuentra dentro del mismo rango obtenido para la actividad de oxigenasas 24.4 $\text{nmol}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$. Ambos valores coinciden con la actividad metabólica encontrada en medio de cultivo sólido y sistema de biofiltración. Para la misma deshidrogenasa medida en biomasa producida en sólido, la actividad fue 2.25 veces mayor (36 $\text{nmol}_{\text{cofactorreducido}}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$).

Análogamente a lo presentado para la actividad oxigenasa, en la Tabla 6.4.4 se comparan los valores de actividad deshidrogenasa medida para distintos microorganismos. Nuevamente se observa discrepancia con los valores de actividad deshidrogenasa reportada para diferentes microorganismos, valores en rangos de decenas hasta miles para cepas bacterianas diferentes (Shields y col., 1989; Shields y col., 1991). La más cercana a nuestras condiciones es la reportada para la alcohol bencílico deshidrogenasa de *C. sphaerospermum* que tiene un valor de 169 $\text{nmol}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$ mayor al encontrado para *S. apiospermum*.

Tabla 6.4.4. Valores de actividad deshidrogenasa medidos para diferentes cepas microbianas en distintos trabajos presentados en la literatura.

Microorganismo	Sustrato o inductor	Enzima	Actividad enzimática (nmol/min mg _{proteína})	Referencia
<i>P. putida</i> F1	(arg.-tolueno)	TDDDH	210	Shields y col., 1989
<i>P. cepacia</i> G4	(lactato-tolueno)	TDDDH	1300	Shields y col., 1989
<i>P. cepacia</i> G4 (cepa silvestre)	2 hms	DH	52	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 100	2 hms	DH	122	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 100R	2 hms	DH	86	Shields y col., 1991
<i>P. cepacia</i> G4 103	2 hms	DH	34	Shields y col., 1991
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AB	DH	169	Weber y col., 1995
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	BA	DH	7,180	Weber y col., 1995
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1-propanol	ADH	74.3 ^a	Onodera y Ogasawara, 1989
<i>S. apiospermum</i>	2-propanol	ADH	77.2 ^a	Onodera y Ogasawara, 1989
<i>S. apiospermum</i>	AB (cultivo líquido)	DH	16.2	Presente trabajo
<i>S. apiospermum</i>	AB (cultivo sólido)	DH	36.3	Presente trabajo

hms 2-hidroximuconico semialdehido, AB alcohol bencílico, BA benzaldehído, DH deshidrogenasa. ^aUnidades enzimáticas en 1 µmol de NAD/min mg_{proteína} bajo las condiciones de determinación.

La actividad de la alcohol bencílico deshidrogenasa de *S. apiospermum* medida para biomasa producida en cultivo sólido 36 nmol/min mg_{proteína}, es similar a la obtenida para la cepa silvestre de *P. cepacia* G4 (54 nmol/min mg_{proteína}) y para una cepa mutante *P. cepacia*

G4 103 (34 nmol/min mg_{proteína}) con el semialdehído 2-hidroxiuconico como sustrato de actividad enzimática (Shields y col., 1991).

6.1.5 Actividad enzimática de oxigenasas asociada a la actividad metabólica de degradación de tolueno.

En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de los fenómenos que rigen la oxidación microbiana de contaminantes, tales como los sistemas enzimáticos involucrados y la regulación de los mismos, este conocimiento permite un control más estricto de los procesos y el establecimiento de las condiciones adecuadas para optimizar su funcionamiento global. Específicamente, la actividad oxigenasa determinada como consumo de oxígeno puede ser una medida de la actividad metabólica. Así se determinó el consumo de oxígeno en muestras obtenidas de cultivos de *S. apiospermum* en medio sólido (biofiltros a menor escala) ya que, como se mencionó previamente, este sistema es similar a los sistemas de biofiltración.

Una vez más, se evaluaron dos estrategias para establecer la actividad de oxigenasas con la biomasa obtenida de cultivo sólido; la primera consistió en tomar la biomasa y homogenizarla con un agitador magnético, en la segunda la biomasa fue homogenizada usando el ultraturrax para separar el soporte sólido y romper el micelio adherido al soporte. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 6.5.1, se observa que al homogenizar la biomasa por simple agitación (SA) en presencia del tolueno se obtuvo una velocidad específica de consumo de oxígeno igual a 15.5 (nmolO₂/min mg_{biom}), mientras que al usar la biomasa rota con el ultraturrax ésta correspondió a 19.9 (nmolO₂/min mg_{biom}). Las actividades enzimáticas, resultantes al restar la respiración endógena, fueron de 6.3 y de 11.9 (nmolO₂/min mg_{biom}) para la biomasa completa y para la biomasa rota, respectivamente. La actividad enzimática obtenida al romper el micelio fue casi el doble que la obtenida con la biomasa completa y adherida al soporte. Probablemente esta diferencia se debió a que al romper la biomasa se liberaron enzimas intracelulares y material celular, lo cual pudo inducir que el sustrato estuviese más disponible para que el sistema enzimático lo atacara.

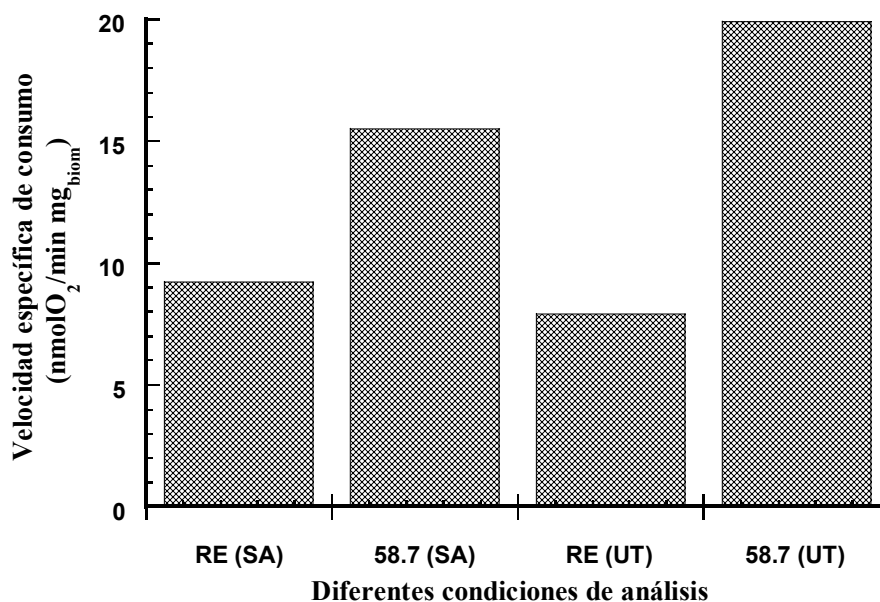


Figura 6.5.1 Consumo de oxígeno (con 58.7 mg/L y sin tolueno RE) evaluado en biomasa producida en soporte sólido. Los análisis se realizaron en muestras solamente agitadas (SA) y en muestras con micelio roto con un ultraturrax (UT). Promedio de experimentos realizados por duplicado para cada una de las distintos tratamientos de la biomasa.

En la Tabla 6.5.1 se muestra la comparación de la actividad enzimática con biomasa obtenida en cultivo líquido y en cultivo sólido. Se puede observar que la actividad enzimática obtenida con biomasa de cultivo sólido fue mayor.

Tabla 6.5.1 Comparación de la actividad enzimática con biomasa obtenida en cultivo líquido y sólido.

Sistema experimental	Velocidad de consumo de oxígeno – RE (mgO ₂ /Lmin)	Biomasa (mg)	Actividad oxigenasa específica (nmolO ₂ /min mg _{biom})
Biomasa de CL	0.069	27.6	4.7
Biomasa completa de CS (promedio)	0.051	15.1	6.3
Biomasa rota de CS	0.096	15.1	11.9

CL cultivo líquido, CS cultivo sólido

Los valores de la actividad enzimática obtenidos para biomasa producida en cultivo sólido y en cultivo líquido nos permite relacionar la actividad enzimática medida en la biomasa de *S. apiospermum* con las posibles capacidades de eliminación que se obtendrían en el

sistema de cultivo sólido y/o en un biofiltro de 2.9 L de volumen de empaque. El cálculo se muestra a continuación.

$$C.E. = (\text{Biomasa}) \times (\text{Actividad enzimática específica}) \times (\text{Densidad})$$

Donde:

$$\text{Biomasa} = \text{mg}_{\text{biomasa}}/\text{gMS}$$

$$\text{Actividad enzimática específica} = \text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biomasa}}$$

$$\text{Densidad} = \text{gMS}/\text{m}^3_{\text{reactor}}$$

Para las condiciones experimentales establecidas en los biofiltros a escala laboratorio, con un volumen de empaque igual a 0.25 L, 23 g de materia seca inicial y un valor de biomasa igual a 23.6 mg/gMS, para la actividad enzimática (11.9 nmol/min mg_{biomasa}) determinada en biomasa de dichos biofiltros, tendríamos una C.E. igual:

$$C.E. = \left(\frac{23.6 \text{ mg Micelio}}{\text{gMS}} \right) \left(\frac{23 \text{ gMS}}{0.00025 \text{ m}^3} \right) \left(\frac{11.9 \text{ nmolO}_2}{\text{mg Micelio} \cdot \text{min}} \right) \left(\frac{\text{molO}_2}{10^9 \text{ nmol}} \right) \left(\frac{\text{molTOL}}{\text{molO}_2} \right) \left(\frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}} \right) \left(\frac{92 \text{ gTOL}}{\text{molTOL}} \right) = 142 \frac{\text{g}}{\text{m}^3 \text{ h}}$$

Similar a los valores experimentales medidos en este sistema y presentados en la sección 6.1.2.

La determinación de la actividad de oxigenasas coincidió no solamente con los datos obtenidos para el consumo de tolueno en biofiltros, sino también con las velocidades de degradación de tolueno en cultivo líquido. La tasa específica de consumo de dicho compuesto en base al valor de la actividad enzimática (4.7 nmolO₂/min mg_{biom}) corresponde a 25 mg_{Tol}/h g_{biom}, la cual esta en completo acuerdo con la medida en los experimentos de consumo del contaminante en cultivo líquido (sección 6.1.1). La actividad enzimática está relacionada con las tasas de consumo de tolueno medidas bajo distintas condiciones y es una medida precisa del metabolismo fúngico que nos permite establecer la capacidad degradativa del hongo.

Por otro lado, la determinación de las actividades enzimáticas, tolueno oxigenasa y alcohol bencílico deshidrogenasa, asociadas a la oxidación del tolueno a través del ataque inicial al

grupo metilo, permite la elucidación de la vía metabólica de catabolismo del tolueno presente en *S. apiospermum*. En este sentido, la actividad de oxigenasa medida con el microorganismo íntegro es un reflejo de una serie de reacciones que dan origen a la oxidación completa del tolueno a través de dicha ruta. La actividad deshidrogenasa medida en extractos permite evaluar una reacción específica, es decir la transformación del alcohol bencílico a benzaldehído. La presencia de esta reacción en el microorganismo confirma los resultados obtenidos con la oxigenasa. Los resultados de actividad enzimática reafirman los datos obtenidos a través de los otros experimentos de crecimiento y consumo de O₂ en presencia de los distintos intermediarios y nos llevan a concluir que la ruta propuesta inicialmente es la que opera en *S. apiospermum*. Sin embargo, como ya se mencionó, existen indicios de que existe más de una ruta de degradación de tolueno en el hongo.

La técnica de determinación de actividad de oxigenasas se aplicará finalmente a muestras de un sistema de biofiltración fúngico para tratar de encontrar la correlación entre la actividad enzimática del hongo *S. apiospermum* y las condiciones de operación. Ya que la determinación de la actividad biológica, medida como actividad enzimática, nos permitió predecir, corroborar e incluso explicar la operación y el funcionamiento de distintos sistemas de cultivo (líquido y biofiltros pequeños) en lo que respecta al consumo del contaminante. Esto aporta una importante herramienta para explicar fenómenos que han sido descritos hasta ahora como cajas negras.

6.1.6 Efecto de la respiración endógena y de inhibidores para reducir su magnitud

La magnitud de la RE obtenida con biomasa producida en cultivo líquido fue pequeña comparada con el consumo de oxígeno determinado en presencia de tolueno como sustrato. Sin embargo, en la biomasa de cultivo sólido ésta fue alta (alrededor de 30% del consumo en presencia de tolueno), lo cual implica que ésta interfiere en la determinación de la actividad enzimática. Sun y Wood, 1997, mencionan que para determinar la actividad de la tolueno-orto-monooxigenasa (TOM) a través de las velocidades de remoción de oxígeno, éstas deben ser mayores que la respiración de fondo (RE). En células de *Burkholderia cepacia* PR1₂₃ las velocidades de remoción de oxígeno en presencia de fenol fueron 100%

mayores que la respiración endógena, indicando una actividad consistente de la TOM. Debido a lo anterior, el objetivo de los siguientes experimentos fue tratar de disminuir o eliminar el efecto de la respiración endógena para medir solamente la actividad de oxigenasas. Como primer paso, se decidió evaluar el efecto de la azida de sodio que actúa a nivel de la cadena respiratoria como inhibidor de la respiración endógena. Durante el primer experimento se evaluó la capacidad de la azida de sodio como inhibidor de la RE, se expuso la biomasa fúngica a una solución de azida de sodio 0.01M durante una hora. Los resultados se presentan en la Figura 6.6.1

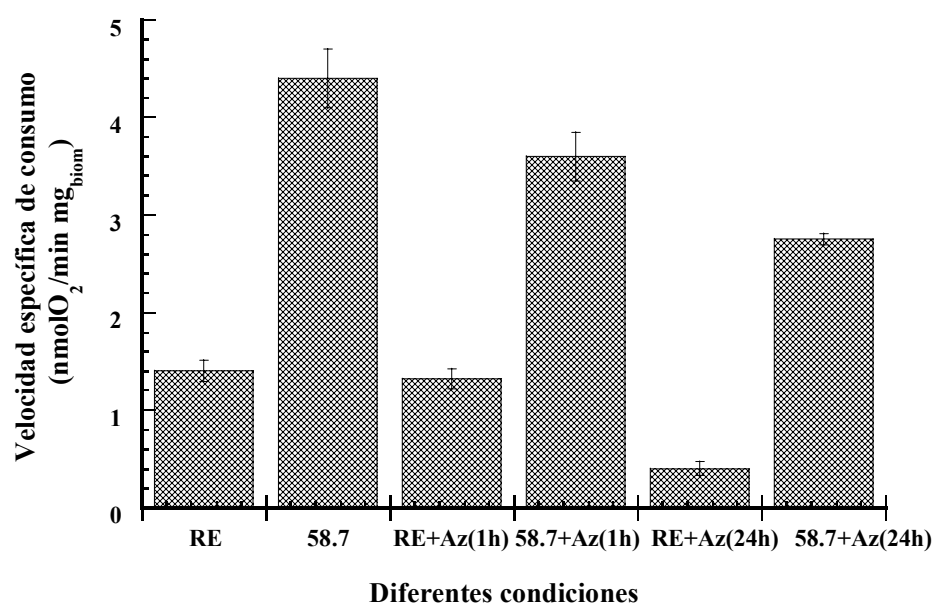


Figura 6.6.1 Efecto de la azida de sodio como inhibidor de la respiración endógena. Comparación del consumo de oxígeno para RE sin azida (RE), para biomasa expuesta a azida de sodio durante una hora sin tolueno (RE + Az) y en presencia de tolueno (58.7 mg/L + Az). Efecto de la exposición a la azida de sodio durante 24 horas, sobre la RE (RE + Az (24 h)) y sobre el consumo en presencia de tolueno (58.7 + Az (24h)).

En la Figura 6.6.1 se comparan las velocidades de consumo de oxígeno obtenidas con biomasa sin azida y con biomasa expuesta a azida de sodio. Después de una hora de exposición a la azida no se observó un efecto de inhibición en la respiración endógena, las velocidades de consumo de oxígeno fueron muy similares, mientras que el consumo de oxígeno en presencia del sustrato fue menor. Por tanto, se determinó que la azida de sodio no inhibe la RE, al menos cuando la biomasa es expuesta a este agente inhibidor durante una hora. De acuerdo a lo anterior, se decidió incrementar el tiempo de exposición a la

azida a 24h. En la misma figura, se observa que al dejar la biomasa en contacto con la azida de sodio durante 24 horas se redujo aproximadamente el 50% de la respiración endógena. Sin embargo, no es adecuado tener la biomasa en condiciones de almacenamiento por un tiempo tan prolongado, ya que puede ocurrir la pérdida de actividad enzimática.

Ya que los resultados no fueron los esperados en cuanto a la inhibición de la RE con una concentración de 0.01 M de azida, se evaluó el efecto de una mayor concentración de ésta y el uso de otro inhibidor, cianuro, en dos concentraciones crecientes (0.01M y 0.1M). En la Figura 6.6.2, se muestra el efecto de los dos inhibidores de la cadena respiratoria sobre la RE.

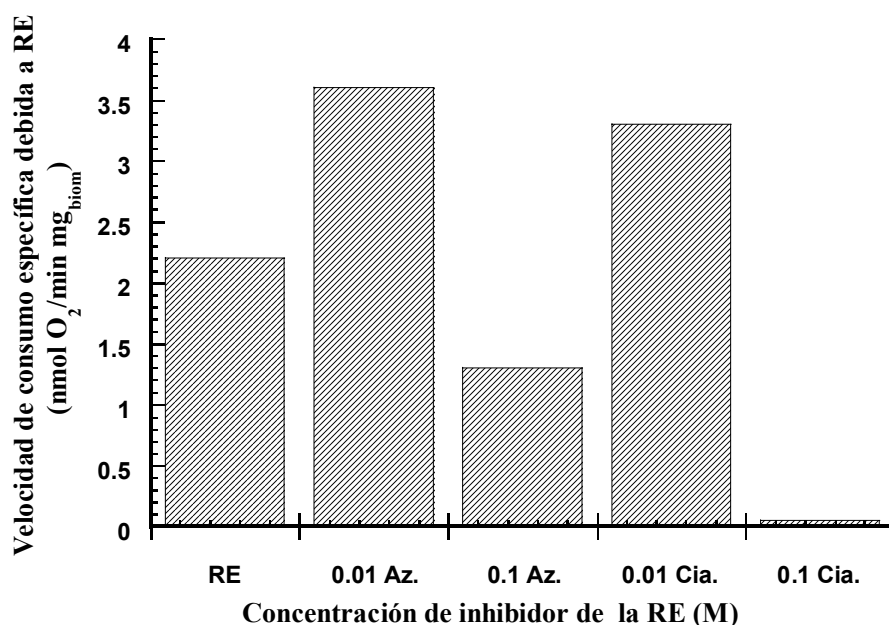


Figura 6.6.2 Velocidades específicas de consumo de oxígeno sin tolueno, respiración endógena. Comparación el efecto de diferentes concentraciones de azida de sodio (0.01 y 0.1 M) y cianuro (0.01 y 0.1 M) sobre la RE.

La velocidad de consumo de oxígeno correspondiente a la RE no fue inhibida al usar 0.01M de azida, su magnitud fue similar con y sin este inhibidor a dicha concentración. Al incrementar la concentración de azida a 0.1M se inhibió la RE a la mitad. En cuanto a los resultados obtenidos con el cianuro, con una concentración de 0.01M no se obtuvo una disminución en velocidad específica de consumo, sin embargo usando una concentración de

0.1M de cianuro se inhibió casi por completo la RE obteniendo una velocidad de 0.05 $\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$.

Una vez determinada la concentración de cianuro necesaria para inhibir la RE, se evaluó el consumo de oxígeno con biomasa expuesta dicho inhibidor, sin sustrato (RE) y con tolueno como sustrato de la actividad enzimática. Los resultados se muestran en la Figura 6.6.3. Para biomasa expuesta a cianuro durante una hora, la velocidad específica de consumo de oxígeno con tolueno fue de 4.7 $\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$, mientras que la velocidad de consumo de oxígeno para la RE fue igual a 0.05 $\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$. El cianuro mostró mejores resultados en cuanto a la inhibición de la RE, permitiendo evaluar el consumo de oxígeno debido a la presencia de oxigenasas y aparentemente no afectó el funcionamiento de dichas enzimas. La actividad que se obtuvo con la biomasa expuesta al cianuro fue de 4.7 ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$), similar a la obtenida en los experimentos con biomasa no expuesta a cianuro 4.6 $\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$.

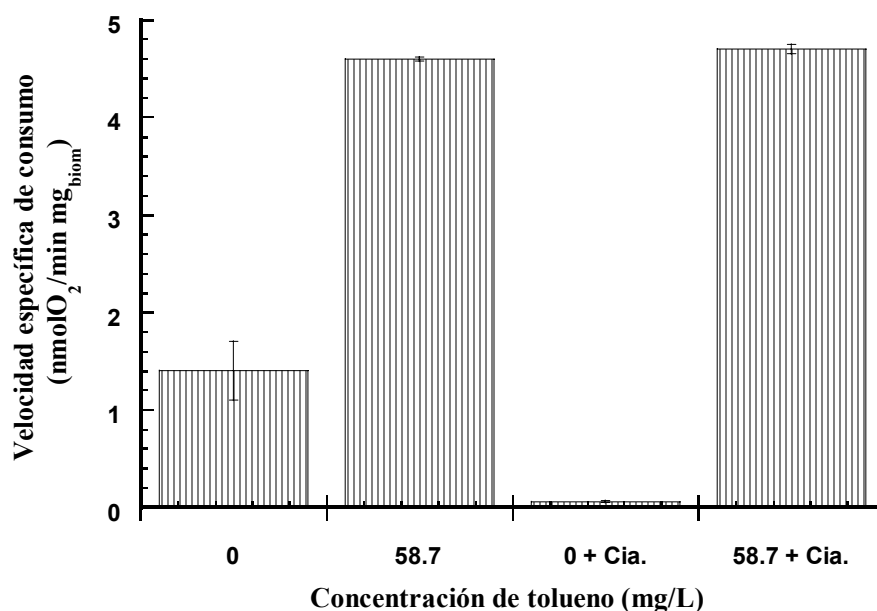


Figura 6.6.3 Efecto del cianuro sobre la RE y sobre el consumo de oxígeno en presencia de tolueno (58.7 mg/L) como sustrato de la actividad enzimática. Promedio de análisis llevados a cabo por duplicado para la RE y para 58.7 mg/L de tolueno con y sin cianuro.

Además de probar el efecto de los inhibidores sobre la RE, se evaluó el efecto de almacenar la biomasa fúngica. Este almacenamiento se llevó a cabo con el fin de agotar el sustrato residual, los intermediarios o el material de reserva que pueden incrementar la magnitud de

la RE. Especialmente, en el sistema de cultivo sólido se determinó una mayor acumulación de material de reserva y polímeros extracelulares. La biomasa utilizada para los experimentos de agotamiento de sustrato residual y/o intermediarios fue almacenada en solución amortiguadora o en medio mineral durante 24 horas. Los resultados obtenidos al medir RE en esta biomasa se comparan con los datos medidos para RE con biomasa fresca. Paralelamente se determinó el consumo de oxígeno con tolueno como sustrato en ambas biomasa. En la Figura 6.6.4 se comparan las velocidades medidas bajo estas dos condiciones. Para biomasa fresca, la velocidad específica de consumo de oxígeno en presencia de tolueno fue igual a 4.7 ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$) y la de la RE fue de 2.2 ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$). Mientras que para la biomasa almacenada, en solución amortiguadora y/o en medio mineral, las velocidades específicas de consumo de oxígeno para la RE fueron similares 1.8 y 2.2 ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$), respectivamente. En presencia de tolueno las velocidades específicas fueron 2.8 y 3.1 ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$) para biomasa almacenada en solución amortiguadora y medio mineral.

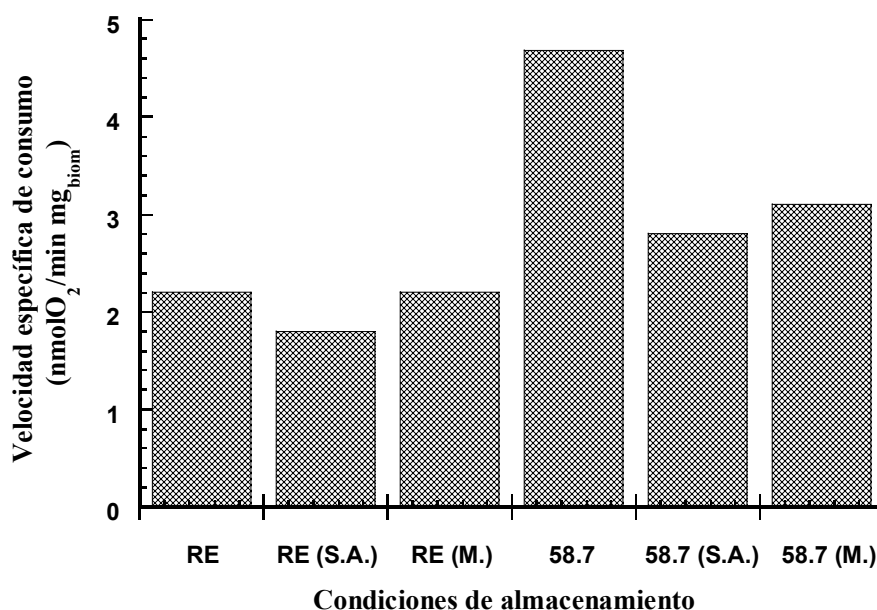


Figura 6.6.4 Efecto del agotamiento de sustrato, intermediarios y/o material de reserva en biomasa almacenada en solución amortiguadora (S.A.) o en medio mineral (M.) sobre la RE y la actividad de oxigenasas. (RE) y (58.7) análisis con biomasa fresca.

Las velocidades específicas de consumo de O_2 para la RE en biomasa almacenada y agotada fueron menores que la obtenida con biomasa fresca. Sin embargo, se comprobó que

también existe un decremento en la velocidad específica de consumo de oxígeno en presencia del sustrato, es decir, existe una pérdida de la actividad enzimática.

Al almacenar la biomasa en medio mineral se perdió aproximadamente el 85% de la actividad enzimática mientras que al hacerlo en solución amortiguadora se perdió el 76%. De esta forma se puede concluir que el almacenar la biomasa disminuye el consumo de oxígeno debido a la actividad microbiana en general (RE) y a la actividad de oxigenasas en particular.

En esta parte se demostró que el cianuro inhibe la RE pero no tiene un efecto negativo sobre la actividad enzimática. Se observó que no es adecuado el almacenamiento de la biomasa para realizar la determinación de actividades enzimáticas, ya que disminuyen de manera importante durante este proceso. También, si se anula el efecto de la RE mediante el cianuro se obtienen actividades enzimáticas similares a las determinadas restando el valor de la RE. Esto indica que los valores de actividad enzimática reportados en las anteriores secciones corresponden solamente al consumo de O_2 debido a las oxigenasas y no a otras reacciones metabólicas.

6.2. Biofiltración de tolueno con *Scedosporium apiospermum* en un biofiltro escala piloto.

6.2.1 Patrón de crecimiento de *S. apiospermum* en el biofiltro (E1).

Los experimentos de crecimiento de *S. apiospermum* en medio líquido y sólido mostraron que el hongo resulta ser un microorganismo muy eficiente en cuanto a su capacidad de degradar tolueno y permitieron obtener información a cerca de su metabolismo. A continuación se presentan los experimentos dirigidos a cultivarlo en un biofiltro, así como a establecer las condiciones más adecuadas para obtener una buena capacidad degradativa del contaminante. Finalmente se aplicaron las técnicas de determinación de enzimas, vinculadas a las rutas de degradación de tolueno en el hongo, para correlacionarlas con variables tales como la cantidad y distribución de la biomasa en el reactor y las condiciones de humedad en el mismo. Esto último, nos permitirá realizar un análisis más profundo del sistema de biofiltración fúngico y explicar los fenómenos biológicos y/o enzimáticos que rigen el funcionamiento global del bio-reactor.

En el primer experimento (E1) se evaluó el patrón de crecimiento de *S. apiospermum* bajo las condiciones de biofiltración. El hongo fue capaz de utilizar el tolueno como única fuente de carbono y energía y el sistema alcanzó altas capacidades de eliminación (C.E.). En este experimento se usó el medio mineral concentrado promoviendo el crecimiento masivo del microorganismo. A lo largo del proceso de biofiltración se observaron claramente tres fases. La primera fase corresponde a la germinación de las esporas, ya que el reactor fue inoculado con una suspensión de éstas, durante esta etapa no hubo degradación de tolueno y la caída de presión fue baja y constante en aproximadamente 5 mm de agua. Una vez que las esporas germinaron, en la segunda fase, el microorganismo inició la degradación de tolueno alcanzando la velocidad máxima de consumo del mismo. En esta segunda etapa se observó un incremento en la caída de presión, el cual se debió al crecimiento del microorganismo y a la ocupación de los espacios vacíos del soporte (Auria y col., 1993). En la tercera y última fase se observó un decremento en la C.E. debido a la disminución de la humedad del sistema, inducida por el secado y la compactación del material de empaque. En esta fase también se observó el decremento en la Δp debido a que

la alta densidad del micelio ocasionada por un excesivo crecimiento del mismo causo acanalamiento y secado.

En la Figura 6.6.1 se presenta la C.E., la producción del CO_2 y caída de presión Δp como función del tiempo. En el primer experimento (E1) se alcanzó una capacidad de eliminación máxima de $90 \text{ g/m}^3\text{h}$ después de 9 días de operación. Capacidades de eliminación entre 60 y $80 \text{ g/m}^3\text{h}$ fueron mantenidas en un periodo de 5 días. El decremento de la C.E. después de este período se debió al bajo contenido de humedad en el biofiltro (42% de humedad promedio, lo cual constituye aproximadamente el 60% de la humedad inicial). En este experimento no se adicionó ni agua ni medio de cultivo.

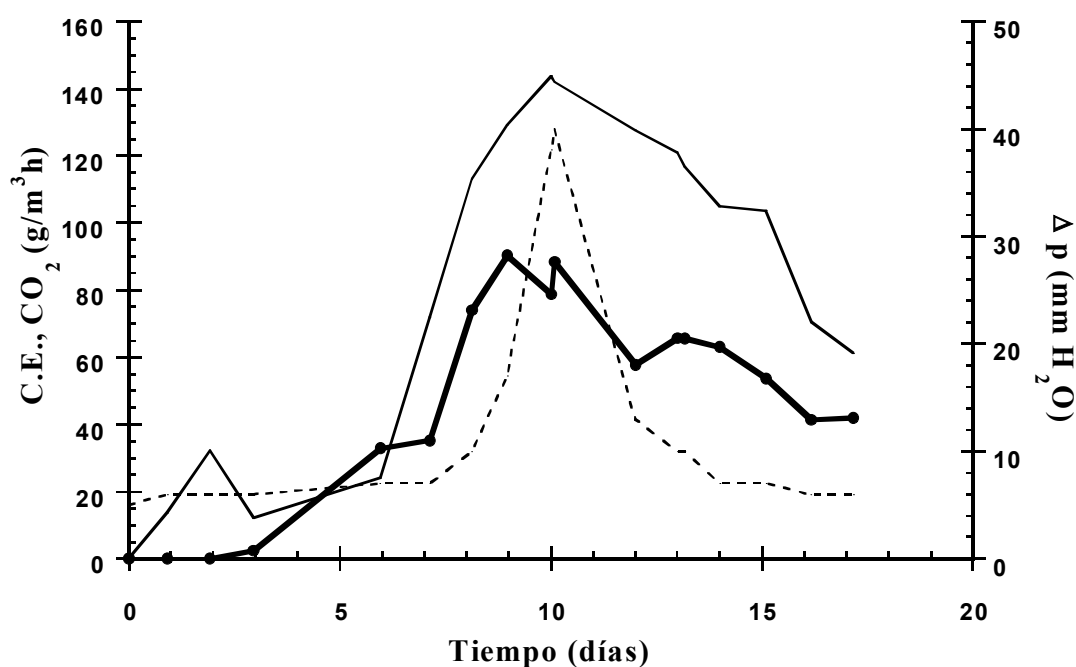


Figura 6.6.1. Evolución de la capacidad de eliminación (—●—), producción de dióxido de carbono (—) y caída de presión (---) en función del tiempo en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum* en el primer experimento (E1).

La producción de CO_2 estuvo asociada a la degradación de tolueno. La caída de presión Δp inicial del biofiltro fue de 5 mm de agua, después de 8 días se incrementó hasta 40 mm de agua. Lo anterior se correlacionó con el crecimiento fúngico, lo cual resultó en una reducción en la permeabilidad del lecho (Auria y col., 1993), se observó la compactación del material empacado debido al crecimiento fúngico, ésta indujo reducción y

acanalamiento o formación de canales preferenciales en el biofiltro, lo cual se vio evidenciado en la disminución de la Δp . Más aún, el secado indujo el mayor decremento en la Δp y en la C.E.

Durante este experimento el 50% de carbono de tolueno removido fue recuperado como CO_2 , tal como se puede observar en la Tabla 6.6.1.

Tabla 6.6.1. Balance de recuperación de carbono obtenido en E1.

	Cantidad (Kg/m^3)	Cantidad de carbono (kg de C/m^3)	Porcentaje de recuperación (%)
Tolueno consumido	17.6	16.1	
CO_2 producido	29.8	8.1	50
Biomasa producida	3.1	1.5	15*

* en base al carbono residual

Las medidas de biomasa después de los 20 días de operación mostraron que la máxima concentración de biomasa se encontraba en la sección central del biofiltro (32.4 mg/g materia seca). Los valores menores de biomasa (6.4 mg/de de materia seca) se encontraron en la parte superior del reactor que corresponde a la entrada del aire contaminado y coinciden con la parte donde los fenómenos de secado son los mayores (23% de humedad), esto es inducido por una saturación incompleta del aire de entrada. El promedio final de la concentración de biomasa fue de 18 mg/g de materia seca, esto corresponde a aproximadamente el 15% del carbono retenido (asumiendo que el 50% de biomasa es carbono). El carbono restante (35%) necesario para cerrar el balance probablemente se encuentra como carbonatos, intermediarios o polímeros extracelulares como ha sido previamente reportado por Morales y col., 1998, para un biofiltro bacteriano. Los decrementos en la C.E. pudieron deberse a la compactación del material de empaque y la importante reducción en el contenido de humedad.

6.2.2 Efecto del contenido de humedad y la compactación del material de empaque sobre la capacidad de degradación de tolueno en el biofiltro (E2).

La humidificación del aire de entrada es el método más usado para prevenir el secado acelerado del soporte, sin embargo se ha evaluado también el restablecimiento de la humedad del biofiltro mediante la adición de agua por aspersión superficial (Devinny y col., 1999). Esta estrategia fue usada durante el segundo experimento para mantener las altas C.E. obtenidas durante la etapa de arranque del biofiltro.

Con el fin de reducir la compactación debida a la excesiva cantidad de biomasa fúngica y mejorar el control del contenido de humedad, en el segundo experimento (E2) se redujo a la mitad la concentración del medio que se había utilizado en el primer experimento, buscando reducir el crecimiento del microorganismo. Por otro lado, se adicionó agua al sistema mediante aspersión superficial, ya que durante el primer experimento se observó que el decremento en la C.E. se debió principalmente al secado.

Las cinéticas de degradación de tolueno (C.E.), producción de CO_2 y Δp se observan en la Figura 6.6.2. Durante los primeros 4 días, la C.E. fue de alrededor de $30 \text{ g/m}^3\text{h}$ y ésta se incrementó rápidamente hasta alcanzar un valor máximo de $110 \text{ g/m}^3\text{h}$ el día 14 de operación. Al igual que en el primer experimento la producción de CO_2 y la Δp estuvieron correlacionadas a la degradación de tolueno. La C.E. fue de aproximadamente $60 \pm 10 \text{ g/m}^3\text{h}$ entre los 15 y 20 días de operación y posteriormente empezó a decrecer. Esto se debió al secado del material de empaque después de 23 días de operación. Con la finalidad de recuperar la actividad degradativa se asperjó agua superficialmente en el biofiltro en el día 26. Un incremento en la C.E. a $80 \text{ g/m}^3\text{h}$ mostró claramente que el sistema se encontraba limitado por agua.

Como se puede observar en la Figura 6.6.2, la C.E. permaneció prácticamente estable en valores de $40 \text{ g/m}^3\text{h}$, entre los 30 y 40 días de operación, hasta que se dieron nuevamente condiciones de secado. Un nuevo ciclo de restablecimiento de humedad fue realizado el día 42. Periodos más largos de la fase productiva no pudieron ser mantenidos probablemente

debido a que en este experimento no se adicionó nutrientes y la frecuente adición de agua promovió el lavado del reactor, lo cual también pudo reducir la biomasa y la actividad biológica. Sin embargo, la adición de agua permitió un mejor control del contenido de humedad obteniendo una humedad promedio final de 55% (Tabla 6.6.7, pag. 124).

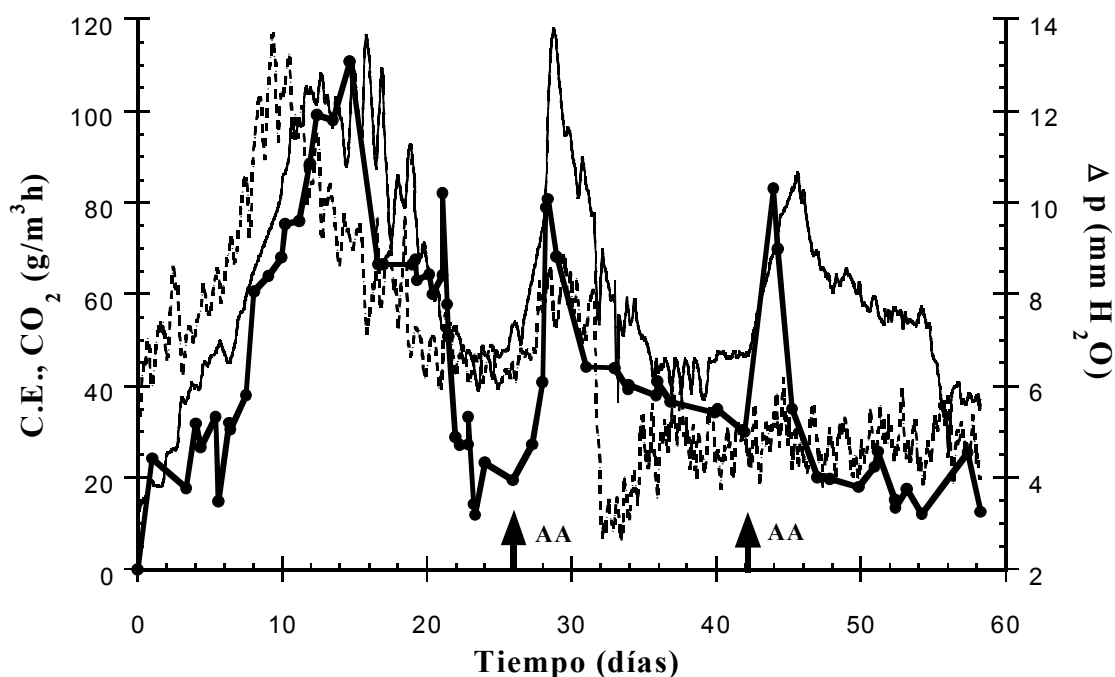


Figura 6.6.2. Evolución de la capacidad de eliminación (—●—), producción de dióxido de carbono (—) y caída de presión (---) en función del tiempo en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum* en el segundo experimento (E2). Adición de agua (AA) en los días 26 y 42 (↑).

Después de los 60 días de operación se consumieron se realizó el balance de recuperación de carbono que se muestra en la Tabla 6.6.2.

Tabla 6.6.2. Balance de recuperación de carbono obtenido en E2.

	Cantidad (Kg/m ³)	Cantidad de carbono (kg de C/m ³)	Porcentaje de recuperación (%)
Tolueno consumido	59.2	54.1	
CO ₂ producido	85.9	23.4	43
Biomasa producida	3.44	1.72	5

El 43% del carbono de tolueno consumido fue recuperado como CO₂, mientras que el 5% del carbono se usó para constituir biomasa y el restante 54% fue retenido como carbonatos, intermediarios, polímeros extracelulares o fue perdido (lavado) durante las adiciones de agua al sistema.

El sistema mostró un incremento en la actividad degradativa después de la adición de agua. Sin embargo, ésta no pudo ser mantenida en altos niveles debido probablemente a que la adición de agua ocasionó el lavado de los nutrientes adheridos a la vermiculita.

6.2.3 Efecto de la adición de nutrientes sobre la capacidad degradativa del biofiltro (E3).

Los materiales de soporte orgánicos (tales como composta, turba, corteza, etc) contienen suficientes nutrientes para sostener la oxidación biológica de COVs, sin embargo la mineralización de este tipo de materiales promueve a la larga compactación y caídas de presión (Devinny y col., 1999). En el presente estudio se usó un material inerte como material de empaque, el uso de materiales de soporte inorgánicos permite una distribución del gas más uniforme, así como un mejor contacto con el material biológico. Estas características resultan en una operación mas consistente ya que hay un mejor control tanto de la caída de presión como de la cantidad de nutrientes y el pH (Sorial y col., 1995). Sin embargo, la limitación de este tipo de materiales de empaque es que precisa de la adición de nutrientes.

En el tercer experimento (E3), se adicionó medio mineral al sistema de biofiltración y se usó una mezcla de vermiculita y carbón activado como material de empaque con el objeto de mantener la alta actividad biológica degradativa. Estudios previos realizados con benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (Ortiz y col., 1998) muestran que al usar una mezcla de carbón activado vermiculita en el sistema de biofiltración se obtiene un mejoramiento en la estabilidad del proceso y en la eficiencia de remoción de los contaminantes, ésto comparado con un sistema de biofiltración con solo vermiculita como material de soporte. El uso del carbón activado y la vermiculita reduce el espacio vacío, incrementa el área superficial, mejora la estabilidad mecánica y permite la adición directa de nutrientes.

Las cinéticas de C.E., producción de CO_2 y caída de presión en E3 se muestran en la Figura 6.6.3.

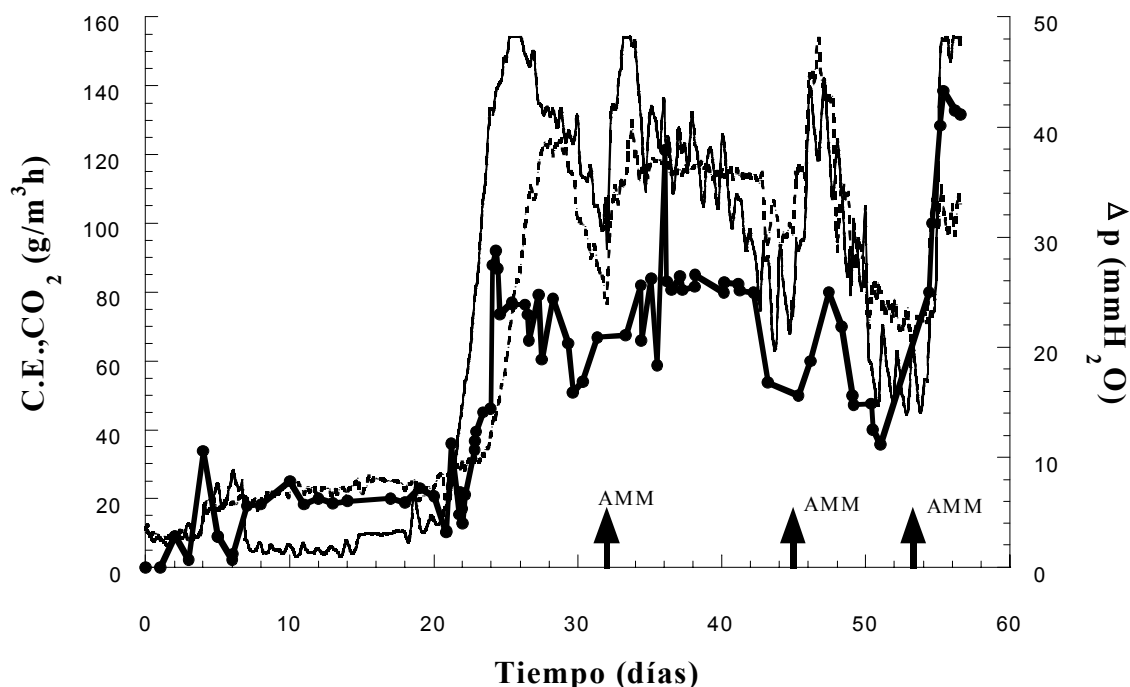


Figura 6.6.3. Evolución de la capacidad de eliminación (—●—), producción de dióxido de carbono (—) y caída de presión (---) en función del tiempo en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum* para el tercer experimento (E3). Adición de medio mineral (AMM) en los días 32, 45 y 53 (↑).

Después de una fase de retardo de aproximadamente 20 días, la C.E. se incrementó hasta alcanzar un valor de $80 \text{ g/m}^3\text{h}$, permaneciendo constante durante 25 días de operación del biofiltro. La eficiencia de remoción durante este periodo fue de 50% con una concentración de tolueno de 5 g/m^3 en la corriente de aire. La adición de nutrientes se realizó cuando la C.E. decreció hasta valores de $40 \text{ g/m}^3\text{h}$. La estrategia de la adición de nutrientes (tres adiciones como se puede observar en la Figura 6.6.3) permitió mantener el sistema de biofiltración fúngico con capacidades de eliminación de $80 \pm 10 \text{ g/m}^3\text{h}$ durante otros 25 días, es decir, hasta los 50 días de operación. El incremento en la biomasa que se obtuvo a diferentes niveles del biofiltro en este experimento (Tabla 6.6.7, pag. 124) nos permite afirmar que el incremento y mantenimiento de la C.E. se deben a la adición de nutrientes. Por otro lado, el incremento en la biomasa se corroboró a través de la determinación de una mayor caída de presión en el reactor, la Δp alcanzó valores superiores a los obtenidos en los

experimentos previos, sin embargo en este caso no se observó compactación del lecho empacado.

Durante este tercer experimento (E3), el balance de carbono nos permite aseverar que el 44% del tolueno consumido fue convertido hasta CO_2 y el 8.3 % de carbono fue utilizado para la producción de biomasa, como se observa en la Tabla 6.6.3.

Tabla 6.6.3. Balance de recuperación de carbono obtenido en E3.

	Cantidad (Kg/m^3)	Cantidad de carbono ($\text{kg de C}/\text{m}^3$)	Porcentaje de recuperación (%)
Tolueno consumido	66.0	60.3	
CO_2 producido	96.2	26.2	44
Biomasa producida	5.7	2.9	8.3

Después de 55 días de operación, también se evaluó la C.E. a diferentes alturas del biofiltro en E3 (Figura 6.6.4). La C.E. máxima se obtuvo en la parte inferior del reactor ($160 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$), esta parte corresponde a la salida del biofiltro, la adición del medio mineral permitió un incremento en la C.E. de ésta parte del reactor hasta un valor de $200 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$. Las altas C.E.s en la salida del biofiltro coinciden con pérdidas menores de humedad en el sistema como se puede observar en la Tabla 6.6.7, pag. 124. Por el contrario, en la sección superior del reactor que corresponde a la entrada del aire contaminado, donde los fenómenos de secado son mayores, se encontró una C.E. de solamente $20 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$, en esta sección del biofiltro se determinó un contenido de humedad de 30%. Cabe mencionar que la adición de medio mineral incrementó la C.E. a lo largo de todo el biofiltro, la C.E. global se incrementó de $50 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$ a $100 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$, en la entrada del biofiltro la C.E. aumentó de prácticamente 0 hasta $50 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$. La sección media alcanzó C.E. de más de $100 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$ después de la adición y en la parte inferior donde la C.E. fue la máxima antes y después de la adición de medio mineral, ésta fue de 160 hasta $200 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$, respectivamente.

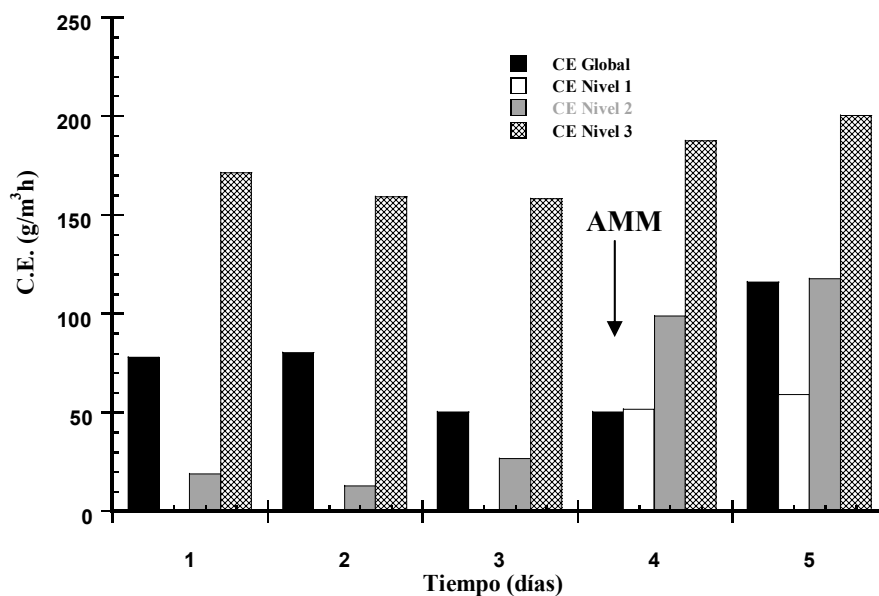


Figura 6.6.4. Capacidades de eliminación en diferentes niveles del biofiltro. EC global en el reactor; Nivel 1 entrada del reactor; Nivel 2 parte media del reactor; Nivel 3 salida del reactor, respectivamente. AMM adición de medio mineral. Datos obtenidos en E3.

Debido a lo alentador de los resultados obtenidos durante el tercer experimento se llevó a cabo un último experimento, E4, siguiendo la estrategia de adición de nutrientes. El objetivo principal de este experimento fue mantener al máximo la actividad metabólica del microorganismo evitando las limitaciones de agua o nutrientes. Durante E4 las adiciones de medio mineral fueron periódicas (cada 15 o 17 días). En la Figura 6.6.5, se presentan la C.E., la producción de CO_2 y la Δp obtenidas durante este experimento.

El comportamiento de los parámetros antes mencionados fue similar al obtenido en otros experimentos, el período de arranque se inició el día 12 de operación. Cuando la C.E. alcanzó un máximo de $100 \text{ g/m}^3\text{h}$ a los 14 días, dos adiciones de nutrientes a los 18 y 28 días respectivamente permitieron la obtención de capacidades de eliminación de hasta $400 \text{ g/m}^3\text{h}$, durante 5 días. Se observó un periodo de estabilidad de aproximadamente 15 días con un promedio de C.E. de $250 \text{ g/m}^3\text{h}$ (44 días de operación). Durante este periodo la eficiencia de remoción fue de 98% para una concentración de tolueno a la entrada entre 5-6 g/m^3 . Entre los días 44 y 46 el aire a la entrada del biofiltro no pudo ser humidificado debido a problemas operacionales. Debido a esto el sistema perdió humedad observándose secado del mismo, lo cual ocasionó un importante decremento en la C.E. global hasta 60

$\text{g/m}^3\text{h}$ cuando la humidificación del sistema fue restablecida. En el día 55 de operación se realizó una nueva adición de nutrientes, sin embargo la C.E. solo alcanzó un máximo de $150 \text{ g/m}^3\text{h}$ y el sistema no pudo ser recuperado.

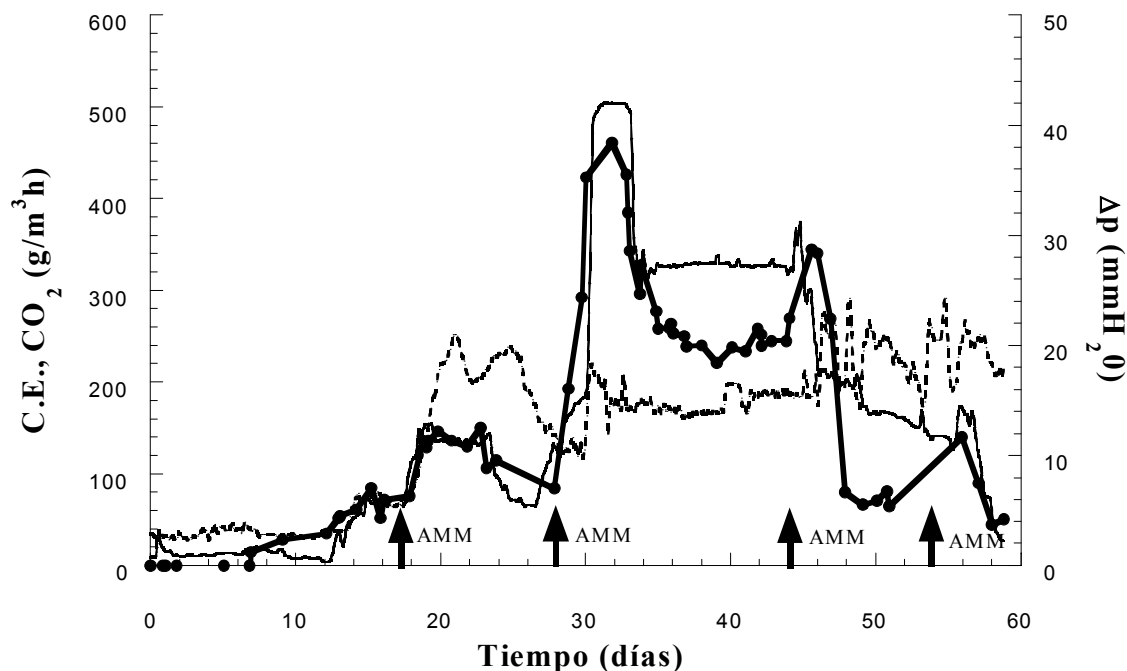


Figura 6.6.5. Evolución de la capacidad de eliminación (—●—), producción de dióxido de carbono (—) y caída de presión (---) en función del tiempo en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum* en el cuarto experimento (E4). Adición de medio mineral (MMA) los días 17, 28, 44 y 54 (↑).

La distribución de biomasa en E4 fue más homogénea como se puede observar en la Tabla 6.6.7, pag. 124, obteniendo un promedio de biomasa en el biofiltro de 41 mg/gMS . Las adiciones periódicas de medio mineral minimizaron el secado del biofiltro y permitieron una mejor distribución de la biomasa a lo largo de todo el reactor. Los resultados obtenidos en E4, cuando la adición del medio se realizó antes de que la C.E. decreciera fueron mejores a los observados durante el tercer experimento. El promedio de biomasa fue de 41 mg/gMS y al igual que en E3 no se observó compactación del material empacado.

El balance de recuperación de carbono como CO_2 y biomasa se presenta en la Tabla 6.6.4.

Tabla 6.6.4. Balance de recuperación de carbono obtenido en E4.

	Cantidad (Kg/m ³)	Cantidad de carbono (kg de C/m ³)	Porcentaje de recuperación (%)
Tolueno consumido	156.9	143.3	
CO ₂ producido	230.4	62.8	43.8
Biomasa producida	7.0	3.5	5

En la Tabla 6.6.6 (pag. 123) se presenta una comparación del tolueno consumido, del CO₂ total producido y la C.E. promedio obtenidos en los biofiltros de los cuatro diferentes experimentos. En E4, donde las adiciones de medio mineral fueron periódicas y se realizaron antes de la pérdida de actividad metabólica del sistema, se consumió hasta 3 veces más tolueno que el consumido durante los otros tres experimentos. La biomasa obtenida en el cuarto experimento fue aproximadamente el doble de la obtenida en el primer experimento. Esta cantidad de biomasa no fue suficiente para ocasionar el taponamiento o compactación del biofiltro y permitió obtener velocidades de remoción muy altas y estables.

Para asegurar la operación estable de bio-reactores de fase gaseosa, sujetos a altas cargas de contaminantes, dos problemas clave deben ser superados: 1) la inactivación de la población microbiana por largos periodos de operación y 2) el taponamiento de los materiales de empaque debido a exceso de biomasa (Song y Kinney, 2000). Una razón común del decremento en la actividad biodegradativa a través del tiempo en biofiltros es la insuficiencia en la disposición de nutrientes a la bio-película (Cherry y Thompson, 1997). Debido a que el nitrógeno es uno de los mayores constituyentes celulares, este puede ser un nutriente limitante, si las cantidades adecuadas no se encuentran disponibles para el crecimiento microbiano. Morgenroth y col., 1996 mostraron que las eficiencias de remoción de un biofiltro degradador de hexano se incrementaron a 99% después de la adición de una solución concentrada de nitrato. En este mismo sentido, Don 1985 y Auria y col., 2000, reportan que la adición de nutrientes en biofiltros usados para la remoción de tolueno mostró tener un efecto significativo en el incremento en la remoción de este

contaminante. Además, los problemas de limitación de nutrientes pueden ocasionar la formación de mutantes y el daño de sistemas enzimáticos involucrados en vías metabólicas, lo cual ocasionará la posterior pérdida en la actividad biológica. Duetz y col., 1991 demostraron que una población microbiana que contenía el plásmido TOL decreció gradualmente bajo condiciones de crecimiento en benzoato y mutantes que contenía el plásmido parcialmente eliminado se convirtieron en la población dominante debido a su velocidad de crecimiento. Leddy y col., 1995 también encontraron que la exposición prolongada de *Pseudomonas putida* 54G a tolueno resulta en la formación de numerosos mutantes que no tenían la capacidad de degradar tolueno.

Las adiciones continuas de medio permiten obtener C.E. altas a través del incremento en la biomasa y la actividad (Acuña y col., 1999; Woertz y col., 1999), sin embargo el taponamiento debe ser controlado. El exceso de biomasa fúngica también puede causar severos problemas en la operación de biofiltros incluyendo altas caídas de presión y bajas eficiencias de remoción de contaminantes (Sorial y col., 1995; Weber y Hartmans, 1996). Diferentes métodos han sido propuestos para prevenir la acumulación excesiva de biomasa incluyendo el control de nutrientes, la remoción mecánica de biomasa y el control de la distribución de la biomasa. La limitación de nutrientes ha sido empleada (Kirchner y col., 1991; Weber y Hartmans, 1996) pero en varios casos esto resultó en un decremento significativo en la capacidad de remoción del contaminante.

En E3 y E4 del presente trabajo, las adiciones de medio mineral permitieron que el sistema fúngico alcanzara y se mantuviera con capacidades de eliminación de hasta 200 g/m³h, sin problemas de taponamiento producido por excesiva cantidad de biomasa. Por otro lado, la adición de nutrientes permitió un mejor control del contenido de humedad obteniéndose un promedio de 55%. El mantenimiento de la humedad es esencial para la supervivencia y el metabolismo de los microorganismos presentes en el sistema. Contenidos de humedad bajos pueden ocasionar o bien favorecer la compactación del sistema. Contenidos de humedad en un rango entre 40 y 60% por peso son considerados adecuados (Leson y Winer, 1991).

6.2.4 Efecto de la carga sobre la C.E..

Este experimento se realizó con concentraciones de tolueno en un rango entre 3 y 9 g/m³ en el aire de entrada del reactor, en los días 18 a 28 de operación del cuarto biofiltro E4.

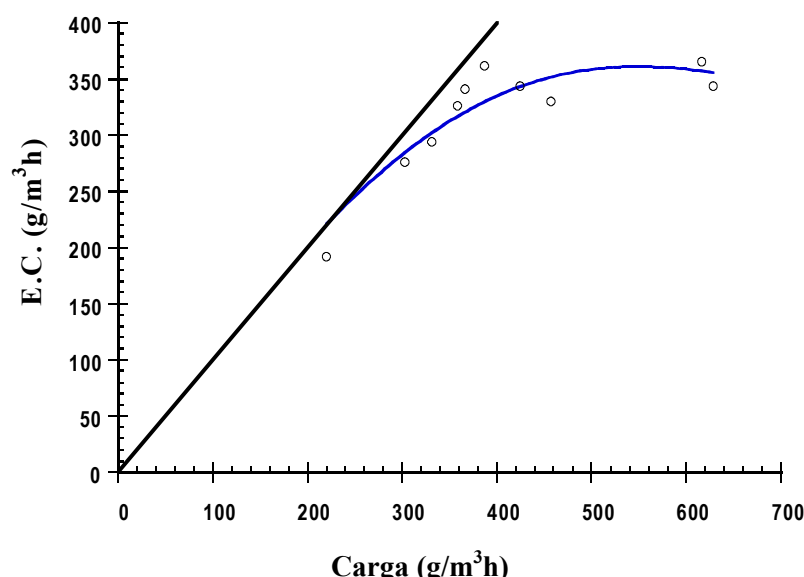


Figura 6.6.6. Efecto diferentes cargas de tolueno sobre la capacidad de eliminación. Estos experimentos fueron llevados a cabo entre los días 18 y 28 de operación en E4.

Los resultados de este experimento de carga se observan en la Figura 6.6.6. Las concentraciones de tolueno evaluadas corresponden a cargas entre 220 y 628 g/m³h. Las capacidades de eliminación entre 220 y 361 g/m³h mostraron una relación lineal con respecto a las cargas de tolueno usadas. Se obtuvo un máximo de C.E. de 361 g/m³h cuando la carga de tolueno fue de 400 g/m³h. Este valor es similar al reportado por Woertz y col. 1999, para un biofiltro fúngico usado para la remoción de vapores de tolueno y es al menos seis veces mayor que los reportados para sistemas de biofiltración bacterianos típicos.

6.2.5 Mantenimiento de altas actividades biológicas en el biofiltro fúngico por largos periodos de tiempo

En la literatura han sido reportadas altas actividades degradativas (de hasta 200 g/m³h) para la remoción de compuestos orgánicos en biofiltros (Morales y col., 1998; Woertz y col., 1999). Sin embargo, aún no es claro si dichas actividades pueden ser mantenidas por largos

periodos de tiempo. Una vez que se estableció que la adición periódica de nutrientes constituye una estrategia adecuada para mantener altas C.E. sin problemas de taponamiento por exceso de biomasa, se evaluó la posibilidad de mantener el proceso por periodos de tiempo mayores. En los resultados que se muestran a continuación el biofiltro fúngico se operó durante 100 días (Figura 6.6.7), logrando mantener una C.E. promedio de $250 \text{ g/m}^3\text{h}$, lo anterior fue resultado de la adición de nutrientes cada 3 o 4 días. Cabe resaltar que en el momento en el cual la operación del reactor fue interrumpida para determinar actividades enzimáticas vinculadas a su capacidad degradativa las capacidades de eliminación no habían mostrado ninguna tendencia a decrecer, sugiriendo que el biofiltro se podía seguir operando con altas C.E. por mayor tiempo.

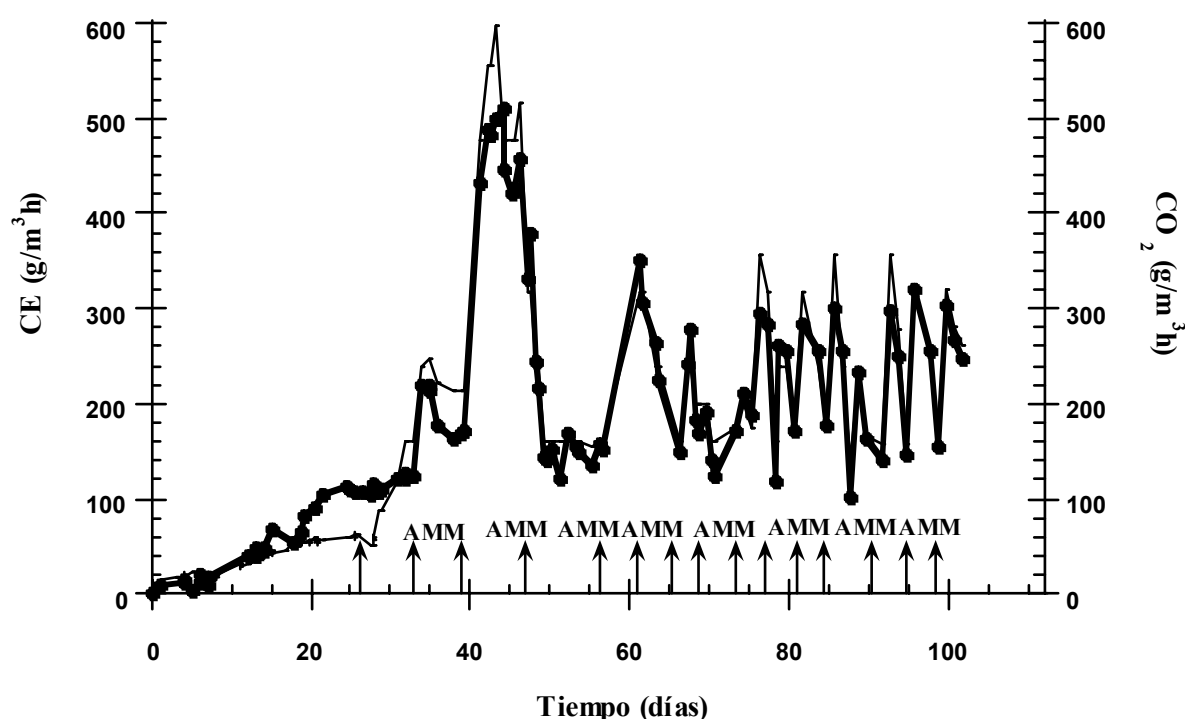


Figura 6.6.7. Evolución de la capacidad de eliminación (—●—) y de la producción de dióxido de carbono (—) en función del tiempo en un biofiltro inoculado con *S. apiospermum* en el quinto experimento (E5). Adición periódica de medio mineral (AMM).

En la Figura 6.6.7 se puede observar que el consumo de tolueno se inició aproximadamente a los 10 días de haber inoculado el biofiltro con esporas de *S. apiospermum*. En la primera parte del proceso que corresponde a la germinación de las esporas, el consumo de tolueno y la producción de CO_2 fueron bajos, posteriormente durante el crecimiento exponencial del microorganismo se alcanzaron C.E.s de $120 \text{ g/m}^3\text{h}$. Esto se obtuvo a los 20 días de

operación. El día 25 se realizó la primera adición de medio mineral, ésta permitió que la C.E. se mantuviera alrededor de $130 \text{ g/m}^3\text{h}$ hasta los 35 días de operación. La segunda adición ocasionó un incremento de la C.E. hasta $200 \text{ g/m}^3\text{h}$ y finalmente la tercera adición permitió obtener un pico máximo de actividad metabólica alcanzando C.E. de hasta $500 \text{ g/m}^3\text{h}$. Las adiciones posteriores mantuvieron la C.E. del biofiltro en valores alrededor de $250 \text{ g/m}^3\text{h}$.

Al igual que en los experimentos precedentes, el consumo de tolueno estuvo asociado a la producción de CO_2 , sin embargo en las etapas en las cuales la C.E. llegó a ser de hasta $500 \text{ g/m}^3\text{h}$ los equipos de determinación de CO_2 llegaban a su límite superior de detección, por lo cual los datos de CO_2 podrían estar subestimados. Esto se reflejó en la cantidad de CO_2 recuperado, durante los 100 días de operación se consumieron 438.1 kg/m^3 (400 kgC/m^3) y se produjeron 453 kg de CO_2 / m^3 equivalentes a 123.6 kgC/m^3 , es decir, solamente el 32% del tolueno consumido fue cuantificado como CO_2 .

Tabla 6.6.5. Porcentajes de humedad, biomasa y C.E. a diferentes niveles del reactor para E5.

	Entrada	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Salida
Humedad (%)	31	42	51	59	73
Biomasa (mg/gMS)	33	40	58	52	125
C.E. ($\text{g/m}^3\text{h}$)	76.2		103.6		217.6

De forma similar al análisis realizado en E3, se puede establecer una correlación entre la humedad, la cantidad de biomasa y el consumo de tolueno en diferentes niveles del biofiltro. Esta relación fue también obtenida en el último experimento E5 y se presenta en la Tabla 6.6.5, en la parte superior del reactor nivel 1 (entrada del aire húmedo con una concentración de alrededor de 5 g/m^3 de tolueno) donde los fenómenos de secado son mayores (contenido de humedad 31%) el crecimiento es menor y por tanto el consumo de tolueno (C.E.) es bajo. En la parte media del biofiltro donde la humedad se mantiene alrededor de 51%, la cantidad de biomasa fue superior (58 mg/gMS) y también la C.E. fue mayor ($103.6 \text{ g/m}^3\text{h}$). Finalmente, en la salida donde se mantuvo la humedad inicial (70%)

se obtuvo la mayor cantidad de biomasa y la C.E. de eliminación fue muy alta, debido a que en este nivel el hongo alcanzó un importante crecimiento y a que bajo estas condiciones la actividad metabólica se ve favorecida.

En la Tabla 6.6.6, se presenta un resumen de las cantidades de tolueno consumido, CO₂ producido y C.E. promedio obtenidas durante las diferentes etapas de optimización del biofiltro fúngico.

Tabla 6.6.6. Cantidad total de tolueno consumido, CO₂ producido y C.E. promedio obtenidos a lo largo de todo el tiempo de operación en los diferentes experimentos.

Experimento	Duración (días)	Tolueno total consumido (kg/m ³ _r)	Dióxido de carbono total producido (kg/m ³ _r)	EC promedio (g/m ³ _r h)
E1	20	17.6	29.8	45
E2	60	59.2	85.9	44
E3	60	66.0	96.2	80
E4	60	156.9	230.4	133
E5	100	438.1	453.0	200

Si comparamos los experimentos E2, E3 y E4, que tuvieron la misma duración, se puede observar que la adición de agua en E2 no incrementó significativamente la C.E. promedio en comparación con la obtenida en el primer experimento. Esta estrategia no favoreció el proceso en general. La adición de nutrientes realizadas cuando la actividad degradativa decreció en E3 permitió sostener una C.E. promedio más alta, sin embargo, las fluctuaciones en el proceso de biofiltración ocasionaron que los resultados globales no sean tan interesantes como los que se obtuvieron en E4. Durante este experimento (E4) la adición de nutrientes fue periódica y no se dejó que la actividad metabólica decreciera, la C.E. promedio fue de 130 g/m³h y se eliminó de 3 a 4 veces más tolueno que en los anteriores experimentos en el mismo tiempo de operación (60 días). Durante el último experimento E5, donde se evaluó la factibilidad de mantener el proceso de biofiltración por periodos de tiempo mayores usando la estrategia de frecuentes adiciones de nutrientes (cada 3 o 4 días), se mostró que es posible mantener altas C.Es (promedio de 200 g/m³h). En este último experimento se consumió 4 veces más tolueno que en E4 y hasta el momento en el

que se finalizó el proceso no se observaron decrementos en la actividad metabólica ni se tuvieron problemas de taponamiento o compactación del material filtrante debidos a exceso de biomasa.

Los buenos resultados que se obtuvieron en E4 y E5 pueden explicarse analizando las condiciones existentes en el reactor durante dichos procesos. En la Tabla 6.6.7, se presentan los contenidos de humedad (%) y la cantidad de biomasa en diferentes niveles del reactor obtenidos en los 5 experimentos. Estos dos factores son críticos para los procesos metabólicos que rigen el funcionamiento de los biofiltros. En lo que se refiere al contenido de humedad, durante el primer experimento los fenómenos de secado (la humedad promedio disminuyó del 70% inicial a 42%) tuvieron un efecto negativo sobre el funcionamiento del reactor ocasionando el decremento de la actividad degradativa del hongo y favoreciendo el compactamiento del material de soporte. La adición de agua y de medio mineral en E2 y E3 permitieron mantener la humedad promedio del reactor alrededor de 55%, este hecho se vió reflejado en la C.E. promedio que se determinó resultando similar en ambos experimentos (entre 45 y 50 g/m³h).

Tabla 6.6.7. Valores finales de contenido de humedad y biomasa para los distintos experimentos. E1 sin adición de agua; E2 adición de agua; E3 y E4 adición de medio mineral. Los valores fueron determinados en muestras de cinco niveles del biofiltro.

	Contenido de humedad (%)					Biomasa (mg/g MS)				
Altura (cm)	E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5
De 0 a 12	23	13	20	50	31	6.8	10.4	24.5	39	33.5
De 12 a 24	38	45	33	54	42	28.1	27.0	28.4	39	40.4
De 24 a 35	40	52	49	60	51	32.4	26.3	34.7	43	57.9
De 35 a 46	50	63	69	67	59	12.6	20.2	38.0	42	52.1
De 46 a 58	52	64	69	68	73	12.7	18.6	42.5	41	125
Promedio	42	52	55	61	61	18	20	33	41	61.8

Al incrementar el mantenimiento del contenido de humedad durante los dos últimos experimentos (E4 y E5) en 61%, a través de la adición periódica de medio mineral, se incrementaron las C.E. promedio a 130 y 200 g/m³h, respectivamente. El efecto de la

adición de nutrientes no se debe solamente al mantenimiento de la humedad inicial, sino también al hecho de que la presencia de sales minerales permite mantener el sistema metabólico del hongo en las mejores condiciones. La presencia de agua suficiente así como el sostenimiento de las concentraciones necesarias de los distintos nutrientes, mantienen altas actividades metabólicas y el funcionamiento adecuado de los sistemas enzimáticos, como se corroborará posteriormente a través de la determinación de las actividades enzimáticas en el biofiltro. Por otro lado, también se puede observar que la estrategia de adición periódica de nutrientes incrementó la cantidad de biomasa promedio, ya que en E4 y E5 se obtuvieron mayores cantidades de biomasa. Esto nos da un indicio de que el mantener el crecimiento del hongo en el biofiltro permite el incremento en el consumo del compuesto aromático.

A partir de los resultados obtenidos a lo largo del proceso de optimización, se puede aseverar que al mantener la humedad promedio en 61% y al incrementar la cantidad de biomasa promedio hasta 62 mg/gMS, a través de la adición periódica de nutrientes, se pueden mantener muy altos consumos de tolueno en el sistema de biofiltración inoculado con *S. apiospermum* por al menos 100 días de operación, sin decrementos en la actividad biológica.

6.2.6 Actividad enzimática oxigenasa asociada al funcionamiento del biofiltro fúngico.

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el estudiar los fenómenos metabólicos que rigen el proceso de biofiltración. Como ya se mencionó, los procesos de biofiltración habían sido vistos como cajas negras. En los últimos años ha surgido un nuevo interés por entender los procesos biológicos y bioquímicos que permiten el funcionamiento de estos sistemas (Kwok y col., 1997; Sun y Wood, 1997; Deront y col., 1998; Song y Kinney, 2000). En esta sección se presenta la correlación que existe entre la actividad enzimática de *S. apiospermum* y el funcionamiento del biofiltro fúngico.

Como se mencionó previamente, la actividad biológica de la biomasa presente en el biofiltro puede ser estimada a través de la determinación del consumo de oxígeno (Deront y col., 1998). Esta también es una medida de la actividad de las oxigenasas vinculadas a la

degradación de tolueno en biomasa fúngica presente en el biofiltro. Los resultados de consumo de oxígeno obtenidos con muestras de diferentes niveles del biofiltro se observan en la Figura 6.6.8. El oxígeno disuelto decrece linealmente con el tiempo indicando que el consumo de oxígeno fue constante.

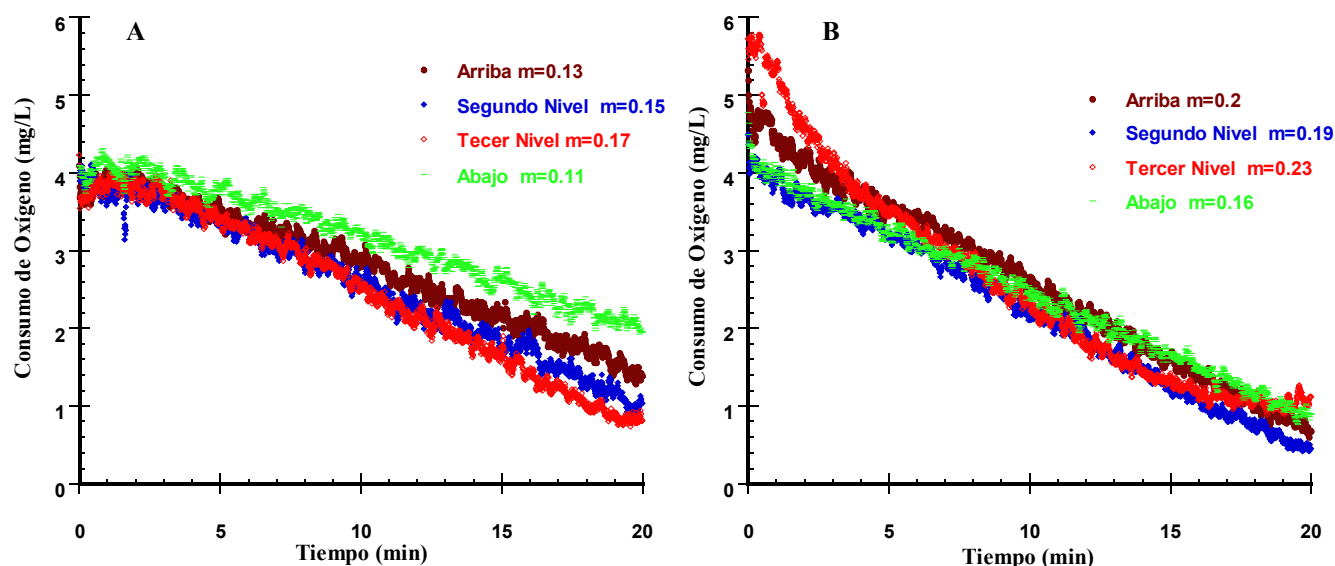


Figura 6.6.8 Velocidades de consumo de oxígeno con muestras de diferentes niveles del biofiltro en E5. A) consumos de oxígeno en ausencia del sustrato (RE); B) consumos de oxígeno en presencia de tolueno.

En la Figura 6.6.8 A se observa el consumo de oxígeno debido a respiración endógena, éste fue menor que el que se obtiene en presencia de tolueno (Figura 6.6.8 B). Los consumos de oxígeno fueron similares para todos los niveles del biofiltro.

La biomasa presente en las muestras de soporte húmedo usadas para cada análisis enzimático (2 gramos) fue corregida por la humedad determinada en cada uno de los niveles del reactor. En la Tabla 6.6.8, se muestran los valores de biomasa usados para determinar la actividad enzimática en cada nivel del biofiltro. En todos los experimentos de biofiltración la biomasa fue menor en la parte superior del reactor contrario a lo reportado por Sun y Wood, 1997 quienes reportan que el desarrollo de la biopelícula fue mayor en la parte superior del reactor, cercana a la entrada de los nutrientes. Esto se debió a que en la parte superior del biofiltro la pérdida de humedad fue mayor.

Tabla 6.6.8. Humedad, biomasa por g. materia seca (gMS) y biomasa corregida por humedad

Niveles	Humedad (%)	Biomasa (mg/gMS)	Biomasa total (mg) *
Nivel 1	31	33.55	46.30
Nivel 2	42	40.41	46.88
Nivel 3	51	57.90	56.75
Nivel 4	59	52.03	42.66
Nivel 5	73	125	67.45
Promedio	61	61.8	48.2

* biomasa total utilizada para medir actividad enzimática corregida por humedad en cada nivel

Los valores de biomasa corregida fueron usados para calcular la actividad enzimática específica que se presenta en la Tabla 6.6.9, la cual fue medida en cuatro niveles del reactor. La actividad enzimática volumétrica en $\text{nmolO}_2/\text{min}$ es mayor en la parte superior del reactor, sin embargo, los valores de actividad enzimática específica son similares en los diferentes niveles del biofiltro. Lo cual sugiere que la actividad enzimática específica será siempre constante y las diferencias en la actividad enzimática global (responsable del consumo de tolueno y por lo tanto en la capacidad de eliminación medida en el biofiltro) está fuertemente correlacionada con las condiciones de humedad y cantidad de biomasa presentes en cada sección y en todo el reactor.

Tabla 6.6.9. Actividad oxigenasa específica medida en cuatro niveles del reactor.

Muestras en el reactor	Velocidad de consumo—RE $\text{nmolO}_2/\text{min}$	Biomasa total (mg)	Actividad enzimática específica ($\text{nmolO}_2/\text{min mg}_{\text{biom}}$)
Entrada	131.3	46.30	2.8
N2	112.5	46.88	2.4
N3	112.5	56.75	2.0
Salida	93.7	42.66	2.2

Como se mencionó anteriormente, se estableció un perfil descendiente de actividad enzimática volumétrica a lo largo del biofiltro, la biomasa corregida por humedad en los

diferentes niveles fue similar, excepto en el nivel 3. La actividad específica fue similar en los diferentes niveles del bioreactor, ligeramente mayor en la parte superior. Esto podría deberse a que en la parte inferior del biofiltro la cantidad de tolueno que induce la producción de la enzima es menor, puesto que éste se va consumiendo a lo largo del biofiltro.

La relación entre la actividad enzimática y la concentración de la biomasa a lo largo del biofiltro que encontramos en nuestro sistema fúngico es similar a la encontrada por Song y Kinney, 2000, quienes determinan la actividad deshidrogenasa para cuantificar la respuesta en un reactor bidireccional. En ambos casos la biomasa se mantiene en los mismos rangos de concentración. De esta manera, la actividad biodegradativa determinada mediante análisis de actividad enzimática resultó ser una función de la acumulación de la biomasa y refleja los perfiles de remoción del contaminante a lo largo de la columna.

Los datos de actividad enzimática medida en la biomasa de *S. apiospermum* se pueden relacionar con las capacidades de eliminación que se obtienen en el reactor, éstas se muestran en la Tabla 6.6.10 y se comparan con las obtenidas experimentalmente. Las C.E. que se obtienen a partir de los valores de actividad enzimática son muy similares a las determinadas experimentalmente. Es decir, la determinación de actividades enzimáticas nos permite predecir y explicar los consumos o capacidades de eliminación que se determinan en el biofiltro fúngico de eliminación de tolueno.

Tabla 6.6.10. Correlación entre la C.E. calculada a través de la actividad enzimática específica medida en muestras del biofiltro y la C.E. experimental.

Nivel	Biomasa mg/gMS	Actividad enzimática nmolO ₂ /min mg _{biom}	C.E. calculada (g/m ³ h)	C.E. experimental (g/m ³ h)
Entrada	33.55	2.8	81.70	76.20
Nivel2	40.41	2.4	83.44	(ND)
Nivel3	57.91	2.0	100.00	103.6
Nivel 4	52.03	2.2	103.85	(ND)
Salida	124.9	2.0	215.00	217.6

Existe una relación entre la cantidad de biomasa final producida en el biofiltro, la actividad enzimática y la capacidad de eliminación promedio que se obtiene como medida del funcionamiento general del reactor (Tabla 6.6.11).

Tabla 6.6.11. Relación entre actividad enzimática medida experimentalmente y consumo de tolueno en un biofiltro de 2.9L volumen de empaque, con los diferentes valores de biomasa promedio obtenidos en los experimentos en el biofiltro (*).

Experimento	Biomasa (mg/gMS)	Actividad enzimática específica (nmol/min mg _{biom})	C.E. calculada (g/m ³ h)	C.E. experimental (g/m ³ h)
E1	18	4.68	72.5	45
E2	20	4.68	80.5	44
E3	33	4.68	132.9	80
E4	41	4.68	165	133
E5	61.8	4.68	260	200

En la tabla 6.6.7 se puede observar que las C.E. calculadas a partir de actividad enzimática son superiores a las promedio determinadas en los distintos experimentos. Esto se debe a que las C.E. se calcularon a partir de la actividad máxima medida en los experimentos en líquido, es decir que con la cantidad de biomasa obtenida en cada experimento el consumo calculado es el máximo que podría obtenerse en el biofiltro, bajo las condiciones mas adecuadas de humedad, cantidad de sustrato y presencia de todos los nutrientes necesarios. En los experimentos 4 y 5, donde las condiciones fueron mejores, la divergencia entre la C.E. calculada y la experimental se hace mas pequeña.

En cuanto a la relación de las actividades enzimáticas y la actividad degradativa en reactores, Sun y Wood, 1997 reportan el uso de un reactor para la mineralización de tricloro etileno (TCE), inoculado con un cultivo puro de *Burkholderia cepacia* PR123 cepa mutante de *Burkholderia cepacia* G4, que expresa constitutivamente la tolueno orto-monooxigenasa (TOM), enzima que actúa en la degradación del TCE. Usando un electrodo de oxígeno y fenol como sustrato, la actividad de la TOM en células resultantes del reactor, los autores muestran que la pérdida de la actividad de la TOM estuvo correlacionada con el

decremento en la degradación de TCE en el bioreactor. La actividad de la TOM fue recuperada al someter al reactor a periodos de limitación de nutrientes, con la inducción de un compuesto aromático tal como el fenol o el tolueno, *B. cepacia* G4 expresa a la TOM, la cual puede cometabolizar TCE en bioreactores (Ensley y Kurisko, 1994; Folsom y Chapman, 1991; Mars y col., 1996). Sin embargo, el uso de estos inductores aromáticos no es un método atractivo porque éstos a su vez son también compuestos contaminantes y por otro lado también existe el problema de la inhibición de la TOM. *B. cepacia* PR123 tiene la habilidad de degradar TCE sin necesidad del inductor, puesto que expresa la TOM constitutivamente (Shields y col., 1995).

La Figura 6.6.9 presenta la relación entre los datos de C.E. experimental y los calculados a través de la actividad enzimática en diferentes sistemas de estudio.

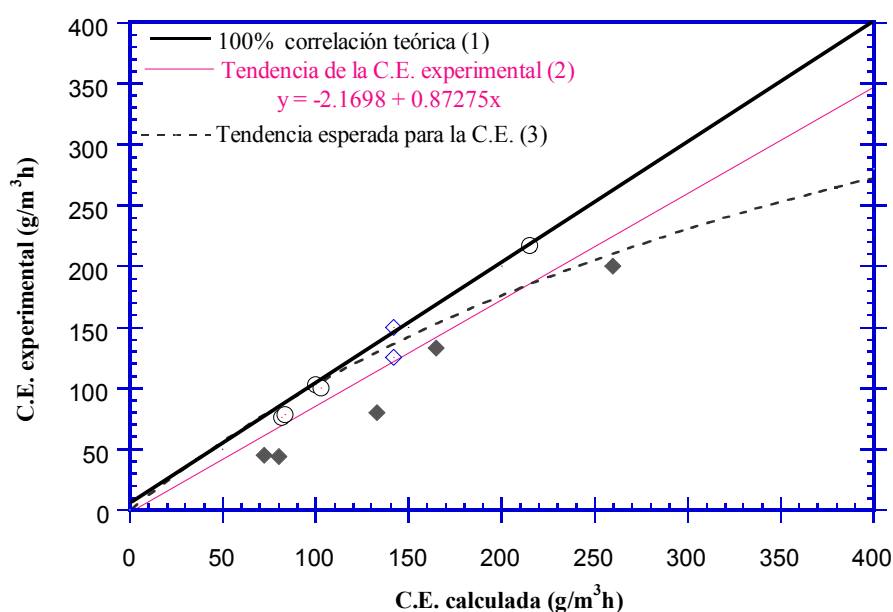


Figura 6.6.9 Comparación de la C.E. calculada a través de actividades enzimáticas con la C.E. experimental medida en distintos sistemas (biofiltros a escala laboratorio y biofiltro). (♦) Datos calculados a partir de biomasa promedio obtenidas en los distintos experimentos de biofiltración y actividad enzimática máxima obtenida con biomasa producida en líquido (◇) Datos obtenidos de experimentos en biofiltros escala laboratorio. (○) Datos obtenidos de biofiltro (2.9L de volumen de empaque).

En general, la correlación que existe entre la C.E. experimental y la calculada para el conjunto de experimentos (2) presenta una pequeña desviación en relación a la teórica (1), con una pendiente de 0.87. Las C.E. calculadas usando la biomasa promedio de los distintos

experimentos de biofiltración y la actividad enzimática máxima medida en líquido (Tabla 6.6.4) se encuentran por debajo del 100% de correlación, el hecho de que todos los datos determinados experimentalmente sean menores que la relación teórica es algo que se esperaba ya que los consumos de tolueno en el biofiltro no pueden ser mayores de lo que la capacidad biológica del microorganismo permite. La correlación entre la C.E. calculada con biomasa y actividades específicas reales y la medida experimentalmente en el biofiltro es prácticamente de 1, lo anterior permite aseverar que para las condiciones de operación en E5 el biofiltro está limitado únicamente por reacción biológica. También se presenta la tendencia esperada para la C.E. experimental (3), el análisis de la tendencia teórica podría indicar que la extrapolación es infinita, a mayor actividad enzimática mayor C.E. lo cual también implicaría un aumento en la biomasa. Sin embargo, se sabe que los biofiltros alcanzan una C.E. experimental máxima que ocasiona que la curva tienda a una asíntota, donde la C.E. no se puede incrementar mucho más ya que se darán otras limitaciones tales como el taponamiento del reactor debido a una excesiva biomasa y altas caídas de presión. Por ejemplo para alcanzar una C.E. de $500 \text{ g/m}^3\text{h}$ considerando una actividad enzimática específica de $2.4 \text{ nmol/min mgbiomasa}$ se puede calcular una biomasa de alrededor de 142 mg/gMS , el doble de la máxima medida experimentalmente, dicha cantidad de biomasa ocasionaría altas caídas de presión y taponamiento del biofiltro.

6.2.7 Evaluación de la población microbiana.

Se realizaron observaciones en un microscópicas de varias muestras obtenidas en los cuatro diferentes experimentos, encontrándose en todos los casos que el hongo constituía la población predominante. Un estudio más detallado del efecto que las bacterias tienen en la distribución de la población microbiana, se realizó en pequeños reactores después de 20 días de operación. En los experimentos control, la distribución de las cuentas microbianas fue de $1.68 \times 10^6 \text{ ufc/g MS}$ y de $3.33 \times 10^8 \text{ ufc/gMS}$ para bacterias y hongos, respectivamente. En los experimentos en los cuales se adicionó cloranfenicol (25 mg/L), agente inhibidor del crecimiento bacteriano, no se encontraron bacterias en el sistema mientras que se obtuvieron cuentas de $1.1 \times 10^8 \text{ ufc/g MS}$ para el hongo. Las capacidades de eliminación encontradas en ambos sistemas experimentales fue de $120 \text{ g/m}^3\text{h}$. Estos resultados fueron confirmados usando la metodología de microcosmos reportada por Acuña y col., 1999.

Mediante este método se estimó una C.E. de 114 g/m³h, similar a la obtenida en los pequeños reactores y similar a la obtenida durante el arranque de los experimentos de biofiltración.

6.2.8 Microscopia electrónica.

Muestras obtenidas en los diferentes experimentos realizados en el biofiltro fueron observadas en el microscopio electrónico después de haber seguido todo un proceso de fijación y deshidratación de las muestras. En la Figura 6.6.10A se observa la estructura microscópica del soporte usado (vermiculita) antes de ser inoculado. En la fotografía se puede apreciar claramente que este soporte está conformado por varias laminas entre las cuales posteriormente crece y extiende sus hifas el hongo. La colonización del soporte obtenida con *S. apiospermum* y el crecimiento abundante después de 45 días de operación en el cuarto experimento (E4) se observa en las Figuras 6.6.10B y C. Una observación del microorganismo con mayor aumento permite reconocer la morfología típica de este hongo, la cual es muy similar a la encontrada en otros documentos que se refieren a esta cepa fúngica.

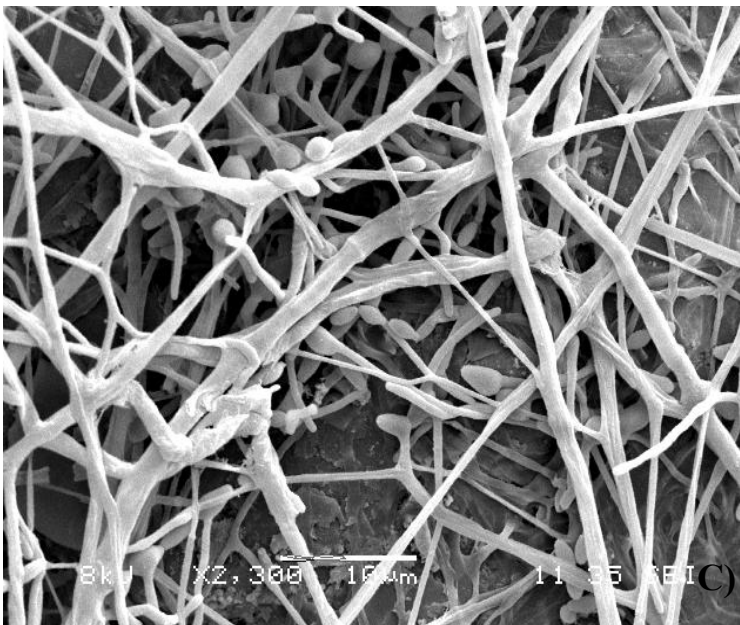
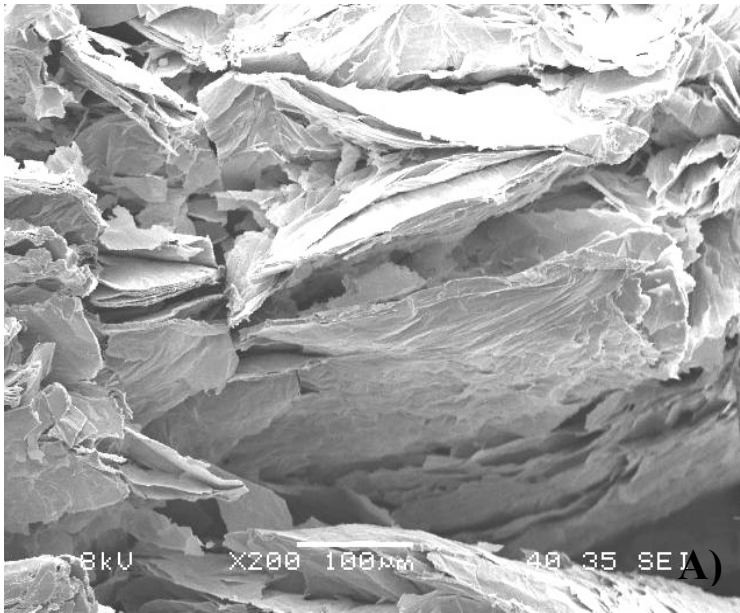
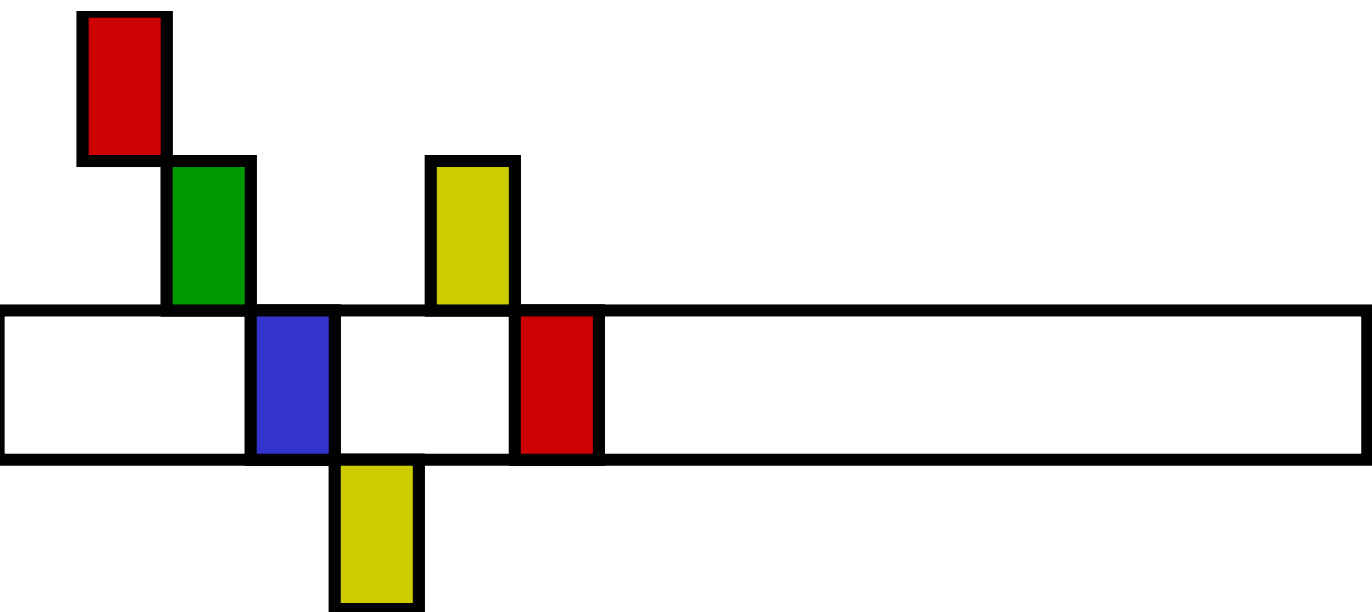


Figura 6.6.10. Fotografías de Microscopía Electrónica de *Scedosporium apiospermum* en vermiculita del biofiltro A) Antes de inoculación B) Crecimiento del microorganismo en el material de empaque C) Colonización del soporte D) Morfología característica.



VII. CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

El objetivo del presente proyecto fue evaluar la aplicación de *S. apiospermum* en un proceso de biofiltración de tolueno y explicar el funcionamiento del sistema a través del estudio del metabolismo del hongo. Se realizaron experimentos en cultivo líquido y en sistemas de biofiltración, se evaluó el crecimiento del hongo con los diferentes intermediarios, se establecieron las técnicas de determinación de actividades enzimáticas y estas últimas se aplicaron en muestras del biofiltro.

Los rendimientos de biomasa a partir del tolueno consumido fueron menores a los encontrados para bacterias, ya que en el hongo fue igual a $0.9 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{mg}_{\text{tolueno}}$ y los reportados para *Pseudomonas* se encuentran en un rango entre 1 y $1.2 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{mg}_{\text{tolueno}}$. A nivel de experimentos en el biofiltro esto no constituye una desventaja ya que en dichos sistemas se busca que el microorganismo consuma preferencialmente el contaminante limitando el crecimiento de la biomasa que podría ocasionar taponamiento del biofiltro, asimismo dificultar los fenómenos de transferencia de masa. La velocidad específica de consumo de tolueno determinadas para el hongo $23 \text{ mg}_{\text{tol}}/\text{h g}_{\text{biomasa}}$ fue mayor que la determinada para *C. sphaerospermum*. Este hecho se vio reflejado al crecer al hongo en el sistema de biofiltración donde se alcanzaron altas capacidades de eliminación al menos 6 veces mayores que las reportadas para biofiltros bacterianos. Bajo condiciones de biofiltración el hongo creció y consumió altas concentraciones de tolueno, sin embargo, la actividad degradativa tendió a decrecer debido al secado y compactamiento del material de soporte, lo cual ocasionó un decremento en el consumo de tolueno. Al adicionar periódicamente medio mineral se mantuvo el contenido de humedad y por tanto la alta actividad metabólica. El biofiltro fúngico se operó durante 100 días sin observar decrementos importantes en la capacidad de eliminación (C.E. promedio de $250 \text{ g}/\text{m}^3\text{h}$).

Las actividades específicas de tolueno oxigenasa y alcohol bencílico deshidrogenasa medidas con biomasa del hongo fueron comparables con las que se encuentran en bacterias. Adicionalmente se determinó que los valores de actividad enzimática tienen una fuerte correlación con los consumos de tolueno medidos con el hongo en biofiltros a diferentes

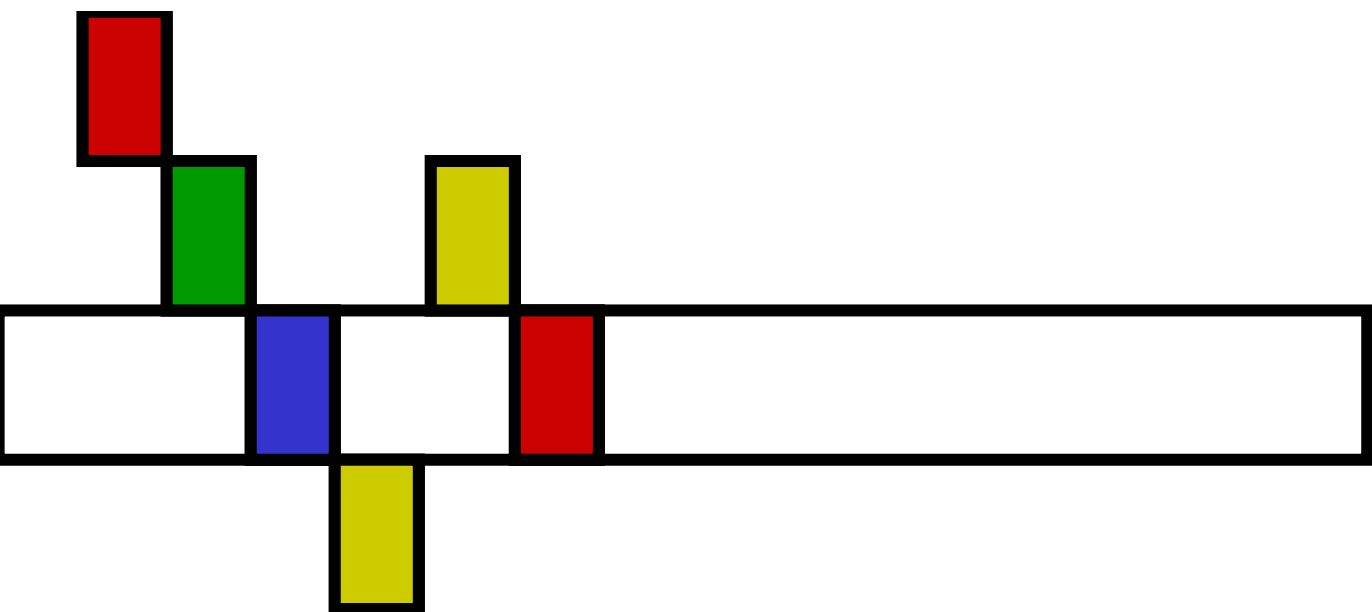
escalas. Se mostró que a través de la determinación de las actividades enzimáticas se puede predecir el consumo de tolueno que alcanza el hongo en el biofiltro. En cuanto a la ruta de degradación de tolueno en el hongo, los experimentos realizados nos permiten aseverar que la degradación de tolueno en *S. apiospermum* se inicia con el ataque al grupo metilo, no obstante, de acuerdo a los patrones de crecimiento y consumo de oxígeno el hongo tiene más de una vía metabólica de degradación de tolueno.

Los consumos de tolueno alcanzados por el hongo fueron altos pero las actividades enzimáticas específicas mostraron ser comparables a las de las bacterias, es decir, los altos consumos no se deben solamente a altas actividades enzimáticas, sino aparentemente el área superficial que se deriva del crecimiento miceliar en los biofiltros favorece una mayor disposición de tolueno para el hongo y disminuye las limitaciones de transferencia de masa, permitiendo altos consumos del contaminante.

Las actividades de la tolueno-monooxigenasa y de la alcohol bencílico deshidrogenasa fueron similares entre sí y también estuvieron correlacionadas con los consumos de tolueno en el biofiltro. La C.E. experimental y la calculada a partir de las actividades enzimáticas resultaron ser similares, esto implica que durante el quinto experimento (E5) el biofiltro estuvo funcionando bajo las condiciones más adecuadas, alcanzando prácticamente la mayor conversión o consumo de tolueno que se puede obtener a través de la cantidad de enzima presente en el hongo. El proceso de biofiltración entonces estuvo limitado por la reacción biológica. Los altos consumos de tolueno alcanzados y mantenidos en el biofiltro fúngico se debieron principalmente a dos factores: 1) Las condiciones ambientales humedad y contenido de nutrientes, mantenidos a través de la adición de medio, permitieron que el sistema metabólico funcione eficientemente. 2) La forma de crecimiento miceliar del hongo incrementa el área superficial de transferencia del tolueno directamente en las paredes del micelio del hongo. En los biofiltros bacterianos el aumento en biomasa se refleja en un incremento en el grosor de la bio-película y ocasiona áreas profundas donde se presentan problemas de difusión de tolueno y oxígeno que a largo plazo ocasionan segmentos de biomasa inactiva. En el biofiltro fúngico el incremento en biomasa fúngica

implica un aumento equivalente en área superficial, la biomasa fúngica que se va generando permanece activa.

Los hongos resultaron ser microorganismos que degradan altas concentraciones de tolueno en biofiltros, por lo cual resulta interesante su aplicación en sistemas de biofiltración para eliminar otros compuestos contaminantes. En el presente trabajo se inició el estudio de los fenómenos metabólicos que rigen el consumo de contaminantes en los biofiltros. Es importante recalcar el hecho de que se requieren estudios adicionales en cuanto a actividades enzimáticas. Por otro lado, es preciso llevar a cabo experimentos dirigidos a establecer las rutas de degradación de tolueno en *S. apiospermum*. También resultaría interesante estudiar con mayor detalle los fenómenos regulatorios de las actividades enzimáticas en los hongos, determinar como se modifica las actividades de éstas a consecuencia de cambios drásticos de operación en el biofiltro, así como tratar de establecer si los altos consumos de contaminante se deben a la características de crecimiento de los hongos en los biofiltros.



VIII. REFERENCIAS



VIII. REFERENCIAS.

Acuña ME, Pérez F, Auria R, Revah S. (1999) Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 175-184.

Acton DW y Barker JF. (1992) *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J Contam Hydro* 9:325-352.

ACGIH. (1999) TLVs and BEIs: Threshold limit values for chemical substances and physical agents: Biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.

Altshuller AP, Lonneman WA, Sutterfield FD. (1971) Hydrocarbon composition of the atmosphere of the Los Angeles Basin-1967. *Environ Sci Technol* 5(10), 1009-1016

Armstrong AQ, Hodson RE, Hwang H-M, et al. 1991. Environmental factors affecting toluene degradation in groundwater at a hazardous waste site. *Environ Toxicol Chem* 10:147-158.

Atkinson R. (1990) Gas-phase tropospheric chemistry of organic compounds: A review. *Atmos. Environ.* 24A(1), 1-41.

Auria R, Morales M, Villegas E, Revah S. (1993) Influence of mould growth on the pressure drop in aerated solid-state fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1007-1013.

Auria R., Frere G., Morales M., Acuña M.E. y Revah S. (2000) Influence of mixing and water addition on the removal of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 4, 448-455.

Balfour WD, Wetherold RG, Lewis DL. (1984). Evaluation of air emissions from hazardous waste treatment, storage and disposal facilities. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Land Pollution Control Division, Hazardous Waste Engineering Research Laboratory, Office of Research and Development.

Barshter D.W. (1993) Biofiltration-Room temperature incineration. En *Proceedings of the 86th Annual Meeting of the Air and Waste Management Association*. Denver, USA.

Beller HR, Grbic-Galic D. y Reinhard M. (1992a) Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl Environ Microbiol.* 58(3):786-793.

Beller HR, Reinhard M y Grbic-Galic D. (1992b) Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 58(9):3192-3195

Bishop D.F. y Govind R. (1995) Development of novel biofilters for treatment of volatile organic compounds. En *Biological Unit Processes for Hazardous Waste Treatment*,

Proceedings of the Third International In situ and on-Site Bioreclamation Symposium. Eds. Hinche R.E., Skeen R.S. y Sayles G.D., Battelle Press, Columbus, 1995.

Bohn H.L. (1993) Biofiltration: Desing principles and pitfalls. En Proceedings of the 86 th Annual Meeting of Air and Waste Management Association, Denver, Colorado.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

Bravo, H. A., Sanchez, P. A., Sosa, E. R., Torres, E. R. (1997) Air pollution problem in the Mexico city metropolitan zone: photichemical pollution. In Proceedings of the 1997 Air Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition Toronto, Ontario. June 8-13.

Bull A.T. y Trinci A.P.J. (1977) The physiology and metabolic control of fungal growth. Adv. Microbial Physiol., 15, 1-84.

Cerniglia C.E., Hebert R. D., Szaniszlo P.J. y Gibson D.T. (1978) Fungal transformation of naphthalene. Arch. Microbiol., 171, 135-143

Cerniglia C.E. y Gibson D.T. (1979) Oxidation of benzo pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. J. Biol. Chem., 254, 12174-12180

Cerniglia C.E., Fu P.P. y Yang S.K. (1982) Metabolism of 7-methylbenzanthracene and 7-hydroxymethylbenzanthracene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol., 44, 682-689.

Cerniglia C.E., Lambert K.J., Miller D.W. y Freeman J.P. (1984) Transformation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol., 47, 111-118.

Cerniglia C.E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-368.

Chang M.-K., Voice T.C. y Criddle C.S. (1993) Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. Biotechnol. Bioeng., 41, 1057-1065.

Cherry R.S. y Thompson D.N. (1997) Shift from growth to nutrient-limited maintenance kinetics during biofilter acclimation. . Biotechnol. Bioeng., 56, 303-339.

Claus D. y Walker N. (1964) The decomposition of toluene by soil bacteria. J Gen Microbiol 36:107-122.

Cohen BA, Krumholz LR, Kim H, et al. (1995) *In-situ* biodegradation of toluene in a contaminated stream. 2. laboratory studies. Environ Sci Technol 29(1):117-125.

Córdova J, Gutiérrez M, Huerta S, Saucedo G, Favela E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model support in solid-state fermentation. *Biotech Techniques* 10: 1-6.

Corry JEL. (1973) The water relations and heat resistance of micro-organisms. *Progr Ind Microbiol* 12: 73-108.

Corsi R.L. y Seed L. (1995) Biofiltration of BTEX: Media, substrates and loadings effects. *Environ. Progr.*, 14, 3, 151-158.

Cox H.H.J, Houtman J.H.M., Doddema H.J. y Harder (1993) Enrichment of fungi and degradation of styrene in biofilters. *Biotechnol. Letters*, 15, 737-742.

Cox H.H.J., Moerman R.E., Van Baalen S., van Heiningen W.N.M., Doddema, H.J. y Harder W. (1997) Performance of styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 3, 259-266.

Dagley S. (1971) Catabolism of aromatic compounds by microorganism. p1-46 In Rose A.H. y Wilkinson (ed) *Advances in microbial physiology* Vol. 6 Academic Press Inc. New York.

Davey J.F. y Gibson D.T. (1974) Bacterial metabolism of para and meta xylene: oxydation of a methyl substituent. *J. Bacteriol.*, 119, 923-929.

Davis DD, Heaps W, Philen D, et al. (1979) Boundary layer measurements of the OH radical in the vicinity of an isolated power plant plume: SO₂ and NO₂ chemical conversion times. *Atmos Environ* 13:1197-1203.

Davis JW. y Madsen S. (1996) Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere* 33(1):107-130.

de Castro A., Allen DGG and Fulthorpe R.R. (1997) Characterization of the microbial population during biofiltration and the influence of the inoculum source. En *Proceedings of the 90th Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association*, AWMA, Pittsburg, 1997.

Deront M., Samb M.F., Adler N. y Péringer (1998) Biomass growth monitoring using pressure drop in a cocurrent biofilter. *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 1, 97-104.

Devinny J.S., Deshusses M.A. y Webster T.S. (1999) *Biofiltration for air Pollution Control*. Lewis Publishers, New York, USA.

Dilling WL, Bredeweg CJ, Tefertiller NB. (1976) Simulated atmospheric photodecomposition rates of methylene chloride, 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene, tetrachloroethylene and other compounds. *Environ Sci Technol* 10(4):341-356.

Doelle H.W., Mitchell D.A. y Rolz C.E. (1992) Solid Substrate Cultivation. Elsevier Science Publisher Ltd. Inglaterra.

Dolfing J, Zeyer J, Binder-Eicher P, et al. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Arch Microbiol 154:336-341

Don J.A. (1986) The rapid development of biofiltration for the purification of diversified waste gas stream. En VDI Berichte 561; VDI Verlag, Dusseldorf, pp 63-72.

Duetz W.A., Winson M.K., van Andel J.G. y Williams P.A. (1991) Mathematical analysis of catabolic function loss in a population of *Pseudomonas putida* mt-2 during non-limited growth on benzoate. J. Gen. Microbiol., 137, 1363-1368.

Edelstein L. y Segel L.A. (1983) Growth and metabolism in mycelial fungi. J. Theor. Biol., 104, 187-210.

Engesser K.H. (1992) Review paper. Mikrobiologische spekte der biologischen Abluftreinigung. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp 33-40.

Ensley B.D. y Kurisko P.R. (1994) A gas lift bioreactor for vapor-phase destruction of chlorinated organics. Appl. Environ. Microbiol., 60, 285-290.

EPA. 1979. Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA 440/4-79-029a.

EPA. 1981. Exposure and risk assessment for toluene. Final Draft Report. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standards.

EPA. 1982a. Fate of priority pollutants in public-owned treatment works. Final Report. Washington. DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA 440/1-82/303.

EPA. 1983a. List of chemicals produced by affected facilities. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 60, Subpart VV.

EPA. 1983b. Health assessment document for toluene. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment. EPA-600/8-82-008F.

EPA. 1994a. Controls applicable to blendstocks. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 80.102.

EPA. 1994b. National emission standards for organic hazardous air pollutants from the synthetic organic chemical manufacturing industry for process vents, storage vessels, transfer operations, and wastewater.

EPA. 1995g. National emissions standards for hazardous air pollutants. U.S. Environmental Protection Agency. Wood Furniture Manufacturing Operations. Code of Federal Regulations. 40 CFR 63, Subpart JJ, Table 2.

EPA. 1995i. Standards of performance for volatile organic compounds (VOC) emissions from synthetic organic chemical manufacturing industry (SOCMI) distillation operations. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 60, Subpart NNN.

EPA. 1996c. National emissions standards for hazardous air pollutants. General record keeping and reporting provisions. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 63.506.

Environment of Canada (1996) National Pollutant Release Inventory, Canada.

Evans GF, Lumpkin TA, Smith DL, et al. (1992) Measurements of VOCs from the TAMS network. J. Air Waste Manag Assoc 42:1319-1323

Fedorak P.M. y Westlake D.W.S. (1986) Fungal metabolism of n-alkylbenzenes. Appl. Environ. Microbiol., 51, 2, 435-437.

Feng Y. Khoo H.E. y Poh Ch. L. (1999) Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869. Appl. Environ. Microbiol., 65, 3, 946-950.

Fewson CA. (1981) Biodegradation of aromatics with industrial relevance. Fems Symp 12:141-179. Figa-Talamanca I, De Capoa A, Scavalli P. 1998. Ribosomal gene activity in lymphocytes of female workers exposed to aromatic hydrocarbons in the ceramics industry. Int J Environ Health Res 8:43-46.

Field J.A., de Jong E. Feijoo-Costa G. y de Bont J.A.M. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol, 58, 7, 2219-2226.

Folsom B.R. y Chapman P.J. (1991) Performance characterization of model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1602-1608.

Franke C, Studinger G, Berger G, et al. (1994) The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29:1501-1514.

García JP, Beyne-Masclet S y Mouvier G. (1992) Emissions of volatile organic compounds by coal-fired power stations. Atmos Environ 26A(9), 1589-1597.

Gibson D.T., Hensley M., Yoshioka H. Y Mabry T.J. (1970) Formation of cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. Biochemistry 9, 1626-1630.

Gibson D.T. (1971) Assay of enzymes of aromatic metabolism. En Methods in microbiology vol. 6A. Academic Press, Inc., New York.

Gibson D.T. (1993) Biodegradation, biotransformation and the belmont. J. of Industrial Microbiol. 12, 1-12.

Guerra N.B., Stamford T.M.M., Madeiros R.B., de Freitas C.P., Maia S.R. y Cavalcante M.L. (2000) Protein enrichment of pineapple waste for animal feeds. Laboratory of Food Sciences, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brasil.

Gobi International (2000) Toluene. Southbank House Black Prince Road, London SE1 7SJ, Inglaterra.

Harder W. y Dijkhuizen I. (1982) Strategy of mixed substrate utilization in microorganisms. Phil. Tans. R.Soc.Lond. B, 459-480.

Harayama S, Rekik M, Wubbolts M, et al. (1989) Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. J. Bacteriol 171(9), 5048-5055.

Hartikainen T., Ruuskanen J., Vanhtalo M. y Martikainen P.J. (1996) Removal of ammonia from air by a peat biofilter. Environmental Technol., 17, 45-53.

Hartmans S., van der Werf M.J. y de Bont J.A.M. (1990) Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol., 56, 5, 1347-1351.

HazDat. 2000. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA.

Hodge D.S. (1991) Treatment of hydrocarbon fuel vapors biofilters. Environ. Technol. 12, 655-662.

Holland A.L., Brown F.M., Muñoz B. y Ninniss R.W. (1988) Side chain hydroxylation of aromatic hydrocarbons by fungi. PartII Isotope effects and mechanism. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1557-1563.

Hoshino M, Akimoto H, Okuda M. 1978. Photochemical oxidation of benzene, toluene and ethylbenzene initiated by OH radicals in the gas phase. Bull Chem Soc Japan 51(3):718-724.

Hotz P, Pilliod J, Bourgeois R, et al. 1990. Hydrocarbon exposure, pancreatitis, and bile acids. Br J Ind Med 47:833-837.

Howard PH. (1990) Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Vol. II. Solvents. Chelsea, MI. Lewis Publishers, Inc.

Howard PH, Boethling RS, Jarvis WF, eds. (1991) Handbook of environmental degradation rates. Chelsea, MI: Lewis Publishers, Inc, 410-411.

Hugler W.C., Cantu-De la Garza J.G. y Villa-García M. (1996) Biofilm analysis for an odor-removing trickling filter. En Proceedings of the 89th Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, AWMA, Pittsburg, 1996.

Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Kohler T., Rekik M. y Harayama S. (1990) Growth-phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0 catabolic genes. J. Bacteriol., 172, 6651-6660.

Hutchins SR. (1991) Optimizing GTEX biodegradation under denitrifying conditions. Exp Toxicol. Chem 10:1437-1448.

Johnson G.R. y Olsen R.H. (1997) Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia sp.* Strain JS150. Appl. Environ. Microbiol., 63, 10, 4047-4057.

Jones K.H., Trudgill P.W. y Hopper D.J. (1993) Metabolism of p-cresol by fungus *Aspergillus fumigatus*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4, 1125-1130.

Jones K.H., Trudgill P.W. y Hopper D.J. (1995). Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus*. Arch. Microbiol., 163, 176-181.

Jury WA, Russo D, Streile G, et al. 1990. Evaluation of volatilization by organic chemicals residing below the soil surface. Water Resource Res 26(1):13-20.

Kaphammer B.J., Kukor J.J. y Olsen R.H. (1990) Cloning and characterization of a novel toluene degradative pathway from *Pseudomonas pickettii* PKO1. En Proceedings of 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.

Kenley RA, Davenport JE y Hendry DJ. (1973) Hydroxyl radical reactions in the gas phase. Products and pathways for the reaction of OH with toluene. J Phys Chem 82(9):1095-1096.
Kennedy GL, Graepel GJ. 1991. Acute toxicity in the rat following either oral or inhalation exposure. Toxicol Lett 56:317-326.

Kinney K.A., du Plessis C., Schroeder E.D. y Scow K.M. (1996a) Optimizing microbial activity in a directionally switching biofilter. En Proceedings of the 1996 Conference on biofiltration, Reynolds, F.E., Ed The Reynolds Group, California, 1996.

Kirchner K., Gossen C.A. y Rehm H.J. (1991) Purification of exhaust air containing organic pollutants in a trickle-bed bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 396-400.

Kirk-Othmer (1983) Encyclopedia of chemical technology. Tercera edición. Vol. 23 John Wiley and Sons, N.Y., 246-271.

Kitayama A., Suzuki E., Kawakami Y. y Nagamune T. (1996) Gene organization and low regiospecity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* J1104. J. Ferment. Bioeng., 82, 5, 421-425.

Kok H.J.G. (1992) Bioscrubbing of air contaminated with high concentrations of hydrocarbons. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp 161-166.

Kosteltz A.M., Finkelstein A. y Sears G. (1996) What are the real opportunities in biological gas cleaning for North America, en Proceedings of the 89th Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, Pittsburgh, 1996.

Kwok W.K., Picioreanu C., Ong S.L., van Loosdrecht M.C., Ng W.J. y Heijnen J.J. (1998) Influence of biomass production and detachment forces on biofilm airlift suspension reactor. Biotechnol. Bioeng., 58, 4, 400-407.

Langenhoff AAM, Zehnder AJB. y Schraa G. (1996) Behaviour of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment columns. Biodegradation 7(3):267-274.

Leddy M.B. Phipps D.W. y Ridgway H.F. (1995) Catabolic-mediated mutations in alternate toluene degradation pathways in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol., 177, 4713-4720.

Lee K. y Gibson D.T. (1996) Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp* strain NCIB 9816-4. Appl. Environ. Microbiol., 62, 9, 3101-3106.

Lehninger A.L. (1995) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.

Leson G. and Winer A.M. (1991) Biofiltration an innovative air pollution control technology for VOC emission. J. Air Waste Manage. Assoc., 41, 1045-1054.

Leson G. y Smith b.J. (1997) Petroleum Environmental Research Forum field study on biofilters for control of volatile hydrocarbons. J. Environ. Eng., 123, 6, 556.

Lestan D., Lestan M. y Perdih A. (1994) Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 2, 606-612.

Lin J.E., Wang H.Y. y Hickey R.F. (1990) Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Bioeng., 35, 1125-1134.

Lynch N.A., Jiang H. y Gibson D.T. (1996) Rapid purification of the oxygenase component of toluene dioxygenase from polyol-responsive monoclonal antibody. Appl. Environ. Microbiol., 62, 6, 2133-2137.

Lovely DR. (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:75-81.

Loy J., Heinrich K. y Egerer B. (1997) Influence of biofilter material on the elimination rate in a biotrickling filter bed. En *Proceedings of the 90th Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, AWMA, Pittsburg, 1997.*

Mackay D. y Leinonen P.J. (1975) Rate of evaporation of low-solubility contaminants from water bodies to atmosphere. *Environ Sci Technol* 9(13):1178-1180.

Majcherczyk A., Braun-Lulleman A. y Huttermann A. (1990) Biofiltration of polluted air by a complex filter based on white rot fungi growing on lignocellulosic substrates. En Coughlan MP and Amaral Collaco MT. Eds. *Advances in biological treatment of lignocellulosic materials*. Commission of the European Communities, Elsevier Applied Sciences, London, New York, pp 323-329.

Mars A.E., Houwing J., Dolfing. y Janssen D. (1996) Degrdaton of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 886-891.

Medina V.F., Webster T., Ramaratnam M. y Devinny J.S. (1995) Treatment of gasoline residuals by granular activated carbon based biological filtration. *J. Environ. Sci. Health* 30, 2, 407.

Mycology online (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>)

Mirpuri R., Jones W. Y Bryers J.D. (1997) Toluene degrading kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 535-546.

Mitchell D.A. y Lonsane B.K. (1992) Definition, characteristics and potential. En *Solid Substrate Cultivation*. Eds. Doelle H.W., Mitchell D.A. y Rolz C.E. 1992 Elsevier Science Publisher Ltd. Inglaterra.

Moe W.L. e Irvine R.L. (1997) Polyurethane foam based biofilter media for toluene removal. En *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management IX, Special Symposium, Industrial and Engineering Chemistry Division, American Chemical Society, Pittsburgh, PA, 1997.*

Montgomery D.D. y Kalman DA. (1989) Indoor/outdoor air quality: Reference pollutant concentrations in complaint-free residences. *Appl Ind Hyg* 4(1):17-20.

Moo-Young M., Moreira A.R. y Tengerdy R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation. En *The Filamentous Fungi*, vol. 4, Eds. Smith J.E., Berry D.R. y Kristiansen B. Edward Arnold, Londres, Inglaterra.

Morales M, Auria R, Pérez F y Revah S. (1994) Toluene removal from air stream by biofiltration. In: Galindo E, Ramirez T (editors). Advances in Bioprocess Engineering, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press. p 405-411.

Morales M., Revah S. y Auria R. (1998) Start-up and the effect of gaseous ammonia additions on a biofilter for the elimination of toluene vapors. Biotechnol. Bioeng, 60, 4, 483-491.

Morgenroth E., Schroeder E.D., Chang P.Y. and Scow K.M. (1996) Nutrient limitation in a compost biofilter degrading hexane. J. Air Waste Manage. Assoc., 46, 300-308.

Mueller J.C. (1988). Citado por Corsi R.L. y Seed L. (1995) Biofiltration of BTEX: Media, substrates and loadings effects. Environ. Progr., 14, 3, 151-158.

Newman L.M. y Wackett L.P. (1995) Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. Biochem., 34, 43, 14066-14076.

Newman L.M. y Wackett L.P. (1997) Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: Products, kinetics and turnover-dependent inactivation. J. Bacteriol. 179, 1, 90-96.

Oliver S.G. y Trinci A.P.J. (1985) Modes of growth of bacteria and fungi. En Comprehensive Biotechnology, vol. 1. Editor in chief Moo-Young M. New York, Pergamon Press, USA.

Olsen R.T. Kukor J.J. y Kaphammir B (1994) A novel toluene 3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. J. Bacteriol., 176, 3749-3756.

Olsen RH, Mikesell MD, Kukor JJ, et al. 1995. Physiological attributes of microbial BTEX degradation in oxygen-limited environments. Environ Health Perspect Suppl 103(5):49-51.

Onodera M. y Ogasawara N. (1989) Propane oxidation activity and its induction in a gaseous hydrocarbon assimilating mold, *Scedosporium sp.* A-4. Agric. Biol. Chem., 53, 731-736.

Onodera M. y Ogasawara N. (1989a) Oxidation of secondary alcohols to methylketones by a gaseous hydrocarbon assimilating mold, *Scedosporium sp.* A-4. Agric. Biol. Chem., 53, 10, 2673-2677.

Onodera M. y Ogasawara N. (1989b) Oxidation of n-pentane by a gaseous hydrocarbon assimilating mold, *Scedosporium sp.* A-4. Agric. Biol. Chem., 53, 12, 3305-3306.

Ortiz I., Morales M., Gobbée C., Guerrero V., Auria R., y Revah S. (1998) Biofiltration of gasoline VOCs with different support media. En Proceedings of the 91st Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, AWMA, Pittsburg, 1998.

Ottengraf S.P.P. (1986). Exhaust gas purification. En: Biotechnology, vol. 8. Eds. Rehm H.J. & Reed G. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 425-452.

Ottengraf S.P.P. y Dicks R.M.M. (1992) Process technology of biotechniques. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp 17-31.

Ottengraf S.P.P. y van den Oever A.H. (1983) Kinetics of organic compound removal from waste gases with a biological filter. Biotechnol. Bioeng, 25, 3089-3102.

Ottengraf S.P.P., Meesters J.J.P. Oever A.H. van den y Rozema H.R (1986) Biological elimination of volatile xenobiotic compounds in biofilters. Biopro. Eng. 1, 61-69.

Paszczynski A. y Crawford R.L. (1995) Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Prog., 11, 368-379.

Pearson C.C., Phillips V.R. Green G. y Scotford I.M. (1992) A minimum-cost biofilter for reducing aerial emissions from a broil-chicken house. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, 245-254.

Pedersen A.R. (1996) Biological removal of toluene in waste gas reactors. Tesis de Doctorado. Universidad Técnica de Dinamarca. Lyngby. Dinamarca.

Pineda J. (1996) Estudio de biofiltración: eliminación de tolueno utilizando un sistema modelo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Pitt J.I. (1981) Food spoilage and biodegradation. En Biology of Conidial Fungi, vol., 2. Eds Cole G.T. Y Kendric B. Academic Press, New York, USA.

Pirt S.J. (1975) Microbe and cell cultivation. Halsted Press, a Division of John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

Prenafeta-Boldú F.X., Luykx D.M.A.M., Vervoort J. y de Bont J.A.M. (2001) Fungal metabolism of toluene: Monitoring of fluorinated analogs by ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol., 67, 3, 1030-1034.

Prosser J.I. (1982) Growth of fungi. En Microbial Population Dynamics. Ed Bazin M.J.. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Raimbault M. y Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9, 199-209.

Reardon K.F., Douglas C.M. y Bull Rogers J.D. (2000) Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. Biotechnol. Bioeng., 69, 4, 385-400.

Reynolds E.F. Grafton W.D. (1999) Biofiltration an old technology comes of age. Environ. Technol.

Richardson K.L. y Gibson D.T. (1984) A novel pathway for toluene oxidation in *Pseudomonas mendicina*. En Abstracts of the 84th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 19984. Washington D.C.

Rieneck M.G. (1992) Mikrobiologische Methoden zur Charakterisierung von Biofiltermaterialien. En: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, Holanda. Eds. Dragt A.J. y van Ham J. 27-29 Octubre, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp 85-95.

Riet K. van't y Tramper J. (1991) Basic bioreactor design. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong.

Robertson J.B., Spain J.C. Haddock J.D. y Gibson D.T. (1992) Oxidation of nitrotoluenes by toluene dioxygenase: Evidence for a monooxygenase reaction. Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 8, 2643-2648.

Robinson KG, Farmer WS. y Novak JT. (1990) Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. Water Res 24(3):345-350.

Roch F. y Alexander M. (1997) Inability of bacteria to degrade low concentrations of toluene in water. Environ Toxicol Chem 16(7):1377-1383.

Rogers J.E. y Gibson D.T. (1977) Purification and properties of cis-toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. J Bacteriol., 130, 3, 1117-1124.

Schelchshorn J. y Vinke A. (1989) Erfahrungsbericht über die mikrobielle Entschwefelung von Biogasen auf Klaranlagen nach dem Biopur/C-Verfahren. En: VDT Berichte 735: Biologische Abgasreinigung, Praktische Erfahrungen und Neue Entwicklungen, DVI-Verlag, Düsseldorf pp 285-292.

Severin B.F., Shi J y Hayes T. (1993) Destruction of gas industry VOCs in a biofilter reactor. Proceedings of the IGT Sixth International Symposium on Gas, Oil and Environmental Technology, Colorado Springs, Colorado.

Shields M.S., Montgomery S.O., Cushey S.M., Chapman P.J. y Pritchard P.H. (1989) Novel pathway of toluene catabolism in trichloroethylene-degrading bacterium G4. Appl. Environ. Microbiol., 55, 6, 1624-1629.

Shields M.S., Montgomery S.O., Cushey S.M., Chapman P.J. y Pritchard P.H. (1991) Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol., 57, 7, 1935-1941.

Shields M.S., Reagin M.J., Gerger R.R., Campebell R. y Somerville C. (1995) TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* G4. Appl. Environ. Microbiol., 61, 4, 1352-1356.

Shingleton J.T., Applegate B.A., Baker A.J., Sayler G.S. y Bienkowski P.R. (2001) Quantification of toluene dioxygenase induction and kinetic modeling of TCE cometabolism by *Pseudomonas putida* TVA8. Biotechnol. Bioeng., 76, 4, 341-350.

Smith R.V. y Rosaza J.P. (1974) Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys., 161, 551-558.

Song J. y Kinney K.A. (2000) Effect of vapor-phase bioreactor operation on biomass accumulation, distribution and activity: Linking biofilm properties to bioreactor performance. Biotechnol. Bioeng., 68, 5, 508-516.

Solis-Pereira S., Favela-Torres E., Gutierrez-Rojas M., Roussos S., Saucedo-Catañeda G., Gunasekaran P. y Viniegra-Gonzalez G. (1996) Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentration. World J. of Microbiol and Biotechnol., 12,

Sorial G.A., Smith F.L., Suidan M.T., Biswas P. y Brenner R.C. (1995) Evaluation of a trickle bed biofilter for toluene removal. J. Air Waste Manage. Assoc., 45, 12, 801-808.

Spain J.C. y Gibson D.T. (1988) Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas sp.* Strain JS6. Appl. Environ. Microbiol., 54, 1399-1404.

Stuart B.J., Bowlen G.F. y Kosson D.S. (1991) Competitive sorption of benzene, toluene and the xylenes onto soil. Environmental Progress 10(2):104-109.

Sun A.K. y Wood T.K. (1997) Trichloroethylene mineralization in a fixed-film bioreactor using a pure culture expressing constitutively toluene ortho-monooxygenase. Biotechnol. Bioeng., 55, 4, 674-685.

Swannell R.P.J., Richardson S.J., Passant N.R., Woodfield M., Lugt J.P., Wolsink J.H., Hesselink P.G.M., Hecht V., Brebbermann D. and Bischoff L. (1991). Biodegradability and emissions of volatile organic compounds from the food, drink and metal degreasing industries, report 1 EC-STEP project No 900431.

Thibodeaux L.J. y Hwang S.T. (1982) Landfarming of petroleum wastes- modeling the air emission problem. Environ Progress 1(1):42-46.

Toxic Release Inventory TRI97. 1999. Toxic Chemical Release Inventory. National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, MD. Triebig G, Claus D, Csuzda I, et al. 1988. Cross-sectional epidemiological study on neurotoxicity of solvents in paints and lacquers. Int Arch Occup Environ Health 60:233-241.

van Groenestijn J.W. and Hesselink P.G.M. (1993) Biotechniques for air pollution control. *Biodeg.*, 4, 283-301.

van Groenestijn J.W., Harkes M., Cox H. y Doddema H. (1995) Ceramic materials in biofiltration. En *En Proceedings of the 1995 Conference of Biofiltration (an Air Pollution Control Technology)*. Eds. Hodge y Reynolds F.E. The Reynolds Group, Tustin, 1995.

van Lith C. (1989) Desing criteria for biofilters . En *Proceedings of the 82nd Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, AWMA*, Pittsburg, 1989.

Vecht S.E., Platt M.W., Er-El Z. Y Goldberg I. (1988) The growth of *Pseudomonas putida* on m-toluic acid and on toluene in bacht and in chemostat cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 587-592.

Vercellonece-Smith P. y Herson D.S. (1997) Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWWO. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 5, 1925-1932.

Verschuere K, ed. 1983. *Handbook of environmental data on organic chemicals*. 2nd ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company, 1103-1108.

Wakeham SG, Davis AC y Karas JL. (1983) Mesocosm experiments to determine the fate and persistence of volatile organic compounds in coastal seawater. *Environ Sci Technol* 17(10):611-617.

Wackett L.P. (1990) Toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *Methods Enzymol.*, 188, 39-45.

Walker BL. y Cooper CD. 1992. Air pollution emission for medical waste incinerators. *J Air Waste Management Association* 42:784-791.

Weber F.J., Hage K.C. y de Bont J.A.M. (1995). Growth of the fungus *Cladosporium shaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 10, 3562-3566.

Weber F.J. y Hartmans S. (1996) Prevention of clogging in a biological trickle-bed reactor removing toluene from contaminated air. *Biotechnol. Bioeng*, 50, 1, 91-97.

Wei KS, Adelman AH. (1969) The photooxidation of toluene: The role of an excited charge transfer complex. *Tetrahedron Letters* 38:3297-3300.

Whited G.M. y Gibson D.T. (1991) Toluene 4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.*, 173, 3010-3016.

Wilson, JT, Enfield CG, Dunlap WJ, et al. (1981) Transport and fate of selected organic pollutants in a sandy soil. J Environ Quality 10(4):501-506.

Wilson JT, McNabb JF, Balkwill DL, et al. (1983) Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. Ground Water 21(2):134-142.

Williams T.O. y Miller F.C. (1992) Biofilters and facility operations. Biocycle, 75-79.

Woertz J.R., Kinney K.A., McIntosh N.D.P. y Szaniszlo P.J. (1999). Removal of toluene in a fungal vapor-phase bioreactor. The fifth International In Situ and On-site Bioremediation Symposium, San Diego California, 1999.

Woertz J.R., Kinney K.A. y Szaniszlo P.J. (2001). A fungal vapor-phase bioreactor for the removal of nitric oxide from waste gas streams. J. Air & Waste Manage. Assoc., 51, 895-902.

Worsey M.J. y Williams P.A. (1975) Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of TOL palamid. J. Bacteriol., 124, 1, 7-13.

Wright W.F., Schroeder E.D., Chang D.P.Y. y Romstad K. (1997) Performance of a pilot-scale compost biofilter treating gasoline vapor. J. Environ. Eng., 123, 6, 547.

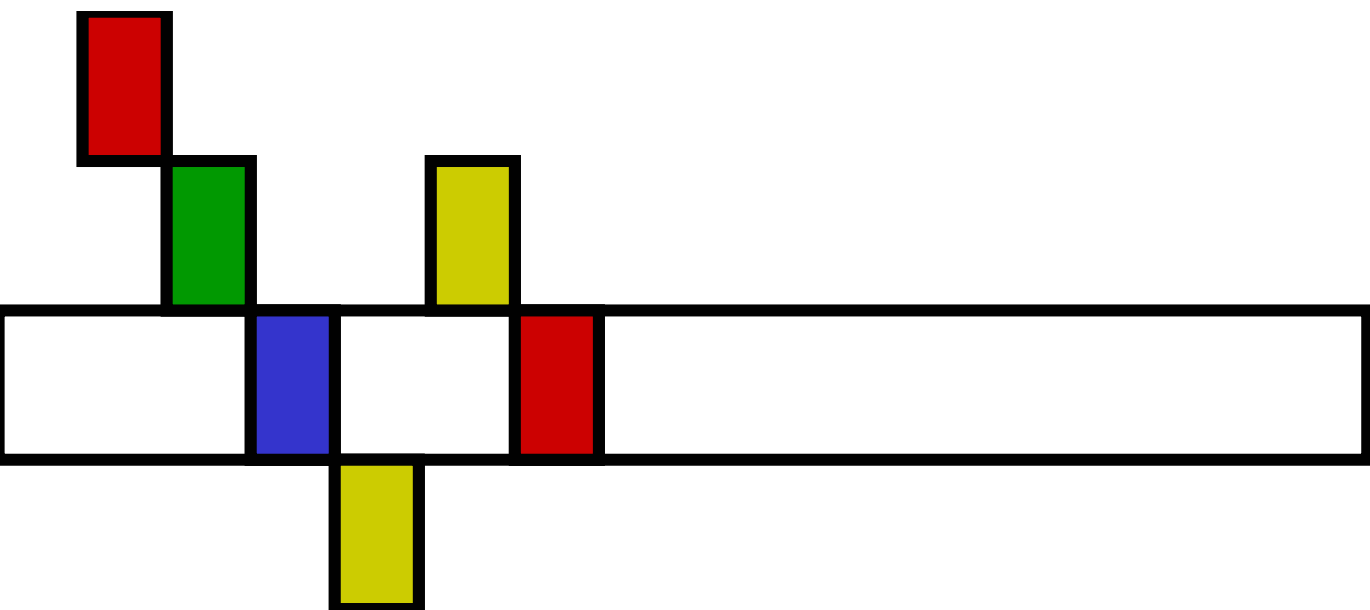
Yadav J.S. y Reddy C.A. (1993). Degradation of benzene, ethylbenzene and xylenes (BTX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3, 756-762.

Yadav, J.S., C. Bethea, and C.A. Reddy. 2000. Mineralization of trichloroethylene (TCE) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, 1, 28-34.

Zeng Y. (2001) Toluene pathways map, Universidad de Minnesota. BBDMaster@email.labmed.umn.edu

Zhou N.Y., Jenkins A., Chan K.N., Chion Ch.K. y Leak D.J. (1999) The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene and phenol. Appl. Environ. Microbiol., 65, 4, 1589-1595.

Zylstra G.J. y Gibson D.T. (1991) Aromatic hydrocarbon degradation: molecular approach. Genetic Eng. 13, 183-203.



IX. ANEXOS



IX. ANEXOS

1. Cálculo de las concentraciones en cultivo líquido.

1.1 Concentraciones de tolueno en el sistema de cultivo.

La concentración total de compuestos volátiles en un sistema de dos fases (gas y líquido) estarán dadas por la suma de las concentraciones del compuesto presentes tanto en la fase gaseosa como en la fase líquida. Y su distribución se rige por la ley de Henry (Reardon y col., 2000).

De esta forma, mediante la determinación de la concentración del tolueno en muestras tomadas de la fase gaseosa (“head space”) podemos obtener la concentración total experimental de tolueno en el sistema de cultivo.

Mediante la curva de calibración de tolueno ($Y = 2947.6 + 22675X$) se obtuvo una concentración inicial de tolueno en fase gaseosa igual a 37.3 mg/L. Según la ley de Henry, el coeficiente de partición **m** (adimensional) relaciona la concentración en fase gas con la concentración en fase líquida, de la siguiente manera:

$$m = \frac{C_g}{C_l} \quad (1)$$

despejando podemos conocer C_g o C_l :

$$C_g = m * C_l \text{ o bien } C_l = \frac{C_g}{m}$$

De tal forma, conociendo la concentración en la fase gas y el coeficiente de partición para el tolueno a 30 °C, $m=0.3$ (Leighton y Calo, 1981), podemos determinar la concentración en el líquido:

$$Concentración_{Liq} = \frac{37.3 \text{ mg/L}}{0.3} = 124.3 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \quad (2)$$

La masa de tolueno en gas será igual a:

$$\text{Masa tolueno}_{\text{gas}} = 37.3 \frac{\text{mg}_{\text{tol}}}{\text{L}_{\text{aire}}} * 0.513 \text{ L}_{\text{aire}} = 19.1 \text{ mg} \quad (3)$$

y la masa de tolueno en el líquido:

$$\text{Masa tolueno}_{\text{liquido}} = 124.3 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 0.1 \text{ L} = 12.4 \text{ mg} \quad (4)$$

La masa total de tolueno en el sistema estará dada por la suma de la masa en fase gaseosa y en fase líquida.

Masa total (M_T)= Masa de tolueno en el gas (3) +Masa de tolueno en el líquido (4)

Entonces la masa total determinada experimentalmente es:

$$M_T = 19.1 \text{ mg}_{\text{gas}} + 12.4 \text{ mg}_{\text{Liq}} = 31.6 \text{ mg}_{\text{totales}} \quad (5)$$

La concentración experimental será:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{masa}_{\text{gas}} + \text{masa}_{\text{liquido}}}{\text{volumen}_{\text{gas}} + \text{volumen}_{\text{liquido}}} = \frac{C_g * v_g + C_l * v_l}{v_{\text{total}}} = \frac{31.6 \text{ mg}}{0.613 \text{ L}} = 56.6 \frac{\text{mg}_{\text{tolueno}}}{\text{L}_T} \quad (6)$$

Todas las concentraciones de tolueno (6) presentadas en las gráficas fueron obtenidas a partir de los cálculos anteriores y serán denotadas por mg/L_T refiriéndose al volumen total del sistema.

1.2 Concentraciones de CO_2 producido en el sistema de cultivo.

Las áreas obtenidas a partir del análisis cromatográfico de muestras tomadas de la fase gaseosa, son relacionadas con las siguientes fórmulas para encontrar los porcentajes de CO_2 y O_2 .

$$\%O_2 = \left(\frac{\text{Area}O_2}{\text{Area}N_2} \right) \left(\frac{79.1}{0.9953} \right) \quad (1)$$

$$\%CO_2 = \left(\frac{\text{Area}CO_2}{\text{Area}N_2} \right) \left(\frac{\text{Area}N_2 * \text{Area}O_2}{\text{Area aire}} \right) (70.4735) \quad (2)$$

Una vez determinados los porcentajes de CO_2 , estos se expresaron en concentración mediante los siguientes cálculos, partiendo de la ley general de los gases ideales tenemos que:

$$PV = n R T \quad (3)$$

Despejando n

$$n = \frac{PV}{RT} \quad (4)$$

El porcentaje de CO_2 se puede expresar en mL de CO_2 en 100 mL de aire como sigue:

$$\% \text{CO}_2 = \frac{X \text{ mL CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} = \frac{1L}{1000 \text{ mL}} = \frac{X \text{ L CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} \quad (5)$$

siendo este el volumen que se utiliza para conocer el número de moles de CO_2 de la muestra, entonces sustituyendo en (4) tenemos:

$$n = \frac{(0.76 \text{ atm}) \left(\frac{X \text{ L CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} \right)}{\left(0.082 \frac{\text{atm mol}}{\text{L K}} \right) (303.15 \text{ K})} = \frac{X \text{ moles CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} \quad (6)$$

Posteriormente para obtener la concentración de CO_2 :

$$X \text{ gramos de CO}_2 = \frac{X \text{ moles CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} * 44 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \quad (7)$$

ó

$$X \text{ mg de CO}_2 = \frac{X \text{ moles CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} * 44000 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}$$

Para calcular la masa total de CO_2 , utilizamos el volumen de la fase gaseosa (513.8 mL) teniendo entonces que:

$$\text{Masa}_{\text{total}} \text{ de CO}_2 = \frac{X \text{ mg CO}_2}{100 \text{ mL}_{\text{aire}}} * 513.8 \text{ mL}_{\text{aire}} = X \text{ mg CO}_2 \quad (8)$$

La concentración en la fase gas esta dada por:

$$\text{Concentración de CO}_2 \text{ gas} = \frac{\text{mg CO}_2}{0.513 \text{ L}} = \frac{\text{mg CO}_2}{L} \quad (9)$$

Nuevamente se debe tomar en cuenta que existirá una concentración de CO₂, tanto en fase gaseosa como en fase líquida. El coeficiente de partición para el CO₂ es igual a 1.1977 (adimensional). Siguiendo un razonamiento similar al realizado para el tolueno, para conocer la concentración de CO₂ en el líquido tenemos que:

$$m = \frac{C_g}{C_l}$$

despejando la concentración de CO₂ en la fase líquida estará dada por :

$$C_l = \frac{C_g}{m} = \frac{\text{mg CO}_2}{L}$$

Tomando en cuenta el volumen de líquido igual a 0.1 L, la masa de CO₂ en el líquido es igual a:

$$\text{Masa de CO}_2 \text{ Liq} = \frac{\text{mg CO}_2}{L} * 0.1 \text{ L} = \frac{\text{mg CO}_2}{L}$$

La masa total de CO₂ en el sistema será la suma de la masa presente en fase gaseosa mas la masa de la fase líquida.

$M_T = \text{Masa en el gas} + \text{Masa en el líquido}$

Y la concentración total

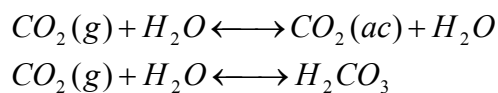
$$\text{Concentración total} = \frac{\text{Masa total}}{\text{Volumen total}} = \frac{Masa_{Li1} + Masa_{gas}}{Volumen_{Li1} + Volumen_{gas}} = \frac{\text{mg CO}_2}{L_T}$$

Los datos de CO₂ presentados en las gráficas de resultados fueron obtenidos tomando en cuenta estos cálculos y se presentan nuevamente en función al volumen total del sistema (mg/L_T). Los balances de carbono también están basados en las concentraciones totales de tolueno y CO₂ obtenidos de la forma que se acaba de describir.

1.3. Diferentes formas del CO₂ en la fase líquida.

Por otro lado, también se debe tomar en cuenta que de acuerdo al pH en el que se encuentre el medio de cultivo, existirá una cantidad del CO₂ disuelto en la fase líquida como H₂CO₃ y como CO₃.

En presencia del CO₂ gaseoso, el CO₂ disuelto está en equilibrio de acuerdo a la siguiente relación:



donde (g) y (ac) se refieren a las fases gaseosa y acuosa o disuelta, respectivamente. De esta forma la concentración de CO₂ acuoso, excede por mucho el H₂CO₃ disuelto, (en un orden de 10³), la concentración de todo el CO₂ disuelto estará representada mediante la concentración de H₂CO₃. La condición de equilibrio entre las fases se puede cuantificar mediante la solubilidad molar (ley de Henry)

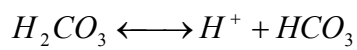
$$K_0 = \frac{[H_2CO_3]}{P_{CO_2}}$$

despejando

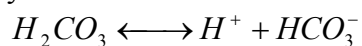
$$[H_2CO_3] = K_0 P_{CO_2}$$

donde la presión parcial P_{CO₂}, está en unidades de atm. K₀ es la solubilidad en mol/L y [H₂CO₃] es la concentración de CO₂ disuelto en mol/L de agua.

El H₂CO₃ se disocia en el agua de acuerdo a la siguiente reacción:



y



donde las condiciones de equilibrio son cuantificadas mediante las constantes de disociación

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3]}{H_2CO_3}$$

despejando

$$[HCO_3] = \frac{K_1 [H_2CO_3]}{[H^+]}$$

y

$$K_2 = \frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3]}$$

$$[CO_3^{2-}] = \frac{K_2 [H_2CO_3]}{[H^+]}$$

Así por ejemplo, para 3.3×10^{-5} moles de CO_2 en la fase gas, retomando la ecuación (14) y despejando para P:

$$PV = nRT$$

$$P = nRT/V$$

Sustituyendo tenemos que:

$$P_{CO_2} = \frac{(3.3 \times 10^{-5} \text{ moles}) \left(0.082 \frac{\text{atm L}}{\text{mol K}} \right)}{0.513 \text{ L}} = 0.016 \text{ atm}$$

y con una $K_o = 0.03013$ a 30°C

sustituyendo

$$[H_2CO_3] = K_o P_{CO_2} = (0.016 \text{ atm}) \left(0.03013 \frac{\text{mol}}{\text{L atm}} \right) = 4.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Y

$$[HCO_3] = \frac{K_1 [H_2CO_3]}{[H^+]}$$

y con una $K_1 = 4.753 \times 10^{-7}$ a 30°C , $[H_2CO_3] = 4.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ y $[H^+] = 8.232 \times 10^{-9}$

entonces

$$[HCO_3] = \frac{4.753 \times 10^{-7} \left(4.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right)}{[8.232 \times 10^{-9}]} = 0.0027 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$K_2 = \frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3]}$$

$$[HCO_3] = \frac{K_2 [H_2CO_3]}{[H^+]}$$

entonces si $K_2 = 0.527 \times 10^{-10}$, $[H_2CO_3] = 4.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $[HCO_3] = 0.0027 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

Las concentraciones de las distintas formas de CO_2 disuelto en el líquido fueron calculadas para un valor de pH del medio igual a 8 y fueron consideradas en la cantidad total de CO_2 obtenidas en los diferentes experimentos en medio de cultivo líquido.

1.4. Concentraciones de glucosa en el sistema.

Para ser consistentes y para efectos de comparación, las concentraciones de glucosa en el sistema se presentan en función al volumen total del sistema y no al volumen del líquido. Ya que al usar tolueno como sustrato (compuesto volátil) las concentraciones del mismo se obtuvieron a partir de la suma de la masa del compuesto en fase gas y en fase líquida referidas al volumen total de sistema. De esta forma, por ejemplo para la concentración inicial (1g/L) tenemos que la masa total será:

$$\text{Masa de glucosa}_{\text{líquido}} = \frac{1\text{g}}{\text{L}} * \frac{1\text{ L}}{1000\text{mL}} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} * 100\text{mL} = 100\text{mg} \quad (1)$$

mientras que la concentración estará dada por:

$$\text{Concentración de total de glucosa} = \frac{100\text{ mg}}{0.613\text{ L}} = 163 \frac{\text{mg}_{\text{glucosa}}}{\text{L}_T} \quad (2)$$

1.5 Balances de recuperación en base al carbono.

Los balances en base a carbono se realizaron tanto para los experimentos con tolueno como con glucosa, de la manera que se muestra a continuación, usando los datos de tolueno como ejemplo.

$$\text{Masa total inicial de tolueno} = 31.6 \text{ mg}_{\text{tolueno}} \frac{84 \text{ mg C}}{92 \text{ mg}_{\text{tolueno}}} = 28.8 \text{ mg C} \quad (2)$$

$$\text{Masa total final de CO}_2 = 49 \text{ mg}_{\text{CO}_2} \frac{12 \text{ mg C}}{44 \text{ mg}_{\text{CO}_2}} = 13.4 \text{ mg C de CO}_2 \quad (3)$$

$$\text{Masa total final de biomasa} = \frac{30 \text{ mg}_{\text{biomasa}}}{2} = 15 \text{ mg C de biomasa} \quad (4)$$

La suma de las fracciones de carbono (3) y (4) fue igual a:

$$\text{Fraccion de carbono recuperado} = 13.4 \text{ mg C} + 15 \text{ mg C} = 28.4 \text{ mg C}$$

El carbono inicial en el sistema fue igual a 28.8 mg (2) y el carbono recuperado fue de 28.4 mg, lo cual implica que todo el carbono inicial fue recuperado como CO₂ y biomasa. En cuanto a los porcentajes que corresponde a cada una de las fracciones tenemos:

$$\text{Porcentaje recuperado como CO}_2 = \frac{13.4 \text{ mg CO}_2}{28.8 \text{ mg C}_{\text{tolueno}}} = 46.5\%$$

$$\text{Porcentaje recuperado como biomasa} = \frac{15 \text{ mg biomasa}}{28.8 \text{ mg C}_{\text{tolueno}}} = 52\%$$

Finalmente el rendimiento de biomasa en función a sustrato para el tolueno será:

$$Y_{\text{biomasa/tolueno}} = \frac{30 \text{ mg biomasa}}{31.57 \text{ mg}_{\text{tolueno}}} = 0.95$$

El balance para el crecimiento con glucosa se realizó de forma similar.

2. Cálculos de actividades enzimáticas

2.1 Actividad enzimática de oxigenasas.

La actividad de oxigenasas se presenta en (nmolO₂/min mg_{micelio}) y los cálculos realizados para obtenerla se presentan a continuación:

Para una velocidad de consumo de oxígeno igual a 0.067 mgO₂/L min

$$0.067 \frac{\text{mg O}_2}{\text{L min}} (0.06 \text{ L}) = 4.02 \times 10^{-3} \frac{\text{mg O}_2}{\text{min}}$$

$$4.02 \times 10^{-3} \frac{\text{mg O}_2}{\text{min}} \left(\frac{1 \text{ mmol}}{32 \text{ mg}} \right) = 1.25 \times 10^{-4} \frac{\text{mmol O}_2}{\text{min}}$$

$$1.25 \times 10^{-4} \frac{\text{mmol O}_2}{\text{min}} \left(\frac{1 \times 10^6 \text{ nmol}}{1 \text{ mmol}} \right) = 125 \frac{\text{nmol O}_2}{\text{min}}$$

$$\frac{125 \text{ nmol O}_2}{25.6 \text{ mg Xo}} = 5 \text{ mmol}$$

2.2 Actividad enzimática de deshidrogenasa.

Las unidades de actividad enzimática son expresadas en unidades de nanomoles (nmol) de sustrato convertidos por minuto.

Según la ley de Lambert y Beer tenemos:

$$A \propto CL = KCL \quad (1)$$

Donde:

A = absorbancia, L = longitud de la celda, generalmente son de 1cm, C = concentración y
 K = coeficiente de extinción específico = $\frac{1 \text{ g de soluto}}{\text{L solución}}$

Análogamente

$$A = \epsilon CL \quad (2)$$

Donde:

$$\varepsilon = \text{coeficiente de extinción molar} = \frac{\text{L}}{\text{mol} * \text{cm}}$$

Para los experimentos realizados a una absorbancia de 340nm, el NAD tiene un coeficiente de extinción molar igual a $6250 \frac{\text{L}}{\text{mol} * \text{cm}}$, así resolviendo la ecuación 2, para la concentración se obtiene:

$$C = \frac{\text{Abs}}{6250 \frac{\text{L}}{\text{mol cm}} * 1 \text{ cm}}$$

Si la Abs = $0.047 \frac{1}{\text{min}}$, entonces sustituyendo:

$$C = \frac{0.047 \frac{1}{\text{min}}}{6250 \frac{\text{L}}{\text{mol cm}} * 1 \text{ cm}} = 7.52 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L min}}$$

$$C = 7.52 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L min}} \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) (3 \text{ mL}) = 2.25 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{min}}$$

$$C = 2.25 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{min}} \left(\frac{1 \times 10^{-9} \text{ nmol}}{\text{mol}} \right) = \frac{22.5 \frac{\text{nmol}}{\text{min}}}{1.41 \text{ mg proteína}}$$

$$C = 15.95 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{proteína}} \text{ min}}$$

Toluene Biofiltration by the Fungus *Scedosporium apiospermum* TB1

E. I. García-Peña,¹ S. Hernández,² E. Favela-Torres,¹ R. Auria,^{2,3} S. Revah²

¹Department of Biotechnology. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, P.O. Box 55-534, 09340 Mexico City, Mexico

²Department of Chemical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, P.O. Box 55-534, 09340 Mexico City, Mexico; telephone: (52) 58 04 6538; fax: (52) 58 04 4900; e-mail: srevah@xanum.uam.mx

³Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Ciceron 609, Los Morales, 11530, Mexico City, Mexico

Received 13 August 2000; accepted 11 February 2001

Abstract: The performance of biofilters inoculated with the fungus *Scedosporium apiospermum* was evaluated. This fungus was isolated from a biofilter which operated with toluene for more than 6 months. The experiments were performed in a 2.9 L reactor packed with vermiculite or with vermiculite-granular activated carbon as packing material. The initial moisture content of the support and the inlet concentration of toluene were 70% and 6 g/m³, respectively. As the pressure drop increased from 5–40 mm H₂O a strong initial growth was observed. Stable operation was maintained for 20 days with a moisture content of 55% and a biomass of 33 mg biomass/g dry support. These conditions were achieved with intermittent addition of culture medium, which permitted a stable elimination capacity (EC) of 100 g/m³ reactor·h without clogging. Pressure drop across the bed and CO₂ production were related to toluene elimination. Measurement of toluene, at different levels of the biofilter, showed that the system attained higher local EC (200 g/m³·h) at the reactor outlet. These conditions were related to local humidity conditions. When the mineral medium was added periodically before the EC decreases, EC of approximately 258 g/m³·h were maintained with removal efficiencies of 98%. Under these conditions the average moisture content was 60% and 41 mg biomass/g dry support was produced. No sporulation was observed. Evaluation of bacterial content and activities showed that the toluene elimination was only due to *S. apiospermum* catabolism. © 2001 John Wiley & Sons, Inc. *Biotechnol Bioeng* 76: 61–69, 2001.

Keywords: biofiltration; toluene; fungi; medium addition; *Scedosporium apiospermum*

INTRODUCTION

Emissions of volatile organic compounds (VOC) have recently become of increasing regulatory concern. There are many physicochemical methods for off-gas treatment, including absorption, adsorption, scrubbing, incineration, and catalytic oxidation, among others. In the last decade, bio-

logical abatement technologies such as biofiltration and biotrickling filtration have attracted popularity because of low cost, operational simplicity, and because they are intrinsically clean technologies. In particular, biofiltration has become an accepted and mature technique with industrial confidence for air pollution control (van Groenestijn and Hesselink, 1993).

Biofilters are biologically open systems. The large amounts of air which pass through them carry aerosols and dust and these in turn carry cells, spores, and cysts of a wide variety of organisms. As biofiltration proceeds, these species may thrive according to their abilities to adapt to the biofilter ecosystem. Bacteria and fungi are certainly the two dominant microorganism groups in biofilters. Most biofilms will contain substantial numbers of both, but their relative abundance can vary widely. Bacteria have the advantage of rapid substrate uptake and growth. Under favorable conditions they will dominate, although fungi will be present (Devinny et al., 1999). Fungi generally grow slowly; however, they are often capable of degrading a greater variety of pollutants and can withstand harsher conditions (Cox et al., 1996). The physiological capabilities of filamentous fungi are growth at low water activity, low pH, and the production of extracellular hydrolytic enzymes, among others. Most filamentous fungi grow better at low water activities compared to bacteria and yeast (Corry, 1973). For most filamentous fungi the optimal water activity for growth is between 0.93 and 0.98, although some species grow better at higher values. For most bacteria, growth is optimal at water activities above 0.99, while the minimum water activity for growth falls within the range of 0.9–0.99. The hyphal mode of growth allows filamentous fungi a major advantage over unicellular microorganism in the colonization of solid substrates and the utilization of available nutrients (Doelle et al., 1992). van Groenestijn and Hesselink (1993) showed that fungi could thrive where the pore water pH was 2.5, where the air in the biofilter was relatively dry, and even at temperatures between 60–71°C. de Castro et al. (1997) observed that colonies of various kinds in biofilters, using

Correspondence to: S. Revah

Contract grant sponsors: CONACYT (Mexican Council of Science and Technology) and OAS (Organization of American States)

various inocula and fungal patches, grew and waned as the treatment proceeded. Filamentous fungi such as *Cladosporium sphaerospermum* and *Scedosporium apiospermum* are consistently found in biofilters. After a long period of operation and frequent mixing of the support, they were the predominant population (Auria et al., 2000; Weber and Hartmans, 1996). However, the role they play has not yet been clearly elucidated.

Humidity has been reported as one of the most critical aspects in biofilter performance (Leson and Winer, 1991; Morales et al., 1998a). Drying out of the filter bed usually causes decreases of the degradation capacity of biofilters. Low water contents reduce the biodegradation activity and promote the formation of preferential flow channels (Leson and Winer, 1991; Morales et al., 1998b). Under these conditions, and taking into account the previously mentioned advantages of the fungi, the use of these microorganisms in biofilters could be advantageous. However, it is also important to observe that fungi can produce tangled erect filaments, which may obstruct the airflow, and they may cement the particle medium together. Heavy growth of erect forms may increase head loss and interfere with medium tilling or replacement (Auria et al., 1993; Devinny et al., 1999).

The complete aerobic biodegradation of toluene to carbon dioxide, water, and biomass has been extensively studied for a wide variety of bacteria (Kitayama et al., 1996; Olsen et al., 1994; Shields et al., 1989, 1991; Whited and Gibson, 1991; Worsey and Williams, 1975). However, only a limited number of publications report the use of fungi for toluene biodegradation. For example, Holland et al. (1988) reported partial degradation of toluene by fungi. In that study, cultures of *Mortierella isabellina* and *Helminthosporium* species were pregrown on a rich medium with glucose. The resulting mycelium was subsequently incubated in water for 72 h and later used to convert toluene into benzyl alcohol. Degradation of toluene by the rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* has been studied by using ring-labeled ^{14}C toluene (Yadav and Reddy, 1993). Several authors have found toluene elimination capacities in bacterial biofilters; all of them are in the range of 9–25 g/m³h (Morales et al., 1994; Severin et al., 1993; Sorial et al., 1994). The biofilters achieved higher efficiencies (60–80 g/m³h) with activated carbon as the packing material (Medina et al., 1995; Ortiz et al., 1998). More recent studies have demonstrated that fungal biofilters are capable of removing higher concentrations of toluene. Weber and Hartmans (1996) reported the growth of *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the only carbon and energy source. They found higher toluene removal rates when the biofilter was inoculated with fungi (45 g/m³h) instead of bacteria (28 g/m³h). Woertz et al. (1999) reported a maximum toluene elimination capacity of 285 g/m³h for a fungal bioreactor. This EC was obtained in a switch-directionally mode bioreactor with constant addition of nutrients.

The objectives of this work were to evaluate the capacity of *Scedosporium apiospermum* strain TB1 to grow and de-

grade toluene in a biofiltration system and to establish the conditions that promote preferential mold growth. Moreover, the adaptation, stability, and physiology of the fungus were studied in order to define the conditions of optimal reactor performance.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The reactor was inoculated with a suspension of *Scedosporium apiospermum* TB1 spores. The fungal strain was isolated from a peat biofilter which had been used to remove toluene from contaminated air (Auria et al., 2000). The microorganism was propagated and maintained on potato-dextrose-agar plates. *Scedosporium apiospermum*, an ascomycete, is the asexual form of *Pseudallescheria boydii* and has been described as an opportunistic fungus. It has an optimum temperature for growth at 30–37°C and is commonly found in soil and decaying vegetation, with a worldwide distribution.

Culture Medium

Vermiculite was mixed with a mineral medium containing (g/L): NaNO₃ 18; KH₂PO₄ 1.3; MgSO₄ · 7H₂O 0.38; CaSO₄ · 2H₂O 0.25; CaCl₂ 0.055; FeSO₄ · 7H₂O 0.015. Trace elements (g/L): MnSO₄ · H₂O 0.012; ZnSO₄ · 7H₂O 0.013; CuSO₄ · 7H₂O 0.0023, CoCl₂ · 6H₂O 0.0015; H₃BO₃ 0.0015. The culture medium was sterilized at 121°C for 15 min. In the first experiment, E1, the medium used was of double strength. A mixture of granular activated carbon and vermiculite (15:85) was used as the packing material in the third and fourth experiments, E3 and E4.

The packing material was inoculated with a spore suspension to an initial concentration of 2×10^7 spores/g of initial dry matter. The initial pH and moisture content were 4.5 and 70%, respectively.

Reactor

The experiments were performed in a biofilter consisting of a 1 m high cylindrical glass column with an 8 cm inner diameter. The volume of the filter bed was 2.9 L. The reactor was filled with the inoculated packing material. Air saturated with toluene was mixed with water-saturated air in order to obtain an initial toluene inlet concentration of 6 g/m³. Inlet air humidity was above 95%. The gas stream was introduced at the top of the reactor. Airflow was regulated at 2.5 L/min by means of mass-flow controllers (60061; Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). The empty bed residence time (EBRT) was 1.15 min. In some experiments, water or medium were added at the top by spraying through a nozzle. Elimination capacity (EC) of the toluene (S) is defined as $\text{EC (g/m}^3\text{h)} = (S_{\text{in}} - S_{\text{out}}) \cdot \text{Air Flow} / V_{\text{reactor}}$. Efficiency (%) is equal to $100 \cdot (S_{\text{in}} - S_{\text{out}}) / S_{\text{in}}$.

Analytical Methods

Toluene concentrations in the inlet and outlet stream of the biofilter were monitored with an FID gas chromatograph (GowMac, Series 580; Bridgewater, NJ, USA), equipped with a 1/8 in $\times$ 16 ft stainless steel column (Silar 10C, Grapac GC 80/100; Altech, Deerfield, IL, USA). The operation conditions were the same as those reported by Morales et al. (1998).

The CO₂ concentration at the outlet of the biofilter was measured with an infrared analyzer (3400 Gas Analyzers; California Analytical Instruments, USA), the reported values correspond to the difference between the outlet and the inlet (ambient) CO₂ concentrations. The pressure drop was determined online by using a pressure transducer (22370, 1E11-2; Omega Engineering, Stanford, CA, USA). Data acquisition device was used to monitor flows, temperature, CO₂ production, and pressure drop.

The final biomass was determined by extracting the protein from the support. One gram of the packed material was mixed with 5 mL of phosphoric acid (0.5 M). The sample was boiled in a bath for 7 min and centrifuged (5000 rpm for 15 min), as reported by Córdova et al. (1996). The protein in the solution was quantified using the Bradford method. Mycelium of *S. apiospermum* obtained by liquid cultivation was used to obtain the reference curve.

Microbial Studies

To determinate the microbial populations, 1 g of support material was mixed with 10 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl) and homogenized for 15 min using a magnetic stirrer. Serial dilutions of the homogenized sample were prepared and 0.1 mL aliquots were spread on a nutritive agar plate (for bacteria) and on potato dextrose agar (for fungi). The number of colonies on the plates was counted. Cell counts are reported as cfu/g of dry matter.

Parallel experiments in small reactors (packed volume 0.235 L; inlet flow rate 0.07 L/min; EBRT 3.36 min) were performed to establish the effect of bacterial development on toluene consumption in the fungal biofilter. The support was prepared as mentioned above and 55 g were packed in small reactors, identical to those reported by Auria et al. (1993). A similar system to that of the biofilter was used to feed toluene in air. Up to eight parallel experiments could be run simultaneously with this configuration. Duplicate experiments were performed by adding 25 mg/L of chloramphenicol to the nutrient medium and the spore inocula to inhibit bacterial development. Controls were tested without the antibiotic.

Microcosms Experiments

Closed environments (microcosms) were also used to evaluate the toluene degradation rates. The experiments were performed in 125 mL serum bottles sealed with Mininert Teflon Valves (VICI; Precision Sampling, Baton Rouge,

LA). Four grams of wet material were introduced into previously sterilized bottles. Five μ L of liquid toluene was injected by using a syringe in order to obtain an initial headspace concentration of 35 g/m³. Toluene was periodically measured from the headspace by gas chromatography. The integrated Gompertz model was used to analyze the maximum toluene consumption rate ($V_{\max}$), as described by Acuña et al. (1999).

RESULTS

Growth Pattern of *S. apiospermum* in the Biofilter

The growth pattern of *S. apiospermum* on vermiculite under the biofiltration conditions was evaluated in the first experiment, E1. The fungal strain was able to use toluene as the only carbon and energy source and the system reached high elimination capacities (ECs). In this experiment a double strength medium was used. Three different phases were clearly observed: since the biofilter was inoculated with a spore suspension of *S. apiospermum*, the initial phase corresponded to the germination of the spores. During this time almost no degradation of toluene was detected and the pressure drop was low and stable. After germination, in the second stage the microorganism started to degrade the toluene and a maximum degradation rate of toluene was reached. An increase in the pressure drop during this period was related to the growth rate and to the occupation of the void space of the biofilter. The high density of the mycelium caused channeling and shrinkage. In the last phase a decrease in the EC was due to low moisture content, induced by drying, and to the shrinkage of the packing material.

Figure 1 presents the EC, the CO₂ production rate, and the pressure drop (ΔP) as a function of time. In this experiment (E1), a maximum EC (90 g/m³h) was reached after 9 days of operation. ECs between 60 and 80 g/m³h were maintained over a 5-day period. A decrease of EC after this period was due to the low moisture content of the biofilter

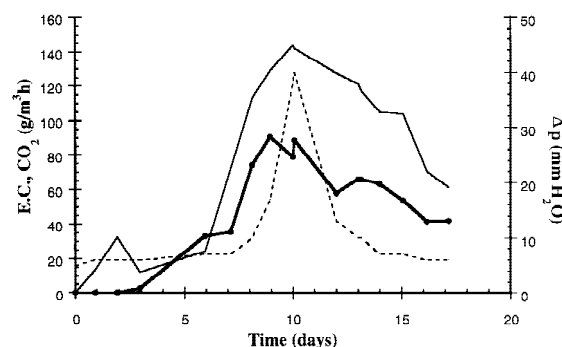


Figure 1. Evolution of elimination capacity (—●—), carbon dioxide production (—), and pressure drop (---) with time in a biofilter inoculated with a fungal strain *Scedosporium apiospermum* in the first experiment (E1).

(42% of the average humidity content). In this experiment, no water or medium was added.

The degradation of toluene was associated with the production of CO₂. The initial pressure drop (ΔP) of the biofilter was 5 mm H₂O. After 8 days, an increase up to 40 mm H₂O was related to mold growth, which results in a reduction in the bed permeability (Auria et al., 1993). Due to fungal growth (axial and radial), compaction of the bed was observed. This compaction induced shrinking and formation of preferential channels in the biofilter, which resulted in the decreases of ΔP . Moreover, drying induced a further decrease in the ΔP value and in the EC.

In this experiment 17,650 g toluene /m³_r (16,110 gC/m³_r) was consumed and 29,840 g CO₂/m³_r (8140 gC/m³_r) was produced; 50% of the removed toluene was converted to CO₂. Biomass measurements in mg per grams of dry mass (mg/g DM) showed that after 20 days of operation (see Table I), the highest biomass concentration (32.4 mg/g DM) was located at the center section of the biofilter bed. Low biomass values (6.4 mg/g DM), found at the inlet of the biofilter, may occur due to the drying of the solid material (23% of moisture content after 20 days of culture) induced by incomplete air saturation at the inlet. A final average concentration of biomass of 18 mg/g DM corresponds to 15% of the retained carbon (assuming that 50% of the biomass is carbon). The unaccounted carbon could probably be found as carbonates, intermediates, and extracellular polymers, as reported by Morales et al. (1998) for a bacterial biofilter. The decreases of EC in the biofilter may be due to the compaction of the packing material and the important reduction in moisture content.

The obtained EC values were higher as compared with the ones reported by Weber and Hartmans (1996), (45 gC/m³h) for a fungal biofilter. Nevertheless, the high EC was only maintained for a short period of 6 days during this experiment.

Impact of the Moisture Content and Compactness of the Filter Bed in the Degradation Capacity of the Biofilter

To reduce the compaction due to high biomass concentration and drying of the biofilter a second experiment (E2)

Table I. Final values of moisture content and biomass for the different experiments

Height (cm)	Moisture content (%)				Biomass (mg/g DM)			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
From 0–12	23	13	20	50	6.8	10.4	24.5	39
From 12–24	38	45	33	54	28.1	27.0	28.4	39
From 24–35	40	52	49	60	32.4	26.3	34.7	43
From 35–46	50	63	69	67	12.6	20.2	38.0	42
From 46–58	52	64	69	68	12.7	18.6	42.5	41
Average	42	52	55	61	18	20	33	41

E1, no water addition; E2, water addition; E3 and E4, mineral medium addition (E1 at 20 days, E2, E3, and E4 at 60 days of operation). The values were measured at five different levels of the biofilter.

was carried out. In E2 water was added intermittently to the system and the mineral medium concentration reported in Methods was used. This concentration corresponds to half of that used in E1. The kinetics of toluene EC, CO₂ production, and pressure drop are presented in Figure 2. During the first 4 days, the EC was between 20 and 30 g/m³h and it increased rapidly up to a maximum value of 110 g/m³h on the 14th day of operation. As in the first experiment, the production of CO₂ and the ΔP were associated with the toluene uptake. The EC was approximately 60 ± 10 g/m³h between days 15 and 22 and then it began decreasing. This fact might be related to the drying of the filter bed after 23 days of operation. In order to recover the biological activity, water was sprayed to the biofilter on the 26th day. The increase of the EC (up to 80 g/m³h) clearly showed that the system was already water-limited. The EC remained stable at 40 g/m³h until new drying conditions occurred. A new cycle was repeated at the 42nd day. Longer periods of productive phase were not maintained probably due to the fact that no nutrients were added in this experiment and the frequent water addition promoted nutrient leaching which, in turn, reduced biomass and activity. Water addition reduced the drying problem and the final average moisture content was 55% (see Table I).

After the total operation time, 59,250 g toluene /m³_r (54,100 gC/m³_r) was consumed and 85,860 g carbon dioxide /m³_r (23,410 gC/m³_r) was produced; 43.3% of the consumed carbon was recovered as CO₂, while 5% was converted to biomass and the rest, 54%, was retained as carbonates, intermediates, extra cellular polymeric substances, or leached during water addition.

Effect of the Addition of Nutrients in the Degradation Capacity of the Biofilter

In a third experiment (E3), mineral medium was added to the biofiltration system and a mixture of vermiculite and activated carbon was used as packing material in order to maintain high biological activity. Previous studies carried

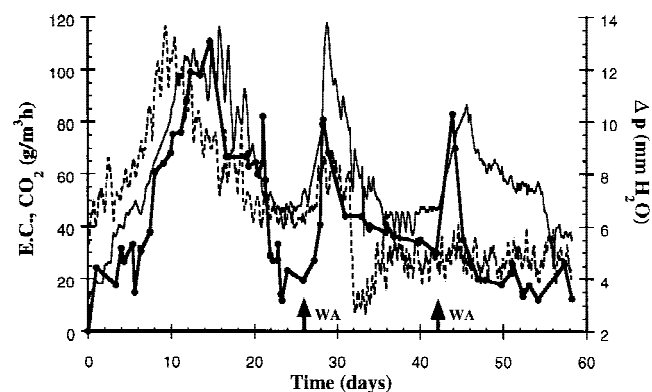


Figure 2. Evolution of elimination capacity (—●—), carbon dioxide production (—), and pressure drop (---) in a biofilter inoculated with a fungal strain *Scedosporium apiospermum* in the second experiment (E2). Water addition (WA) on days 26 and 42 (↑).

out on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) biodegradation (Ortiz et al., 1998) showed that in a biofiltration system with vermiculite-activated carbon as support material, the process stability and the BTEX removal efficiency were improved, as compared with the case of vermiculite alone. The use of vermiculite-carbon reduced void space, increased the biofilm superficial area, improved mechanical stability, and allowed direct addition of nutrients. The kinetics of EC, CO_2 production, and ΔP in E3 are shown in Figure 3. After a lag period of 20 days, the EC increased up to $80 \text{ g/m}^3\text{h}$ and remained constant for 25 days. The overall removal efficiency after the lag period was 50%, with an average toluene concentration in the inlet air of 5 g/m^3 . Additions of mineral medium were made when the EC decreased below $40 \text{ g/m}^3\text{h}$. This strategy maintained the system at EC of $80 \pm 10 \text{ g/m}^3\text{h}$ for a period of 25 days. The increase of biomass shown in Table I was linked to the addition of nutrients. Due to the increased biomass, the ΔP reached higher values than in the previous experiments and no shrinkage was observed.

During this experiment, $66,010 \text{ g toluene /m}^3_r$ ($60,270 \text{ gC/m}^3_r$) was consumed and $96,200 \text{ g carbon dioxide /m}^3_r$ ($26,240 \text{ gC/m}^3_r$) was produced; 43.5% of the consumed toluene was recovered as CO_2 , while 7.5% correspond to the biomass, taking into account the final measured value of produced biomass during the entire operation period (33 mg/g DM).

The EC at different heights in the biofilter was evaluated after 55 days of operation in E3 (see Fig. 4). The maximum EC was obtained ($160 \text{ g/m}^3\text{h}$) at the bottom of the biofilter (outlet). Addition of mineral medium produced a higher EC ($200 \text{ g/m}^3\text{h}$). This increased EC in the lower part of the biofilter corresponds to the part where the moisture loss was minimal (see Table I). In contrast, a maximum EC of only $20 \text{ g/m}^3\text{h}$ at the upper section of the biofilter was found with average moisture content of 30%.

Following the strategy of mineral media addition, a fourth experiment was performed (E4). In this experiment the addition of medium to the system was periodic (every 15

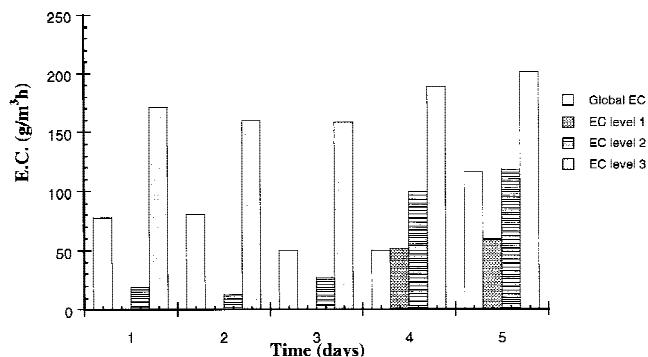


Figure 4. Elimination capacities in different levels of the biofilter. Global, global EC in the reactor; Level 1, inlet; Level 2, center; and Level 3, outlet of the biofilter, respectively. Data obtained in E3.

or 17 days) to avoid the drop in metabolic activity caused by nutrient or water limitation. In Figure 5, the EC, CO_2 production rates, and ΔP are presented for this last experiment. The behavior of the parameters was similar to the one obtained in others experiments. The start-up period began on the 12th day, when the EC reached a maximum of $100 \text{ g/m}^3\text{h}$. Two additions of media promoted a very high EC of $400 \text{ g/m}^3\text{h}$. A stable period, with EC values of approximately $250 \text{ g/m}^3\text{h}$, was maintained for 15 days. During this period the removal efficiency was 98% for a toluene concentration between $5\text{--}6 \text{ g/m}^3$ in the inlet air. On day 44 through 46 the incoming air was not humidified because of an operational problem. After this time the filter bed displayed severe drying and the global EC sharply dropped to $60 \text{ g/m}^3\text{h}$, where it stabilized after air humidification was restored. An attempt to recover the EC on day 55 proved to be ineffective.

The distribution of the measured biomass (see Table I) was homogeneous, with an average value of 40 mg/g DM . Periodic medium additions minimized biofilter drying and allowed a better distribution of biomass throughout the reactor. The results were better when the medium was added before the EC decreases, as observed in E3. The average of

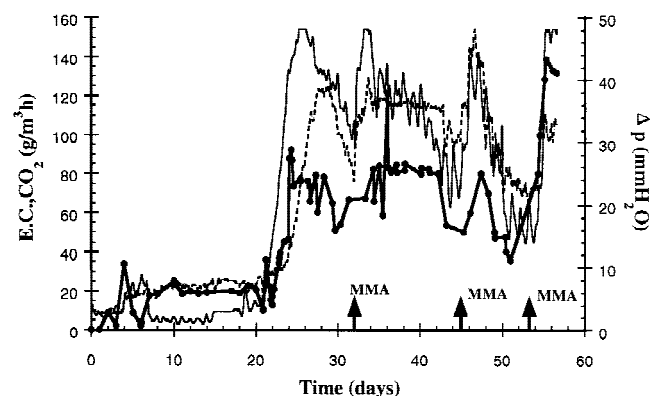


Figure 3. Evolution of elimination capacity (—●—), carbon dioxide production (—), and pressure drop (---) in a biofilter inoculated with a fungal strain *Scedosporium apiospermum* in the third experiment (E3). Mineral medium addition (MMA) on days 32, 45, and 53 (↑).

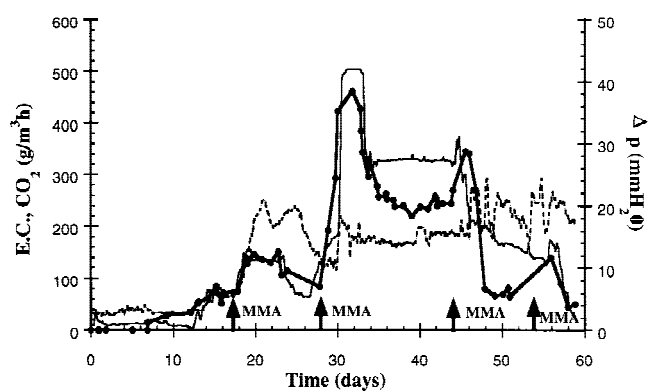


Figure 5. Evolution of elimination capacity (—●—), carbon dioxide production (—), and pressure drop (---) in a biofilter inoculated with a fungal strain *Scedosporium apiospermum* in the fourth experiment (E4). Mineral media addition (MMA) on days 17, 28, 44, and 54 (↑).

biomass was 41 mg/g DM and, as in E3, no compaction of the packing material was observed. The total toluene consumed after the operation period was 156,910 g/m³_r (143,270 gC/m³_r) and the produced CO₂ was 230,370 g/m³_r (62,830 gC/m³_r); 43.8% of the consumed toluene was recovered as carbon dioxide, while 5% of the carbon consumed corresponded to biomass.

Table II shows the total toluene consumed, the total CO₂ produced, and the average EC of the biofilter in the different experiments. In the last experiment (E4), when mineral media was added periodically, 10 times more toluene was consumed. The biomass in E4 was double (41 mg/g DM) that found in E1. This amount of biomass was not sufficient to clog the biofilter and permitted high, stable removal rates.

Effect of Organic Load on EC

The experiment was carried out with an inlet toluene concentration of 3–9 g/m³ between days 18–28 in E4 and the results are depicted in Figure 6. These concentrations correspond to a toluene load of 220–628 g/m³h. The toluene elimination capacity, between 220–361 g/m³h, was linear with respect to toluene loading. The EC attained a maximum value of 361 g/m³h when the toluene load was greater than 400 g/m³h. This result is similar to the one reported by Woertz et al. (1999) for a fungal biofilter for removal of toluene and is at least six times greater than the toluene elimination capacities typically reported for bacterial systems.

Microbial Population

Microscopic examination of the samples was performed in the four experiments and was found that mold was the predominant microorganism. For a more detailed study on the effect of bacteria the distribution of the microbial population was evaluated in samples from the small reactors after 20 days of operation. In the control experiments, microbial counts were 1.68 × 10⁶ cfu/g DM and 3.33 × 10⁸ cfu/g DM for bacteria and fungus, respectively. In the experiments with added chloramphenicol (25 mg/L) no bacteria were found and the fungi count was similar to the control (1.1 × 10⁸ cfu/g DM). Elimination capacities were around 120 g/m³h for both experiments. The results were further confirmed by microcosms. With this technique and using the

Table II. Total consumed toluene, total produced carbon dioxide, and average EC after the complete period of operation in the experiments

Experiment	Duration (days)	Total consumed toluene (g/m ³ _r)	Total produced carbon dioxide (g/m ³ _r)	Average EC (g/m ³ h)
E1	20	17,650	29,840	45
E2	60	59,250	85,860	44
E3	60	66,010	96,200	50
E4	60	156,910	230,370	133

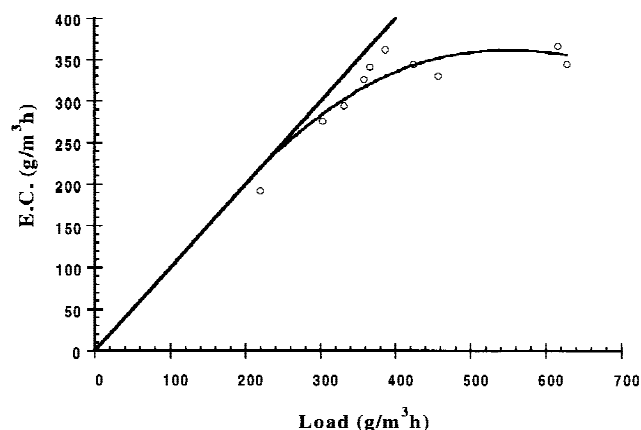


Figure 6. Response of the elimination capacity at different inlet toluene load in E4. Experiments were performed between days 18 and 28.

method reported by Acuña et al. (1999), an estimated EC of 114 (g/m³h) was obtained. This EC was similar to the EC obtained in the small reactors at the same time that the sampling was made and to the values during the start-up of the biofilters.

Scanning Electron Microscopy

Samples of the packing material were observed under scanning electron microscopy (SEM). Figure 7A shows the vermiculite structure before inoculation. The colonization of the vermiculite by *S. apiospermum* and abundant growth after 45 days of operation of the biofilter (E4) is shown in Figure 7B,C. Closer observation of the mycelia show the characteristic morphology of the microorganism (Fig. 7C,D). Few bacteria were observed.

DISCUSSION

The main goal of this research was to establish the conditions for treating high toluene loading at consistently high removal efficiencies by means of the fungal strain *Scenedosporium apiospermum*. In the first experiment, it was demonstrated that the microorganism grew on toluene as its sole carbon and energy source under biofiltration conditions. Moreover, the system reached higher EC compared with those reported for bacterial systems.

High activities have been reported in the literature for the removal of organic compounds in biofilters (Morales et al., 1998b; Woertz et al., 1999). However, it is unclear if these high activities can be maintained for long periods of time. The major practical requirement for a biofilter is the maintenance of optimum moisture content in the filter material. Moisture is essential for the survival and metabolism of the resident microorganism. Nonoptimum moisture content may also result in compaction. Moisture content between 40–60% by weight is considered optimal (Leson and Winer, 1991). Humidification of incoming waste gas is the preferential method to prevent accelerated bed drying. Additional

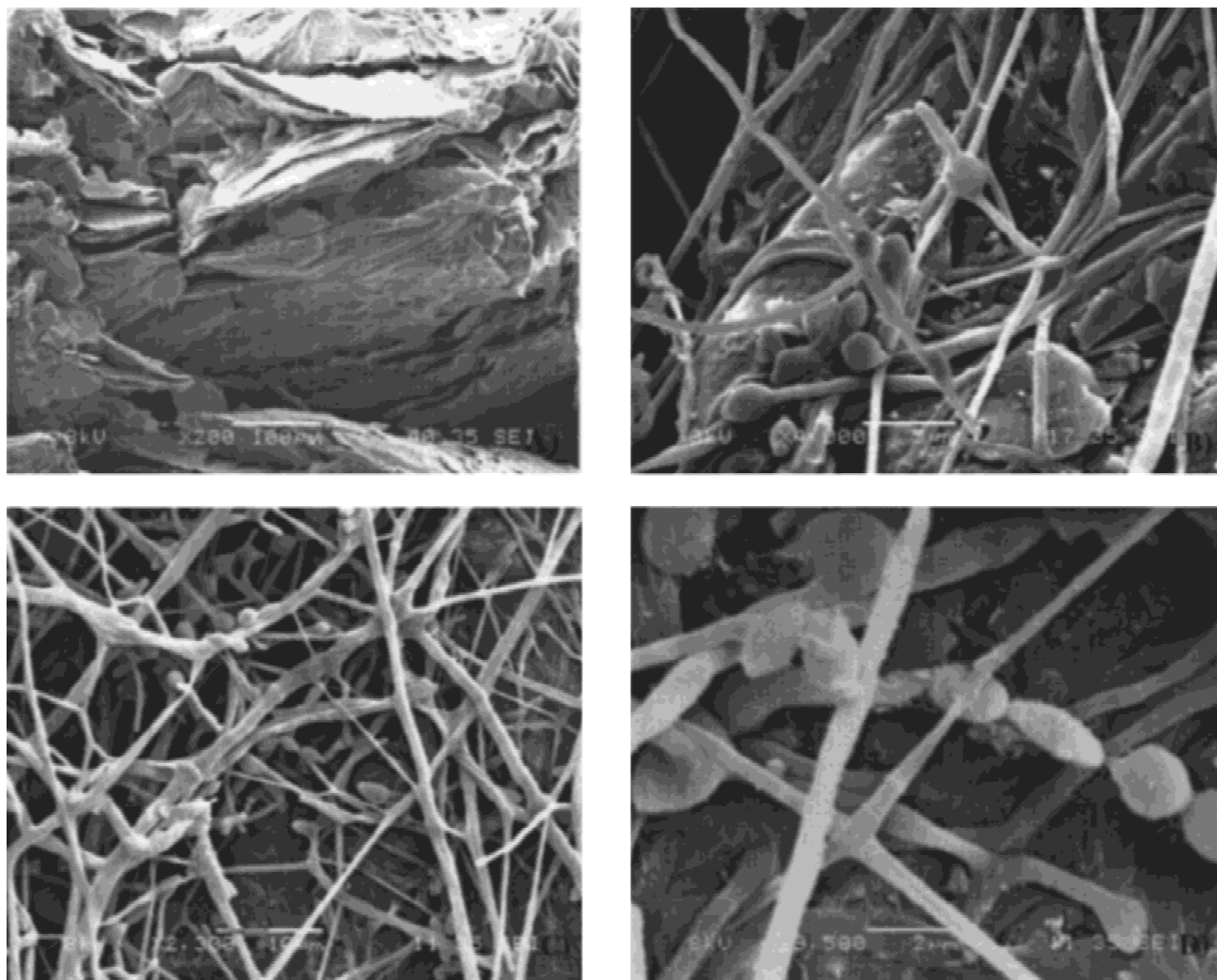


Figure 7. SEM microphotographs of *Scedosporium apiospermum* on vermiculite biofilter **A:** Before inoculation. **B:** Growth of the microorganism on the packing material. **C:** Colonization of the support. **D:** Characteristic morphology.

moisture, often added to a biofilter bed by surface spraying, is usually performed. This strategy was used in the second experiment in order to maintain the high EC obtained during the start-up of the biofilter. The system showed an increase in the degradation activity after the addition of water. However, this could not be maintained, probably due to nutrient leaching from the vermiculite.

As is well known (Devinny et al., 1999), organic support materials (such as compost, peat, bark, etc.) have sufficient nutrients to sustain biological oxidation of VOCs. The mineralization of the packing material promotes compaction and pressure buildup. In the present study an inert packing material was used. The use of inorganic support material yields a more uniform gas distribution and better biological contact. These characteristics result in a more consistent operation because there exists a better overall pressure drop control, as well as better nutrient and pH control (Sorial et al., 1995). However, in this class of packing material nutrients must be added.

There have been few published accounts of the effects of

nutrient limitations on biofilter performance and in some cases nutrient availability can become a limiting factor for improved performance. For example, the addition of nutrients to a biofilter has been shown to significantly increase toluene removal (Don, 1985; Auria et al., 2000). The recycling of media with nutrients is the system used in trickle-bed reactors. Removal of organic compounds, such as toluene from waste gases with a trickle-bed reactor, can result in clogging of the reactor due to the formation of an excessive amount of biomass (Weber and Hartmans, 1996). In the third experiment, mineral medium was added as the EC decreased to $40 \text{ g/m}^3\text{h}$, which allowed the system to reach and maintain high EC ($80 \pm 10 \text{ g/m}^3\text{h}$) without the problems of clogging produced by excessive biomass. On the other hand, the addition of medium allowed the control of moisture content as well and an average of 55% moisture content was maintained. Continuous addition of medium allows better EC due to increases in biomass and activity (Acuña et al., 1999; Woertz et al., 1999) but clogging would have to be controlled. Measurements of toluene at different

levels of the biofilter in E3 showed that the system attained higher EC (up to 200 g/m³h) in the reactor outlet due to local humidity conditions. The mold showed high EC when important biomass and appropriate environmental conditions were attained. This fact suggests that the reactor conditions could still be optimized and an increase in the overall performance could be expected.

In the last experiment (E4), the addition of nutrient was made before the EC decreases, which enhanced the performance of the fungal biofilter, showing a global EC of 258 g/m³h (95–98% removal efficiency). This value was higher as compared with those obtained for bacterial biofilters and for a fungal system (Weber and Hartmans, 1996) and similar to the one reported for bacterial yeast consortium and for a fungal biofilter (Morales et al., 1998b; Woertz et al., 1999). Woertz et al. (1999) reported EC values of up to 285 g/m³h for a fungal system with continuous addition of nutrients. With the *S. apiospermum* biofilter the addition of nutrients was limited to reduce clogging and promote sustained operation. This approach proved to be effective to maintain the overall performance of the biofilter. Adequate conditions can influence reactor performance over a longer period of time.

An increase in the total amount of biomass and in specific activity would be expected if sufficient nutrients were available in the filter bed (Morales et al., 1998b; Woertz et al., 1999; Auria et al., 2000). However, in the last experiment (E4) the increment in the average biomass (41 mg/g DM), as compared with E3 (33 mg/g DM), cannot by itself explain the wide differences in the degradation and removal rates. It is possible that the periodic addition of medium before the decreases of EC increased the activity by reducing nutrient and water limitations. Furthermore, the addition induced a homogenous distribution of biomass that was corroborated by the results in Table I and the stable behavior of the ΔP depicted in Figure 5. When these results are compared with those of E3, it may be observed that when medium was added as the activity dropped (E3), growth was more heterogeneous. This probably provoked local obstructions that induced higher local, and hence global, ΔP . On the other hand, it would be expected that if the medium is added in excess, an overgrowth of the fungus will occur, causing high ΔP and eventually clogging of the system.

The carbon balance in the different experiments shows that approximately 43–45% of the consumed carbon may be recovered as CO₂ and only 5–7% is incorporated as biomass. This fact implies that under these conditions the toluene is assimilated by the biomass, resulting in the accumulation of reserve materials or extracellular polysaccharides (EPS). Further investigations are necessary to understand the fundamental mechanism of biodegradation in fungal biofilters and in order to locate the carbon incorporated in the biomass and in the reserve materials or EPS.

Fungal growth under low water activities can take place for short periods of time. However, for biofiltration systems, where the operation must be maintained for longer times, the addition and control of the moisture content, as well as

the replacement of nutrients, enhance the fungal degradation of toluene.

In conclusion, the fungal biofilter proved to be an effective system to efficiently remove high toluene loads. High performances were achieved under controlled conditions of moisture and nutrient availability, which induced homogenous growth with an acceptable pressure drop. On the other hand, insufficient medium or water addition temporarily improved results, but these could not be sustained. The response of the system to shock or suboptimal conditions was not as robust as bacterial biofilters. Further studies should be conducted to develop reliable sensors and control strategies.

The authors thank Dr. Jose Sepulveda (SEM photos) and Dr. Gretchen Lapidus.

References

- Acuña ME, Pérez F, Auria R, Revah S. 1999. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng* 63:175–184.
- Auria R, Morales M, Villegas E, Revah S. 1993. Influence of mould growth on the pressure drop in aerated solid-state fermentors. *Biotechnol Bioeng* 41:1007–1013.
- Auria R, Frere G, Morales M, Acuña ME, Revah S. 2000. Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol Bioeng* 68:448–455.
- Córdova J, Gutiérrez M, Huerta S, Saucedo G, Favela E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model support in solid-state fermentation. *Biotech Tech* 10:1–6.
- Corry JEL. 1973. The water relations and heat resistance of microorganisms. *Progr Ind Microbiol* 12:73–108.
- Cox HHJ, Moerman RE, van Baalen S, van Heiningen WNM, Doddema HJ, Harder W. 1996. Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol Bioeng* 53: 259–266.
- de Castro A, Allen DGG, Fulthorpe RR. 1997. Characterization of the microbial population during biofiltration and the influence of the inoculum source. In: *Proc 1997 Air Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition* Toronto, Ontario. June 8–13, 1997.
- Devinny JS, Deshusses MA, Webster TS. 1999. *Biofiltration for air pollution control*. New York: Lewis Publishers.
- Doelle WH, Mitchell AD, Rolz EC. 1992. *Solid substrate cultivation*. New York: Elsevier Applied Science.
- Don JA. 1985. The rapid development of biofiltration for the purification of diversified waste gas streams. In: *VDI Berichte 561*. Dusseldorf, Germany: VDI Verlag.
- Holland HL, Brown FM, Muñoz B, Ninniss RW. 1988. Side chain hydroxylation of aromatic hydrocarbons by fungi. II. Isotope effects and mechanism. *J Chem Soc Perkins Trans* 11:1557–1563.
- Kitayama A, Suzuki E, Kawakami Y, Nagamune T. 1996. Gene organization and low regioespecificity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* J1104. *J Ferment Bioeng* 82:421–425.
- Leson G, Winer AM. 1991. Biofiltration, an innovative air pollution control technology for VOC emission. *J Air Waste Manage Assoc* 41: 1045–1054.
- Medina VF, Devinny JS, Ramaratman M. 1995. Biofiltration of toluene vapors in a carbon medium biofilter. *Third International In Situ and On-site Bioremediation Symposium*. San Diego, CA, USA.
- Morales M, Auria R, Pérez F, Revah S. 1994. Toluene removal from air stream by biofiltration. In: Galindo E, Ramirez T, editors. *Advances in*

- Bioprocess Engineering. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press. p 405–411.
- Morales M, Hernández S, Revah S, Auria R. 1998a. Modeling drying process on biofiltration. In: Proc 1998 Air Waste Management Association's 91st Annual Meeting & Exhibition San Diego, CA. June 14–18, 1998.
- Morales M, Revah S, Auria R. 1998b. Start-up and the effect of gaseous ammonia additions on a biofilter for the elimination of toluene vapors. *Biotechnol Bioeng* 60:483–491.
- Olsen RH, Kukor JJ, Kahammer B. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PK01. *J Bacteriol* 176:3749–3756.
- Ortiz I, Morales M, Gobbée C, Revah S, Guerrero VM, Auria R. 1998. Biofiltration of gasoline VOCs with different support media. In: Proc 1998 Air Waste Management Association's 91st Annual Meeting & Exhibition San Diego, CA. June 14–18, 1998.
- Severin BF, Shi J, Hayes T. 1993. Destruction of gas industry VOCs in a biofilter. IGT Sixth International Symposium on Gas, Oil, and Environmental Technology. Colorado Springs, CO, USA.
- Shields MS, Montgomery SO, Chapman PJ, Cuskey SM, Pritchard PH. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl Environ Microbiol* 55:1624–1629.
- Shields MS, Montgomery SO, Cuskey SM, Chapman PJ, Pritchard PH. 1991. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Appl Environ Microbiol* 57:1935–1941.
- Sorial GA, Smith FL, Smith PJ, Suidan MT, Biswas P, Brenner RC. 1994. Biofilters treat contaminated air. *Water Environ Technol* 6:50–54.
- Sorial GA, Smith FL, Suidan MT, Biswas P, Brenner RC. 1995. Evaluation of trickle bed biofilter media for toluene removal. *J Air Waste Manage Assoc* 45:801–810.
- van Groenestijn JW, Hesselink PGM. 1993. Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation* 4:283–301.
- Weber F, Hartmans S. 1996. Prevention of clogging in a biological trickle-bed reactor removing toluene from contaminated air. *Biotechnol Bioeng* 50:91–97.
- Whited GM, Gibson DT. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol* 173:3010–3016.
- Woertz JR, Kinney KA, McIntosh NDP, Szaniszlo PJ. 1999. Removal of toluene in a fungal vapor-phase bioreactor. Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. San Diego, CA, USA.
- Worsey M, Williams PA. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J Bacteriol* 124:7–13.
- Yadav JS, Reddy CA. 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl ENVIRON Microbiol* 21:756–762.