



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 25/01/2018

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERIA de la alumna TERESA DE JESÚS GARCIA PEREZ, matrícula 2131802396, quien cumplió con los créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 30 créditos de TRABAJO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION SOBRE EL TEMA DE LA TESIS y 30 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha veinticinco de enero del 2018 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL DESEMPEÑO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS EN EL TRATAMIENTO DE EMISIONES GASEOSAS (METANOL, SULFURO DE HIDRÓGENO Y METANO)

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 60 créditos y el programa consta de 120 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

Secretaria

DR. JUAN MANUEL MORGAN SAGASTUME

DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA

Vocal

Vocal

DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

DR. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS



UNIDAD CUAJIMALPA, Coordinación de Sistemas Escolares

Av. Vasco de Quiroga No. 4871 • Col. Santa Fe Cuajimalpa, Del. Cuajimalpa de Morelos • C.P. 05348 Ciudad de México • Tels. 5814 • 6521 y 5814 • 6522 • Correo electrónico: ccse@correo.cua.uam.mx



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA**

**Estrategias para mejorar el desempeño de sistemas biológicos en
el tratamiento de emisiones gaseosas (metanol, sulfuro de
hidrógeno y metano)**

Tesis que presenta:

M. en C. Teresa de Jesús García Pérez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Naturales e Ingeniería

Director Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesora Dra. Javiera Cervini Silva

JURADO

Presidente Dr. Juan Manuel Morgan Sagastume

Secretario Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Vocal Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Vocal Dr. Luis Gilberto Torres Bustillo

25 de enero de 2018

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Planta Piloto de Bioprocesos (PPU-4) y laboratorio de emisiones gaseosas (W-107) de la UAM-Iztapalapa, en el en el Laboratorio de Bioprocesos de la UAM-Cuajimalpa, y en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid (España), bajo la dirección del Dr. Sergio Revah Moiseev.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 372404) y de la Universidad Autónoma Metropolitana.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 25 de enero de 2018, la que suscribe Teresa de Jesús García Pérez, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente tesis doctoral intitulada: “Estrategias para mejorar el desempeño de sistemas biológicos en el tratamiento de emisiones gaseosas (metanol, sulfuro de hidrógeno y metano)” realizada bajo la dirección del Dr. Sergio Revah Moiseev, y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: srevah@correo.cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Teresa de Jesús García Pérez

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Teresa de Jesús García Pérez, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en este documento, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

Teresa de Jesús García Pérez

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO

La que suscribe, Teresa de Jesús García Pérez, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Teresa de Jesús García Pérez.

Teresa de Jesús García Pérez

Nombre y firma del alumno

A mi madre, por su ejemplo de lucha, paciencia y amor.
Siempre serás mi más grande y maravilloso ejemplo de vida

A mis hermanos por su amor, confianza y lucha constante...

AGRADECIMIENTOS

A cada persona que de forma directa o indirecta me ha acompañado a través de este camino de la búsqueda de, más que un grado, una forma de vida y una vocación.

Agradezco muy en especial al Dr. Sergio Revah por sus invaluable consejos, comentarios y recomendaciones, profesionales y personales, muchas gracias por haber creído en mí y aceptar ser parte fundamental de este proyecto.

Al Dr. Raúl Muñoz, gracias por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y gracias aún más por su amistad.

A los revisores de esta tesis, Dra. Javiera, Dra. Marcia, Dr. Luis, Dr. Morgan y Dr. Gabriel, gracias por dedicar parte de su valioso tiempo para enriquecer este trabajo.

A Miguel Ángel, muchas gracias por tu amor, paciencia y compañía y por ser parte invaluable en mi vida.

A mis compañeros, familia, amigos, colegas, colaboradores que han estado y participado en este maravilloso camino. A Cenit, Daniel, Leo, Toño, familia Ponce Bautista, Sergio Hernández, compañeros y amigos de la PP4, del W-107, del laboratorio de Bioprocesos, del PCNI, de la UVa y del ININ, gracias por coincidir en este maravilloso camino del conocimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
CAPITULO 1. MARCO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
1.1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.2. ESTADO DEL ARTE	20
1.2.1. <i>Contaminación del aire.</i>	20
1.2.1.1. Gases de efecto invernadero.....	20
1.2.1.2. Compuestos orgánicos volátiles	22
1.2.1.3. Compuestos inorgánicos volátiles	22
1.2.1.4. <i>Efectos de la emisión de gases contaminantes a la salud.</i>	23
1.2.2. <i>Sistemas de tratamiento.</i>	23
1.2.2.1. Físicoquímicos.....	24
1.2.2.2. Biológicos.....	25
<i>Materiales de empaque</i>	32
1.3. ANTECEDENTES	36
1.3.1. <i>Biomasa en exceso y el uso de oxidante como estrategia de control.</i>	36
1.3.2. <i>Eliminación de metano en sistemas de biofiltración.</i>	38
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	41
1.5. HIPÓTESIS GENERAL.....	42
1.6. OBJETIVO GENERAL.....	42
CAPITULO 2. ADICIÓN DE OXIDANTES (OZONO Y H ₂ O ₂) COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE BIOMASA EN EXCESO EN LA BIOFILTRACIÓN DE H ₂ S Y METANOL EN CONDICIONES ÁCIDAS.	43
2.1. INTRODUCCIÓN.....	43
2.2. HIPÓTESIS	44
2.3. OBJETIVOS	44
2.4. METODOLOGÍA	45
2.4.1. <i>Medio de sales minerales</i>	45

2.4.2.	<i>Preparación del inóculo.....</i>	45
2.4.3.	<i>Arranque y operación.....</i>	45
2.4.4.	<i>Mediciones de la fase gas.....</i>	47
2.4.5.	<i>Determinación del contenido de biomasa.....</i>	47
2.4.6.	<i>Determinación de sustancias en la fase líquida.....</i>	48
2.4.7.	<i>Determinación de la actividad microbiana.....</i>	49
2.4.8.	<i>Distribución de biopelícula: Resonancia magnética de imágenes.</i>	50
2.4.9.	<i>Biología molecular (Extracción de ADN, DGGE y Secuenciación).....</i>	50
2.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
2.5.1.	<i>Operación y desempeño del BLE</i>	52
2.5.2.	<i>Acumulación de biomasa.....</i>	54
2.5.3.	<i>Distribución de la biopelícula en el empaque.....</i>	57
2.5.4.	<i>Efecto de la adición de oxidantes sobre el desempeño del sistema.</i>	59
2.5.5.	<i>Efecto del ozono en la actividad microbiana.</i>	65
2.5.6.	<i>Efecto del ozono sobre el material de empaque.....</i>	67
2.5.7.	<i>Análisis de la comunidad microbiana y el efecto de la adición de ozono.....</i>	68
2.6.	CONCLUSIONES	73
2.7.	RECOMENDACIONES.....	74
CAPITULO 3. ELIMINACIÓN DE H₂S, EL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES DE OZONO EN UN BIOFILTRO DE LECHO ESCURRIDO... 75		
3.1.	INTRODUCCIÓN	75
3.2.	OBJETIVOS	77
3.3.	METODOLOGÍA	77
3.3.1.	<i>Inóculo y medio mineral.....</i>	77

3.3.2.	<i>Mediciones de la fase gas.....</i>	78
3.3.3.	<i>Determinación de sustancias en la fase líquida.....</i>	78
3.3.4.	<i>Determinación de la actividad microbiana.....</i>	79
3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.4.1.	<i>Arranque y operación.....</i>	79
3.4.2.	<i>Efecto de la adición de una fuente adicional de azufre.</i>	80
3.4.3.	<i>Efecto del incremento en la alimentación de H₂S en el sistema</i>	82
3.4.4.	<i>Efecto del ozono sobre la biomasa.....</i>	84
3.4.5.	<i>Perfil de eliminación de H₂S.....</i>	86
3.4.6.	<i>Perfil de eliminación de CO₂.....</i>	87
3.4.7.	<i>Actividad microbiana.</i>	89
3.5.	CONCLUSIONES	91
3.6.	RECOMENDACIONES.....	91
CAPITULO 4. ELIMINACIÓN DE CH ₄ EN UN REACTOR BURBUJEO CON RECIRCULACIÓN DE LA FASE GAS.		92
4.1.	INTRODUCCIÓN	92
4.2.	HIPÓTESIS	93
4.3.	OBJETIVOS	93
4.4.	METODOLOGÍA	94
4.4.1.	<i>Medio mineral e inóculo.....</i>	94
4.4.2.	<i>Reactivación de la cepa Methylocystis hirsuta.</i>	94
4.4.3.	<i>Influencia del TRLV y la recirculación de la fase gas sobre la degradación de CH₄.....</i>	95
4.4.4.	<i>Influencia de la limitación de macro y micro nutrientes sobre la acumulación de P3HB.....</i>	97

4.4.5. <i>Métodos analíticos</i>	98
4.4.6. <i>Determinación de P3HB</i>	99
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
4.5.1. <i>Influencia del TRLV y la velocidad de recirculación del gas sobre la remoción de CH₄</i>	100
4.6. CONCLUSIONES	110
4.7. RECOMENDACIONES.....	110
CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	111
5.1. CONCLUSIONES.....	111
5.2. RECOMENDACIONES	112
6. REFERENCIAS	114
7. ANEXOS	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Parámetros de evaluación de los sistemas biológicos de tratamiento de aire.....	26
Tabla 1.2. Uso de ozono para la remoción parcial de biomasa en sistemas de tratamiento de aire.	37
Tabla 2.1 Composición del medio mineral.....	45
Tabla 2.2. Condiciones de operación y resultados de las diferentes etapas de operación en el reactor.	53
Tabla 2.3. Bandas secuenciadas del análisis de DGGE-PCR para bacterias y hongos. * Los nombres de cada banda están relacionadas con los códigos asignados en los diferentes carriles de las imágenes de los geles de la Figura 2.12 y se señalan en rojo.....	72
Tabla 3.1. Condiciones de operación en el reactor y resultados obtenidos de capacidad de eliminación y eficiencia de remoción.	81
Tabla 3.2. Contenido de carbohidratos en la fase líquida del BLE en diferentes etapas de operación.	86
Tabla 4.1. Composición del medio mineral.....	94
Tabla 4.2. Experimentos propuestos para la obtención de P3HB.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de los diversos sistemas de tratamiento y su intervalo de operación (Cárdenas y col. 2003).....	23
Figura 2.1 Esquema de operación del reactor: A, B, C y D, indican los puntos de muestreo para biomasa.	46
Figura 2.2. Sistema de experimentación para medir la actividad microbiana.	50
Figura 2.3. Perfil de remoción de MeOH y H ₂ S en el reactor, caída de presión en las diferentes etapas de operación.	55
Figura 2.4. Imágenes de la formación de una capa de biomasa y acumulación de líquido en el lecho filtrante, día 211 y 257 de operación.....	57
Figura 2.5. Cubo sin colonizar (A), cubo con biomasa (día 258 de operación) (B), imágenes de RMI obtenidas de la distribución de la biomasa en el material de empaque y la compactación del lecho y (C).	58
Figura 2.6. Biomasa contenida en el reactor en diferentes etapas de operación.	60
Figura 2.7. Imágenes de la formación de una capa de biomasa y acumulación de líquido en el lecho filtrante, día 317 de operación.....	61
Figura 2.8. Contenido de sólidos en el medio de recirculación en las diversas etapas de operación del BLE.	64
Figura 2.9. Contenido de proteínas y carbohidratos en la fase líquida en las diferentes etapas de operación del reactor.	65
Figura 2.10. Consumo de oxígeno de la población microbiana en el BLE a diferentes concentraciones de MeOH antes y durante la alimentación de ozono.	66
Figura 2.11. Imágenes del material de empaque antes (A) y después (B) de la primera exposición de ozono.	67
Figura 2.12. Perfiles de PCR-DDGE de las comunidades microbianas para bacterias (a) y hongos (b). Las letras A, B, C Y D indican la sección del biofiltro (Figura 2.1) donde se tomó cada muestra para su análisis; los números romanos I, II y III indican el periodo cuando se tomó la muestra, es decir, antes, durante o después de la adición de ozono. M indica el carril del marcador molecular.	70
Figura 3.1. Esquema de experimentación.....	78
Figura 3.2. Imágenes del lecho filtrante (día 274 de operación), sección inferior del BLE.	80
Figura 3.3. Imagen comparativa del contenido de biomasa en R2 (A) y R1 (B) al final de los 460 días de operación.....	83
Figura 3.4. Perfil de desempeño del reactor en el BLE (A), resultados del desempeño durante la adición de ozono (B).....	84
Figura 3.5. Perfil de eliminación de H ₂ S a lo largo de la columna del reactor.	87
Figura 3.6. Correlación entre la capacidad de eliminación de H ₂ S y el consumo de CO ₂ , R ² = 0.95.....	89
Figura 3.7. Influencia de la concentración de tiosulfato y MeOH sobre la actividad microbiana en la biomasa del reactor. Los datos fueron ajustados a un modelo tipo Monod con R ² = 0.99 y R ² =0.94, respectivamente.	90
Figura 4.1 Esquema experimental. (1) Reactor, (2) puertos de muestreo, (3) rotámetro, (4) controlador de flujo másico, (5) control de temperatura, (6) condensador, (7) bomba peristáltica, (8) toma de muestras líquidas.	95

Figura 4.2. 120 minutos (A) y 60 minutos de tiempo global de residencia (B).....	101
Figura 4.3. Desempeño del reactor bajo diferentes TRLV con una relación $Q_r/Q= 15$	102
Figura 4.4. Imágenes del estado de la biomasa en el reactor, en suspensión, TRLV= 30 minutos (A), en forma de agregados, TRLV=15 minutos (B). Tasa de recirculación de la fase gas, 15 veces el flujo global del reactor.	103
Figura 4.5. Concentración en el tiempo de (A) CH_4 , (B) biomasa, (C) CO_2 y (D) P3HB durante el cultivo de <i>M. hirsuta</i> bajo limitación de nitrógeno, potasio, manganeso y hierro con limitación de nitrógeno, y experimento control.....	106
Figura 4.6 influencia de la limitación de nutrientes sobre la tasa máxima volumétrica de consumo de CH_4 y tasa máxima volumétrica de producción de CO_2 por <i>M. hirsuta</i> en cultivo en lote.	107
Figura 4.7 influencia de la limitación de nutrientes sobre la tasa específica de consumo de CH_4 para <i>M. hirsuta</i>	107
Figura 4.8 influencia de la limitación de nutrientes sobre la acumulación de P3HB (A) y concentración final de biomasa en los experimentos por lote (B).....	109

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BF	Biofiltro convencional
BLE	Biofiltro de lecho escurrido
CE	Capacidad de eliminación
CIV	Compuestos inorgánicos volátiles
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CRA	Compuestos reducidos de azufre
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
ER	Eficiencia de remoción
GHG	Gases de efecto invernadero (por sus siglas en inglés)
PCO_2	Tasa de producción de dióxido de carbono
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P3HB/PHB	Poli-3-hidroxi-butarato
PUF	Espuma de poliuretano (por sus siglas en inglés)
PVC	Policloruro de vinilo
BCB	Biorreactor de columna de burbujeo
TRLV	Tiempo de residencia en el lecho vacío
Q	Flujo global de la corriente alimentada
Q_R	Flujo de la corriente de recirculación de la fase gas
MeOH	Metanol
H_2S	Ácido sulfhídrico/sulfuro de hidrógeno

RESUMEN

Se evaluaron diferentes estrategias de operación en sistemas biológicos de tratamiento de aire como biofiltros de lecho escurrido (BLE) para el tratamiento de metanol (MeOH) y ácido sulfhídrico (H₂S) y biorreactores de columna de burbujeo (BCB) para la eliminación de corrientes diluidas de metano (CH₄), con el objetivo de superar problemas de transferencia de masa originados por alta biodegradabilidad o baja solubilidad de los contaminantes. Los resultados mostraron que en la eliminación de mezclas como MeOH-H₂S, la acidificación del sistema (R1) afectó la eliminación de MeOH mientras que, el H₂S fue eliminado completamente (ER=100%). Después de la adaptación a un pH de 2.5 en el sistema, se alcanzó una capacidad de eliminación (CE) de MeOH de 565 g m⁻³ h⁻¹ con una eficiencia de remoción (ER) del 97 %, sin afectar la eliminación de H₂S. Sin embargo, un aumento excesivo de biomasa provocó una alta caída de presión y reducciones cercanas al 50 % en la ER de los compuestos. La alimentación continua de ozono (O₃) por 38 días con una carga de 150.2 ± 16.7 g m⁻³ h⁻¹, favoreció el desprendimiento de biomasa y la recuperación de la CE junto con una disminución en la caída de presión. Sin embargo, un rápido incremento en el contenido de biomasa y fluctuaciones en la caída de presión se observaron al suspender el O₃, afectando nuevamente el sistema. Un segundo tratamiento con oxidantes con 4.8 ± 0.1 g m⁻³ h⁻¹ de O₃ durante 7 días seguido de la adición de H₂O₂ (1 y 5 mg L⁻¹) durante 23 días, mostró una reducción en la biomasa en el lecho filtrante registrando 607.5 g_{biomasa} L⁻¹_{empaque} antes y 367.5 g_{biomasa} L⁻¹_{empaque} después de la adición de oxidantes. Consistentemente, se registró un incremento en la cantidad de proteínas, carbohidratos y sólidos totales en el medio de recirculación, lo cual se relacionó con la remoción de biomasa en presencia de oxidantes. Experimentos de biología molecular (PCR-DGGE) mostraron un cambio notorio en la población de bacterias cuando se alimentó la primera carga de O₃.

En un segundo BLE operado de manera simultánea con R1, se estudió la eliminación de H₂S en ausencia de MeOH (R2) bajo condiciones de acidez extrema (pH<1). Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento lineal entre la concentración de H₂S alimentada y la CE y entre la CE de H₂S y la tasa de asimilación de CO₂, obteniendo una asimilación de 0.1 g_{CO2}g_{H2S}⁻¹ consumido y registrando ER> 99.9 % con cargas superiores a 50 g m⁻³ h⁻¹ (H₂S=600 ppm_v). Adicionalmente, el efecto de la adición de O₃ (98 ± 5.4 mg m⁻³) sobre el

desempeño del sistema mostró una ligera disminución del 10 % en la ER con alimentación en continuo y 5 % con alimentación intermitente. La poca cantidad de biomasa presente no fue una limitante para la rápida recuperación del desempeño del sistema una vez que se suspendió la alimentación de O₃. Contrario a R1, los valores de proteínas y carbohidratos antes y durante su alimentación de O₃ no presentaron una variación notoria. La CE global de eliminación de H₂S fue 3.4 veces mayor a la alcanzada en R1, indicando que la biomasa debido al consumo de MeOH influyó en la eliminación de H₂S. De manera interesante, la adaptación de la población microbiana a condiciones de acidez en extrema en R2 mantuvo una alta actividad microbiana reflejándose en altas capacidades de eliminación de H₂S con una mínima cantidad de biomasa desarrollada durante los 460 días de operación en R2 y una mínima caída de presión.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el BCB inoculado con *Methylocystis hirsuta*, mostraron que la implementación de diferentes tasas de recirculación de la fase gas mejoró la eliminación de corrientes diluidas CH₄. Con ERs de 72.9 ± 0.5 % y una CE de 35.2 ± 0.4 g m⁻³ h⁻¹, se encontró que un TRLV de 30 min y una tasa de recirculación interna de 0.50 m³_{gas} m⁻³_{reactor} min⁻¹ (Q_R/Q=15) fue la mejor condición de eliminación de CH₄ en el sistema. Evaluando la limitación de nutrientes en experimentos en lote, para la obtención de bioplásticos, se encontró que la limitación de nitrógeno puede ser prometedora para implementarse de forma continua en el biorreactor. Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación demostraron que la implementación de estrategias como la adición de oxidantes, operación bajo condiciones de acidez extrema y la recirculación de la fase gas con compuestos de baja solubilidad, fueron efectivas para mejorar o mantener altas tasas de eliminación de diferentes contaminantes.

ABSTRACT

In this work, different operating strategies were evaluated in air treatment systems, with the aim of improving the performance of these systems when treating compounds with different physical and chemical properties. Firstly the operation of a biotrickling filter (BTF) was studied for the removal of MeOH and H₂S under acidic conditions (R1). The effect of biomass accumulation on reactor performance and oxidants feed as strategy to remove the excess of biomass was studied. The results showed that after the adaptation to the acidic pH (pH=2.5) the system reached an EC_{max} for MeOH of 565 g m⁻³ h⁻¹ (RE = 97%) while H₂S was eliminated from the beginning of operation. An increase in biomass as a result of the consumption of high MeOH loads induced to reductions of around 50% in REs for both, H₂S and MeOH together with an increase in the pressure drop. Ozone fed with an inlet load of 150.2 ± 16.7 g m⁻³ h⁻¹ for 38 days favored biomass detachment and a recovery in the EC together with a decrease in pressure drop values. The EC_{max} in this stage was 587 g m⁻³ h⁻¹ (RE=81%) and 15.8 g m⁻³ h⁻¹ (RE=97%) for MeOH and H₂S, respectively. Suspending the O₃ addition showed a rapid increase in the biomass content and greater fluctuations in the pressure drop reducing again the performance. A second treatment with oxidants, feeding an inlet load of 4.8 ± 0.1 g m⁻³ h⁻¹ for 7 days of O₃, followed by addition of H₂O₂ for 23 days, showed a reduction in biomass in the filter bed by recording 607.5 g_{biomass} L⁻¹_{packing} before and 367.5 g_{biomass} L⁻¹_{packing} after the addition of oxidants. Consistently, there was an increase in the amount of proteins, carbohydrates and total solids in the liquid recirculation, which was related to the removal of biomass in the presence of oxidants. Molecular biology experiments (PCR-DGGE) at different stages showed a clear change in the bacterial population during the first O₃ addition.

In the second stage of this work were evaluated the elimination of H₂S, the rate of CO₂ assimilation and the effect of the addition of low concentrations of O₃ in a BTF (R2) under extreme acid conditions (pH <1.0). The results obtained showed a linear behavior between the concentration of H₂S fed and the EC, reaching RE > 99.9% with inlet loads above 50 g m⁻³ h⁻¹ (600 ppmv) and, between H₂S elimination capacity and the rate of CO₂ assimilation, obtaining an assimilation of 0.1 g_{CO2}g_{H2S}⁻¹. A remarkable negative effect on the removal of H₂S was observed when the system was exposed to low concentrations of sodium thiosulfate (2 g L⁻¹), which was reflected in a lower conversion to sulfates, however, the

microbial activity was higher as thiosulfate concentration was increased in respirometry experiments. On the other hand, the addition of O_3 ($98 \pm 5.4 \text{ mg m}^{-3}$) showed a slight decrease of 10% in RE with continuous feeding. The small amount of biomass present was not a limitation for the rapid recovery of the system once the feed of O_3 was suspended. Additionally, O_3 did not have a noticeable effect on the composition of the biofilm, recording similar values of proteins and carbohydrates with and without O_3 addition. The global H_2S removal capacity in R2 was 3.4 times higher than that achieved in R1 system. Interestingly, the adaptation of the microbial population to conditions of extreme acidity could induce to maintain a high microbial activity reflecting in high elimination capacity of H_2S with a low pressure drop due to the low amount of biomass developed during all the operation period in R2.

In the last stage of this project was evaluated the influence of internal gas-recycling strategies on the enhancement of diluted CH_4 in a bubble column bioreactor inoculated with *Methylocystis hirsuta*. Maximum CH_4 removal efficiencies of $72.9 \pm 0.5 \%$ and an EC of $35.2 \pm 0.4 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ were recorded at an empty bed residence time of 30 min and $0.50 \text{ m}^3_{\text{gas}} \text{ m}^{-3}_{\text{reactor}} \text{ min}^{-1}$ of internal gas-recycling rate. The accumulation of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) in *M. hirsuta* was evaluated batchwise under limitations of different macro and micro nutrients. The results showed that the best accumulation condition was recorded during the N limitation, whereas a percentage of accumulation similar to the control experiment was found under Mn limitation. The results obtained in this research project showed that the implementation of strategies such as the addition of oxidants, operation under extreme acidity conditions and the recirculation of the gas phase with low solubility compounds as CH_4 were effective in improving or maintaining high removal rate of pollutants in air treatment systems.

CAPITULO 1. MARCO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

Cada día se reportan problemas de contaminación atmosférica en diferentes ciudades alrededor del mundo causadas por la emisión de compuestos gaseosos originados de diferentes actividades antropogénicas. A la par, también se reporta el incremento en la frecuencia de enfermedades relacionadas con la mala calidad del aire. Aunque en décadas recientes, las leyes y políticas sobre la calidad del aire se han vuelto más estrictas, todavía no se ve reflejado en la calidad del aire que respiramos. Aunque existe una variedad de tecnologías para la eliminación de contaminantes en corrientes gaseosas, muy pocas de éstas han sido puestas en funcionamiento a nivel industrial. Los altos costos de inversión o materias primas o bajas eficiencias de eliminación de los contaminantes, han sido solo algunas de las limitantes para su implementación como procesos de limpieza del aire. Debido a lo anterior las tecnologías empleadas son generalmente establecidas para tratar flujos con altas concentraciones de contaminantes para hacer costoso el proceso. No obstante, las fuentes que emiten concentraciones bajas son incontables, por lo que su contribución a la contaminación atmosférica y a la mala calidad del aire que respiramos no debe ser ignorada. Además, es importante desarrollar procesos de bajo costo que permitan el tratamiento eficiente de corrientes con bajas concentraciones de contaminantes atmosféricos. Dentro de estos procesos, las alternativas biotecnológicas pueden considerarse como las más adecuadas por sus bajos costos y fácil operación, además, de que son factibles para la obtención de productos con alto valor agregado, haciéndolos atractivos para su implementación. Pese a su alta efectividad, estas tecnologías todavía presentan limitaciones para que su operación a nivel industrial permita la eliminación de los contaminantes de manera efectiva y por largos periodos de tiempo.

Dentro de los sistemas biológicos de tratamiento de aire, la biofiltración tiene como limitante el mantener su operación por largos periodos, debido a la acumulación de biomasa en exceso asociada al consumo del contaminante, afectando su desempeño. Diversas estrategias han sido evaluadas para remover el exceso de biomasa, sin embargo; algunas de ellas requieren el paro parcial o total de la operación, largos periodos de recuperación de la actividad microbiana, debido a la naturaleza agresiva del compuesto aplicado, y en

ocasiones, aunque sean efectivas, su alto costo no las hace factibles para su implementación a nivel industrial.

La adición de oxidantes ha mostrado una alta efectividad como estrategia en la remoción de biomasa en exceso en sistemas de biofiltración de aire, sin la necesidad de parar el sistema. Sin embargo, a pesar de la obtención de resultados satisfactorios (Wang y col. 2009, Xi y col. 2014), esta estrategia requiere de mayor investigación para probar su efectividad en el proceso de biofiltración, de manera que pueda ser una estrategia general para la remoción de biomasa en un amplio intervalo de condiciones de operación, como cambios en el pH, o al tratar mezclas de contaminantes.

Por otro lado, la limitación de transferencia de masa de algunos compuestos poco solubles, como el CH_4 , requiere del estudio de nuevas configuraciones de reactores, además, de los sistemas de biofiltración, ya que al estar presente en bajas concentraciones en las corrientes de aire, dificulta aún más su eliminación en sistemas biológicos. En este contexto, se ha reportado que la recirculación de la fase gas mejora la transferencia de masa al incrementar la turbulencia en el sistema, esto ha sido probado únicamente en biofiltros de lecho empacado (Estrada y col. 2014), sin embargo, también se puede llevar a cabo en sistemas donde la biomasa no necesariamente está en forma de biopelícula como es el caso de los BCB. En este contexto, estudios han demostrado que estos sistemas son efectivos para el tratamiento CH_4 y pueden aprovecharse para la producción de metabolitos de alto valor agregado como los bioplásticos (Rahnama y col. 2012). En consecuencia, es necesaria una investigación más amplia que permita desarrollar estrategias que contribuyan en la mejora del desempeño de sistemas biológicos para el tratamiento de contaminantes del aire, de manera que estas estrategias o herramientas puedan utilizarse a escalas mayores a las de laboratorio o planta piloto y además, puedan ser aplicadas en diferentes condiciones de operación.

1.2. ESTADO DEL ARTE

1.2.1. Contaminación del aire.

El rápido crecimiento de la población ha originado una alta demanda de servicios y alimentos, reflejándose en un evidente incremento en la producción a nivel mundial. Este incremento en las actividades humanas para satisfacer las necesidades de la población ha dado origen a la producción y emisión de desechos, generando una acelerada contaminación del agua, suelo y aire. En las últimas décadas y debido a la preocupación por la aparición o frecuencia de enfermedades respiratorias (Kwon y col. 2016), la legislación en materia de emisiones gaseosas se ha vuelto cada vez más estricta, creando leyes y acuerdos internacionales para mitigar la emisión de compuestos dañinos a la atmósfera (McMillan y Foley 2014; Muñoz y col. 2015; NACAA, 2013). Sin embargo, en países como México se tiene poca o nula regulación en materia de emisiones gaseosas y, por lo tanto, existe un inventario muy pobre en cuanto a emisiones gaseosas (Dumars y Delrio, 1988; Muriel-García y col. 2016). Sin embargo, existen estudios que relacionan la frecuencia de enfermedades respiratorias con las emisiones de contaminantes en el aire, especialmente en ciudades altamente contaminadas como la Ciudad de México (FASEB 2010; Hernández-Garduño y col. 1997; Zheng y col. 2017). La amplia gama de compuestos que se liberan a la atmósfera presenta también un gran número de problemas ambientales relacionados con dichos contaminantes, por lo que además de requerir leyes cada vez más estrictas, también se necesita la implementación de procesos que ayuden a prevenir o controlar dicha contaminación.

Los gases y/o vapores emitidos a la atmósfera causantes de su deterioro debido al efecto negativo directo o indirecto, se pueden clasificar de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas o su efecto negativo global al ambiente: gases de efecto invernadero, compuestos orgánicos volátiles y compuestos inorgánicos volátiles.

1.2.1.1. Gases de efecto invernadero

El cambio climático es uno de los efectos de la emisión de compuestos contaminantes a la atmósfera. Las consecuencias del cambio climático son diversas y van desde la parte social,

económica, ambiental y de salud. Aunado a ello, se ha demostrado que los países que menos han contribuido a este fenómeno son los más vulnerables a sus efectos y, regularmente son países en desarrollo (Tol, 2012). Dentro de los compuestos que han contribuido fuertemente a empeorar el cambio climático están los gases de efecto invernadero (GHGs: por sus siglas en inglés) como el dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), metano (CH_4), clorofluorocarbonos (CFC) y ozono (O_3), que son un grupo de compuestos emitidos de diversas fuentes (actividades agrícolas, industriales, domésticas, etc.). En las últimas décadas, la concentración de estos gases ha aumentado considerablemente (Lebrero y col. 2015; Tol, 2012; von Schniedemesser y Monks, 2013). Los pronósticos a largo plazo indican que, junto con el incremento de las emisiones de los GHGs también aumentará de manera significativa la temperatura promedio del planeta de 0.6 a 4 °C al final siglo XXI, siendo un panorama poco alentador para la vida en general (McMichael, 2003; McMichael y Lingren, 2011).

Dentro de las emisiones de GHGs, el CO_2 y CH_4 son dos de los gases mayormente emitidos a la atmósfera. Su emisión está relacionada con un gran número de actividades antropogénicas como actividades industriales, gestión de residuos, minería y ganadería, siendo esta última una de las principales fuentes de emisión de CH_4 , que contribuye en conjunto en un 60 % de las emisiones de este gas. Este compuesto tiene un fuerte impacto en el cambio climático por su capacidad de atrapar la radiación, la cual es 25 veces mayor que el CO_2 (Koneswaran y Nierenberg, 2008; Zúñiga y col. 2011), contribuyendo entre un 20 y 30 % al calentamiento global. Aunque el CH_4 es una fuente aprovechable de energía, este proceso solo es factible cuando se logran obtener altos porcentajes de CH_4 en las corrientes gaseosas. En consecuencia, a concentraciones menores del 20 % su recuperación no es costeable, por lo que la mayoría de las emisiones se van a la atmósfera. A raíz de los efectos negativos asociados a la emisión de bajas concentraciones de CH_4 , se buscan nuevas alternativas que permitan su eliminación de las corrientes de aire para disminuir su emisión. Dado que la vida media del CH_4 (12 años en la atmósfera) es menor que la del CO_2 (100 años), la reducción de las emisiones permitiría tener un resultado positivo en menor tiempo (Canadell y col. 2007; Lebrero y col. 2015).

1.2.1.2. Compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son un grupo de compuestos que contribuyen a la contaminación del aire. Constituyen un conjunto de químicos diversos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, los cuales se caracterizan por su facilidad para volatilizarse, teniendo una presión de vapor de 0.1mmHg a temperatura y presión estándar (Revah y Morgan-Sagastume, 2005). Los COVs se componen de una gran variedad de compuestos y constituyen uno de los grupos con mayor contribución a la formación de smog, además, de encontrarse entre los contaminantes atmosféricos comúnmente emitidos por industrias químicas, petroquímicas e industrias afines. Estos compuestos son una de las principales fuentes de reacción fotoquímica en la atmósfera que conduce a diversos peligros de salud y ambientales a corto y largo plazo (Khan y Ghoshal, 2000).

1.2.1.3. Compuestos inorgánicos volátiles

Los compuestos inorgánicos volátiles (CIVs) son una variedad de compuestos donde podemos encontrar compuestos como amoníaco (NH_3) y sulfuro de hidrógeno (H_2S). La emisión de estos compuestos es un grave problema relacionado con la emisión de malos olores, daños al ambiente y efectos negativos a la salud (Ferdowsi y col. 2017; Lewis y Copley, 2015). Este tipo de compuestos son emitidos en múltiples fuentes como, rellenos sanitarios, plantas de tratamiento de aguas residuales, sistema de drenajes, así como de diversas industrias como la del petróleo, procesamiento de alimentos, generación de energía, refinerías y en la industria de la pulpa y el papel (Giri y col. 2014).

Dentro de los CIVs, el H_2S es un compuesto que puede detectarse a concentraciones de alrededor de 0.4 ppm_v (Filho y col. 2010), es incoloro, con olor a huevo podrido, inflamable y altamente tóxico, provoca serios daños incluso a concentraciones relativamente bajas (en el orden de 10 ppm_v) si se compara con otros gases (Lewis y Copley, 2015). Además, de su alta toxicidad, también es un gas altamente corrosivo, causando daños a estructuras tanto de acero como de concreto, éste último provocado por la lluvia ácida, originada de las reacciones de este gas en la atmósfera (Rattanapan y Ounsaneha, 2012). Otra fuente donde el H_2S es un compuesto indeseable, es en las corrientes de biogás (alrededor de 2 %) debido al mal olor que produce y que su contenido en el biogás interfiere en el cumplimiento de las especificaciones para su uso (López y col. 2016).

1.2.1.4. Efectos de la emisión de gases contaminantes a la salud.

Los efectos de las emisiones gaseosas descritas anteriormente como son: el incremento global de la temperatura consecuencia del cambio climático, daños a los cultivos y bosques debido a la lluvia ácida, producción de ozono troposférico, etc., han provocado graves consecuencias a la salud, como enfermedades respiratorias, dolor de cabeza, irritación ocular e incluso la muerte (Ko y Hui, 2012; Ritz y col. 2002). Por lo tanto, la legislación cada vez más estricta conlleva a la búsqueda de procesos de tratamiento de contaminantes del aire también más efectivos (Mudliar y col. 2010).

1.2.2. Sistemas de tratamiento

La

Figura 1.1 describe diversos sistemas de tratamiento de corrientes contaminadas de aire, los cuales dependen directamente de la concentración del o los contaminantes y la velocidad del flujo de gas a tratar. Estos procesos se pueden clasificar en procesos fisicoquímicos y procesos biológicos.



Figura 1.1 Clasificación de los diversos sistemas de tratamiento y su intervalo de operación (Cárdenas y col. 2003).

1.2.2.1. Fisicoquímicos

Las alternativas físico-químicas para el tratamiento de contaminantes gaseosos se aplican principalmente cuando se tienen altos flujos de aire y concentraciones de contaminantes, aunque también se pueden aplicar a flujos y concentraciones bajas. Dentro de los métodos fisicoquímicos podemos encontrar los siguientes (Revah y Morgan-Sagastume, 2017):

Dilución: este método se basa principalmente en aplicar una corriente de aire limpio a otra contaminada, con el fin de reducir la concentración del contaminante, esto se aplica principalmente para reducir el umbral de olor y/o el riesgo de explosión. Sin embargo, la dilución no se considera un método de tratamiento, debido a que el contaminante aún permanece en una corriente de aire, por lo que se requiere de un método adicional para su mitigación.

Condensación: la condensación de un contaminante puede ocurrir al disminuir la temperatura de la corriente a una presión constante, o, incrementando la presión de la corriente a una temperatura constante, y se aplica a corrientes con vapores de contaminantes condensables contenidas en un gas no condensable.

Membranas: la separación de un contaminante por membranas consiste en hacer pasar la corriente de aire a través de un material en el que la interacción sea con el contaminante de interés, de manera que el contaminante se quede atrapado en el material de la membrana mientras la corriente de aire limpio es liberada. Se usan membranas semipermeables hechas de polímeros sintéticos

Oxidación por ultravioleta: Es una tecnología emergente y se basa en el uso de oxígeno para la formación de radicales y moléculas con un poder oxidante mayor como el ozono (O_3), peróxido, radical hidroxilo ($OH\bullet$) y superóxido (O_2^-). Estos compuestos transforman a los COVs en CO_2 y H_2O en presencia de luz UV (Moussavi y Mohseni, 2007).

Plasma: el plasma es una mezcla de electrones libres en movimiento e iones cargados positivamente. Los plasmas no térmicos constituyen una excelente fuente de radicales libres en fase gas que en conjunto con otras especies reactivas son usadas para destruir contaminantes orgánicos e inorgánicos en fase gas. Esta tecnología requiere de la aplicación de altos voltajes los cuales se aplican en tiempos muy cortos (1-10 ms). Es también una tecnología emergente que se encuentra en fase de desarrollo e investigación,

sin embargo, parece ser prometedora en el tratamiento de emisiones gaseosas (Karuppiah y col. 2012).

Adsorción: la adsorción es un proceso ya establecido donde las moléculas del contaminante en fase gas interactúan mediante fuerzas débiles intermoleculares con un sólido y el contaminante a eliminar se queda atrapado en la fase sólida. El carbón activado es el material más utilizado para el proceso de adsorción, sin embargo, también se utilizan otros materiales como sílice gel, alúmina y zeolita. La desventaja de este proceso es que el contaminante no se destruye sino únicamente se transfiere de una fase a otra, requiriendo un proceso adicional de disposición del material (Ghoshal y Manjare, 2002).

Combustión: en este proceso, él o los contaminantes son capturados por un sistema de ventilación y oxidados a altas temperaturas, teniendo como compuestos de oxidación CO_2 , SO_2 y H_2O . Los incineradores básicos usados en este proceso son los incineradores térmicos y los catalíticos. Las temperaturas de operación varían de los $250\text{ }^\circ\text{C}$ hasta los $680\text{ }^\circ\text{C}$ (Piumetti y col. 2015).

Otras alternativas para el tratamiento de emisiones gaseosas, es el uso de soluciones químicas como hidróxido de sodio (NaOH : 50 %). Este tipo de procesos resulta costoso debido a que no se puede regenerar la fase adsorbente, lo que implica un alto consumo de reactivos. Otros ejemplos de procesos químicos son la precipitación de sulfuro de hierro a partir de una solución de cloruro de hierro (FeCl_2) y H_2S (Aslanidou y col. 2008), la oxidación con hipoclorito de sodio, la oxidación con ozono y la oxidación con permanganato de potasio. Sin embargo, el hecho de no poder regenerar el reactivo, la formación de compuestos clorados no deseados o de requerir una estricta disposición para no causar otros problemas ambientales, los hace poco atractivos (Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

1.2.2.2. Biológicos

Debido a las desventajas de los procesos fisicoquímicos como, altos costos de materias primas como resinas de intercambio iónico para la adsorción y el gasto de altas cantidades de energía para la oxidación total de los contaminantes; otra alternativa para el tratamiento de emisiones en fase gas, son los sistemas biológicos. Los procesos biológicos son sistemas complejos donde ocurren mecanismos fisicoquímicos tales como la transferencia del

contaminante de la fase gas a la fase acuosa y, mecanismos biológicos de oxidación que dan como resultado la mineralización del contaminante. En estos sistemas, los microorganismos pueden estar: i) inmovilizados en un soporte o material de empaque en forma de biopelícula (biofiltración) o, ii) en suspensión, dependiendo del tipo de configuración del reactor.

El desempeño global de los procesos biológicos ante una carga determinada se determina por parámetros como capacidad de eliminación y eficiencia de remoción, descritas en la **Tabla 1.1**. Adicionalmente, otros parámetros que permiten determinar el desempeño de estos procesos, son los productos de mineralización como la producción de CO₂ en la eliminación de COVs y la producción de azufre elemental y/o sulfatos en la eliminación de H₂S, entre otros (Chung y col. 2004; González-Sánchez y Revah, 2007).

Tabla 1.1 Parámetros de evaluación de los sistemas biológicos de tratamiento de aire.

Parámetro	Ecuación	Unidades
Carga alimentada	$IL = \frac{C_{g,e} \times Q}{V}$	(gm ⁻³ h ⁻¹)
Capacidad de eliminación	$CE = \frac{(C_{g,e} - C_{g,s}) \times Q}{V}$	(gm ⁻³ h ⁻¹)
Eficiencia de remoción	$ER = \frac{(C_{g,e} - C_{g,s}) \times 100}{C_{g,e}}$	(%)
Tiempo de retención en el lecho vacío	$TRLV = \frac{V}{Q}$	(m ³ h ⁻¹)
Tasa de producción de biomasa	$PB = \frac{C_{biomasa}}{\theta V}$	(gm ⁻³ h ⁻¹)
Tasa de producción de CO ₂	$PCO_2 = \frac{Q(CO_{2,s} - CO_{2,e})}{V}$	(gm ⁻³ h ⁻¹)
Coeficiente de rendimiento de biomasa	$YB = \frac{C_{biomasa,s} - C_{biomasa,e}}{C_{sustrato,e} - C_{sustrato,s}}$	(gX _{producida} g _{sustrato consumido} ⁻¹)
Coeficiente de producción de CO ₂	$YCO_2 = \frac{PCO_2}{CE}$	(gCO ₂ producida g _{sustrato consumido} ⁻¹)

θ: intervalo de tiempo de crecimiento de biomasa.

Dentro de las configuraciones más utilizadas en las alternativas biológicas para el tratamiento de corrientes de aire, se encuentra la biofiltración, la cual se describe a continuación.

Biofiltración

En la biofiltración una corriente gaseosa se pasa a través de un lecho filtrante donde se lleva a cabo la oxidación de los contaminantes mediante la acción de microorganismos que se encuentran inmovilizados en biopelícula que se desarrolla en el material de empaque. Es considerada una tecnología limpia y de bajo costo, ya que se opera a temperatura y presión ambiente, no genera subproductos tóxicos, además, de no requerir altos costos de inversión (Revah y Morgan-Sagastume, 2005; Son, 2017).

Los biofiltros son adecuados para tratar altos flujos de aire con bajas concentraciones de contaminantes. La operación de los biofiltros comprende una serie de pasos como transferencia de masa del contaminante desde la fase gas a la fase líquida, sorción a través del material de empaque y de la biopelícula y la biodegradación u oxidación biológica realizada por la población microbiana (Kumar y col. 2011). Las configuraciones tradicionales de los sistemas de biofiltración son: los biofiltros empacados o convencionales, los biofiltros de lecho escurrido y los biolavadores; sin embargo, en recientemente han surgido nuevas configuraciones de reactores como los biorreactores de membranas, biorreactores bifásicos, monolíticos, de burbujeo, éstos últimos no son un sistema de biofiltración propiamente dicho, ya que los microorganismos se desarrollan en el seno del líquido y no en un material de empaque (Kraakman y col. 2011; Muñoz y col. 2007; Reij y col. 1998).

Biolavadores: estos sistemas comprenden dos fases, una de absorción y otra de reacción. En el sistema de absorción el contaminante es adsorbido en la fase líquida, la cual es alimentada a contracorriente (**Figura 1.2**). El aire limpio se libera, mientras que la fase líquida con el contaminante se transfiere al sistema de reacción donde los microorganismos en suspensión son los encargados de la eliminación del contaminante. Estos sistemas pueden tener algunas variaciones de diseño con el fin de aumentar la capacidad de eliminación, dentro de estas variaciones se encuentran los biolavadores anóxicos y

biolavadores con columnas de aspersión (Mudliar y col. 2010, Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

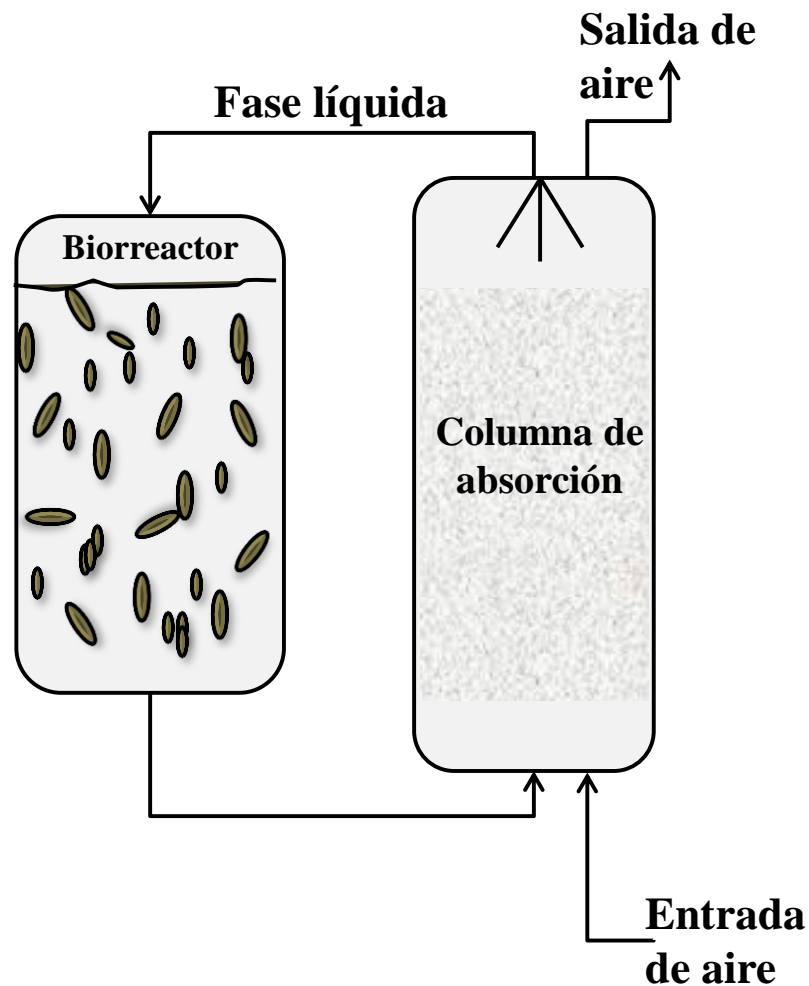


Figura 1.2 Diagrama simplificado de un biolavador.

Biofiltros convencionales

El aire pasa a través del material filtrante donde se encuentra la película microbiana. En estos sistemas el aire se introduce humidificado y/o se esparce agua o nutrientes (medio de sales minerales) de manera intermitente, de forma que se mantenga la humedad adecuada para mantener la actividad microbiana (**Figura 1.3**). Los materiales de empaque de estos sistemas pueden ser orgánicos o inorgánicos, son adecuados para el tratamiento de bajas

concentraciones de contaminantes y/o poco solubles, ya que no cuentan con una fase acuosa libre en el reactor (García-Pérez y col. 2013; Gómez-Cuervo y col. 2016).

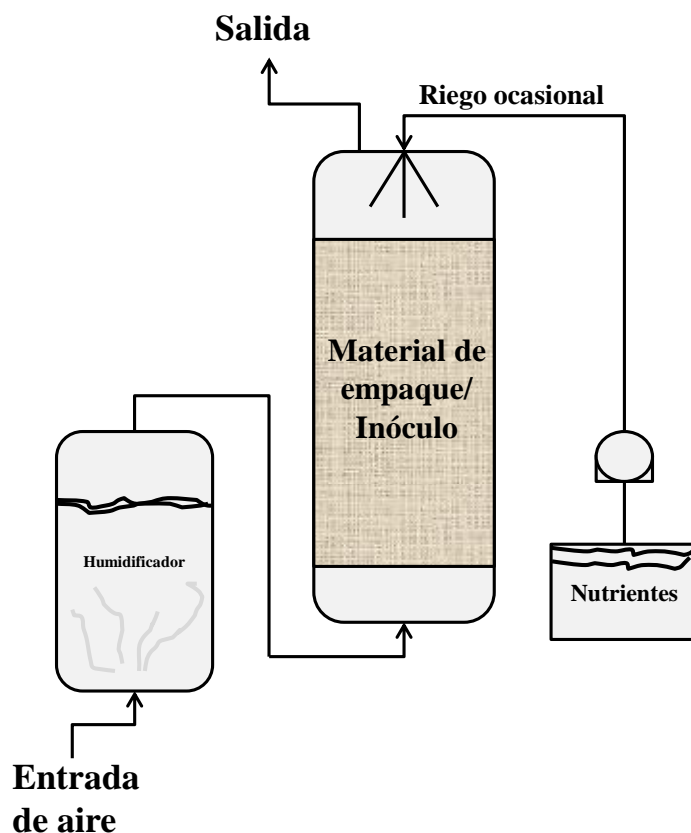


Figura 1.3 Biofiltro convencional.

Biofiltros de lecho escurrido

En estos biofiltros se usan preferentemente materiales inorgánicos como material de empaque ya que una solución de nutrientes se mantiene en recirculación continua a través del lecho filtrante. La corriente de aire contaminado puede alimentarse a contracorriente o en paralelo a la recirculación de la fase líquida (**Figura 1.4**). Estos sistemas junto con los biolavadores son adecuados para tratar altos flujos de aire y altas cargas de contaminantes que generalmente tienen alta solubilidad o, cuando se requiere un control de pH en el sistema (Guieysse y col. 2008).

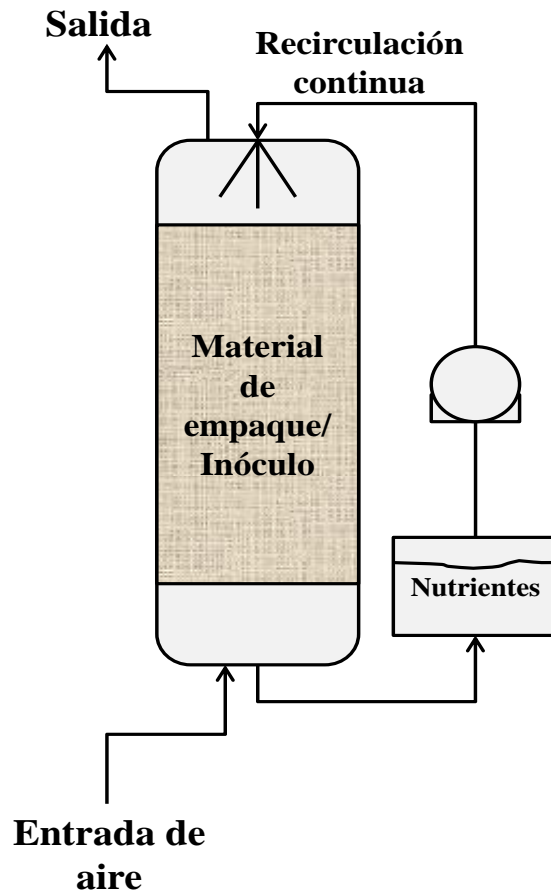


Figura 1.4 Biofiltro de lecho escurrido.

Biorreactores de columnas de burbujeo (BCB)

La transferencia de masa es una limitante que se presenta en el tratamiento de aire de compuestos con baja solubilidad. Si bien los biofiltros convencionales son adecuados para tratar este tipo de compuestos, en ocasiones se requiere utilizar una fase no acuosa para mejorar la solubilidad en el sistema e incrementar la transferencia de masa. En este sentido los reactores de columna de burbujeo ofrecen ventajas similares a los sistemas de biofiltración como bajos costos de mantenimiento y operación, además, ofrecen una adecuada transferencia de masa, haciéndolos atractivos para el tratamientos de contaminantes poco solubles (Shaikh y Al-Dahhan 2013). Un reactor de columna de burbujas es un recipiente cilíndrico con distribución de la fase gas en la parte inferior de la columna. El gas se burbujea en una fase líquida o en una suspensión líquido-sólida (**Figura 1.5**). Estos sistemas se utilizan ampliamente como contactores multifásicos y reactores en

industrias químicas, petroquímicas y metalúrgicas. En la industria bioquímica los BCB han sido ampliamente utilizados para el cultivo celular y producción de proteínas en cepas puras (Kantarci y col. 2005). Recientemente, estos sistemas se han establecido para la producción de bioplásticos con diferentes sustratos (Rivera-Terceros y col. 2015) y en especial para el tratamiento la obtención de bioplásticos a partir de corrientes de CH_4 (Rahnama y col. 2012), sin embargo, su estudio en este campo aun es escaso.

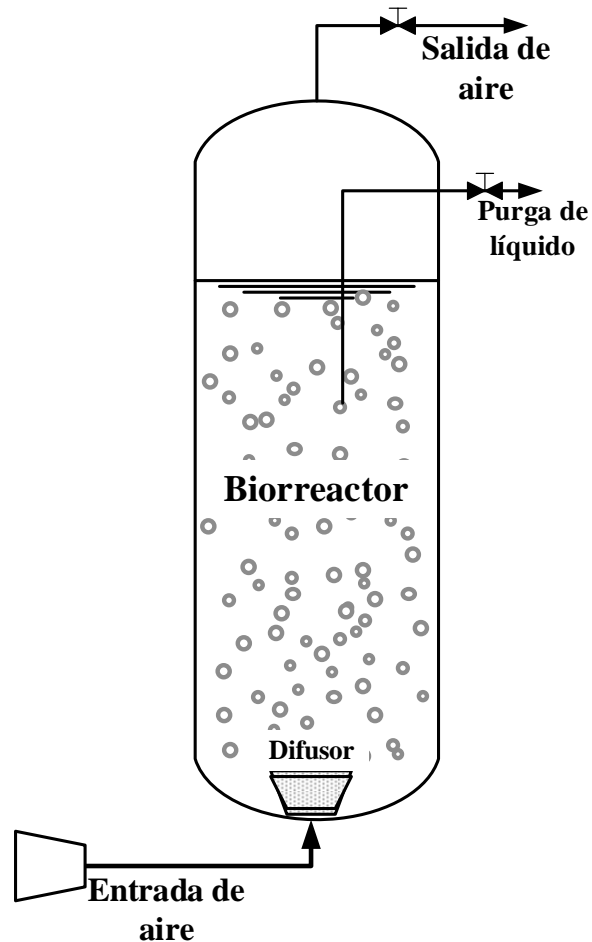


Figura 1.5 Esquema de un reactor de burbujeo.

1.2.2.2.1. Microbiología de los procesos biológicos

Para la biofiltración se deben utilizar microorganismos capaces de consumir compuestos contaminantes contenidos en el aire. Estos microorganismos provienen de diferentes fuentes como, lodos activados o anaerobios de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o de diferentes industrias (textil, metalurgia petrolera, papelera, entre muchas

otras), lodos de drenajes ácidos de minas o de suelos contaminados con compuestos recalcitrantes (Bayrakdar y col. 2016; Kennes y Thalasso, 1998, Syed y col. 2006). Debido a la robustez que proporciona el uso de consorcios microbianos, éstos se han preferido para la puesta en marcha de un proceso biológico de tratamiento de aire, sin embargo, también se utilizan cepas puras para el consumo de compuestos específicos. El tipo de microorganismos a utilizar en un sistema de biofiltración depende de las condiciones del proceso (Rivera-Terceros y col. 2015; Strong y col. 2015).

Los microorganismos usan los contaminantes para su crecimiento, obteniendo el carbono y la energía de dichas fuentes. Aunque la actividad microbiana puede llevarse a cabo aeróbica o anaeróbicamente, en el caso del tratamiento de aire, el oxígeno es un factor importante ya que es el aceptor final de electrones (Bayrakdar y col. 2016). Además, del sustrato, los microorganismos necesitan minerales para su óptimo crecimiento como nitrógeno, azufre, fósforo, calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, zinc, manganeso, entre otros, los cuales, en el caso de los biofiltros, pueden tomar del material de empaque si éste es orgánico o en su caso, de un medio de nutrientes adicional, así, el crecimiento microbiano es consecuencia del consumo de los contaminantes (Mudliar y col. 2010).

En los sistemas de biofiltración los microorganismos y el material de empaque constituyen la parte fundamental del proceso. En este contexto, el espesor de la biopelícula puede variar de 10 micrómetros a más de 1 cm de espesor y está influenciado, dependiendo del sistema que se utilice, por la hidrodinámica tanto del flujo de gas como del líquido. El espesor de la biopelícula es un factor importante en el desempeño de los biofiltros ya que, al ir aumentando el espesor, la disponibilidad de nutrientes y contaminantes se restringe originando que la difusión de estos sea un factor limitante en el desempeño. Por lo tanto, mantener un espesor de biopelícula adecuado es de suma importancia (Kraakman y col. 2011; Mudliar y col. 2010).

Materiales de empaque

Una ventaja de la biofiltración frente a otros sistemas de tratamiento de aire es su bajo costo, sin embargo, para que esto sea posible, los tiempos de tratamiento de los contaminantes deben ser los más reducidos posibles (en el orden de segundos a minutos) (Devanny y col. 1999). De ahí la importancia de los materiales de empaque y sus

características en las diferentes configuraciones de biofiltros. Los empaques son materiales donde se lleva a cabo el crecimiento microbiano. Existen diversos tipos y éstos se clasifican en orgánicos e inorgánicos. Un material de empaque adecuado para el crecimiento de los microorganismos es fundamental para el buen funcionamiento de los sistemas de biofiltración. Los factores que se toman en cuenta para la selección del empaque en un biofiltro son: tipo de material, porosidad, área superficial, toxicidad hacia los microorganismos, capacidad de adsorción y características hidrofóbicas o hidrofílicas y resistencia a condiciones adversas como acidez (Anet y col. 2013). En este sentido, los materiales orgánicos como la composta, residuos orgánicos como la cáscara de coco u otras fibras naturales, se les considera como materiales de bajo costo que, además, proporcionan ciertos nutrientes para el crecimiento microbiano. Sin embargo, estos materiales tienden a compactarse originando canalizaciones e incrementos en la caída de presión en los biofiltros, aumentando la energía necesaria para su operación. Por otra parte, los materiales inorgánicos como espuma de poliuretano, anillos Pal, entre otros, permiten mayores periodos de operación debido a que mantienen su rigidez lo que permite una menor compactación con tiempos de operación más prolongados (Detchanamurthy y Gostomski, 2012; Filho y col. 2012; Prenafeta-Boldú y col. 2008; Swaminthan y PeterAlan, 2012).

Biología molecular

Recientemente el conocimiento de las especies microbianas o fúngicas, responsables de eliminar los contaminantes en los sistemas de biofiltración ha incrementado considerablemente debido a la implementación de diferentes técnicas de biología molecular como geles de electroforesis, secuenciación de cepas aisladas y/o secuenciación masiva, los cuales han ayudado a la identificación de cambios en las poblaciones (Sercu y col. 2005). Debido a que algunas especies se ven afectadas por cambios en las variables de operación como el pH, temperatura, adición de un nuevo sustrato o sustancia ajena al sistema (Ding y col. 2006; Fakruddin y Mannan, 2013; Wang y col. 2009). Las técnicas anteriores han permitido identificar hongos, levaduras, algas, protozoos y bacterias de los biofiltros. En el caso de los hongos, se han realizado estudios que indican que su uso es atractivo para la eliminación de compuestos poco solubles, ya que son más resistentes a condiciones adversas, lo que les confiere mayor robustez a los sistemas (Arriaga y Revah 2005; Estrada

y col. 2013). En el caso de bacterias, ciertas especies pueden soportar condiciones extremas de temperatura y pH, mostrando ser capaces de eliminar sustancias como el H₂S en condiciones de acidez extrema (Chaiyaprat y col. 2011).

Actividad microbiana

Una parte fundamental de los sistemas biológicos es conocer el estado de la población, lo cual se realiza con diversas técnicas para medir la actividad microbiana bajo diferentes condiciones. Estas técnicas permiten medir el efecto sobre la actividad microbiana de ciertas condiciones de estrés a las que los microorganismos son sometidos al alterar uno u otro factor dentro de su entorno (Griebler y Slezak, 2001). En este contexto, la determinación de ciertos metabolitos durante el consumo de un sustrato, actividad enzimática, producción de CO₂ u otros gases como resultado del metabolismo microbiano, son solo algunos de los parámetros que se pueden medir como resultado del cambio de variables (Yeon y Daugulis, 1999). La respirometría evalúa el consumo de oxígeno como respuesta indirecta a la actividad microbiana (Carvalho y col. 2001). Esta técnica se ha utilizado en sistemas de biofiltración para conocer el efecto de altas concentraciones de contaminantes o cambio de variables de operación. Aunque es una técnica indirecta, los resultados son representativos de las condiciones del sistema. El consumo de oxígeno bajo ciertas condiciones de temperatura, pH o concentraciones de sustratos es un buen indicativo de que tan saludable puede estar una población bajo cierto grado de estrés (Arellano-García y col. 2010).

1.2.3.1.1. Biofiltración: operación y sus limitaciones

Aunque los sistemas biológicos presentan muchas ventajas frente a otros sistemas de tratamiento de aire, también presentan desventajas propias del proceso. Las limitaciones más críticas son aquellas relacionadas con la transferencia de masa, donde la solubilidad del contaminante a tratar juega un papel primordial para alcanzar capacidades de eliminación importantes. Compuestos como CH₄, n-hexano, n-pentano, n-hexano entre otros, presentan poca solubilidad limitando su eliminación en sistemas biológicos debido a la pobre transferencia desde la fase gas a la fase líquida (Ferdowsi y col. 2016). Por otro lado, una alta solubilidad también puede ser una limitante de la actividad microbiana, ya que un

exceso de concentración en la fase líquida puede causar inhibición a la población presente en el reactor, lo que provoca que el sistema se vea limitado por reacción o por oxígeno, en especial con altas cargas de contaminantes (Zhu y col. 2004) Además, una problemática no menos importante es que al tratar compuestos altamente solubles, no solo puede presentarse inhibición por sustrato sino también puede limitarse por transferencia de masa. El consumo del contaminante origina el crecimiento de la población microbiana, originando que en un periodo corto de operación se presenten problemas de taponamiento y canalizaciones en el lecho filtrante, lo que se traduce en altas caídas de presión y, por lo tanto, en un mayor gasto operativo (Alfonsin y col. 2013; Sempere y col. 2008; Yang y col. 2010). Existen diferentes métodos para la remoción de biomasa en exceso, los cuales incluyen procesos físicos, químicos y biológicos como los retro-lavados con corrientes de aire y agua y/o con soluciones químicas, adición de enzimas y ácaros o protozoos, de manera que se reduzca la biomasa contenida en el material de empaque. Sin embargo, algunos de ellos pueden afectar de manera significativa el proceso, por lo que su factibilidad en sistemas reales se ve limitada (Xi y col. 2014; Yang y col. 2010; Zehraoui y col. 2013). En este sentido, compuestos químicos como NaOH e NaClO han sido efectivos para remover y/o controlar la biomasa en exceso. No obstante, en ocasiones se requiere el uso de altas concentraciones del compuesto químico para alcanzar altas eficiencias de remoción de biomasa por lo que, el uso de estas soluciones, frecuentemente origina fuertes caídas en el desempeño del sistema, requiriendo largos periodos de recuperación (Mendoza y col. 2004; Cox y Deshusses, 1999).

1.3. ANTECEDENTES

1.3.1. Biomasa en exceso y el uso de oxidante como estrategia de control.

El crecimiento excesivo de biomasa se presenta en diferentes condiciones de operación siendo más común en el tratamiento de compuestos altamente solubles como alcoholes, ácidos orgánicos y cetonas. Una estrategia que ha mostrado ser efectiva en la remoción parcial de biomasa en biofiltros, es el uso de oxidantes como el ozono y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales, por su alta reactividad con una gran variedad de compuestos, son prometedores para la oxidación y remoción parcial de biomasa en exceso (Launderdale y col. 2012, García-Pérez y col. 2013, Tachikawa y Yamanaka 2014).

Ozono

Las características del ozono han permitido que este compuesto sea utilizado especialmente en la purificación de agua debido a sus fuertes propiedades oxidantes, sin embargo, por sus propiedades se le puede utilizar en otros sistemas de tratamiento (Rice, 1999). Es un compuesto con alta reactividad, con un alto potencial de reducción en condiciones ácidas y bajo potencial en condiciones alcalinas. En solución acuosa, el ozono reacciona con compuestos orgánicos a través de dos rutas (i) reacción directa con la molécula de ozono, (ii) reacción indirecta a través de la formación de radicales como el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (potencial $E^0=+2.8$ V), el cual reacciona rápidamente y de forma no selectiva con la mayoría de las especies presentes (Khadre y col. 2001; Boncz, 2002; Li y col. 2010).

H_2O_2

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno también es un oxidante que se ha utilizado para el tratamiento de compuestos contaminantes y el control de crecimiento microbiano en biofiltros para el tratamiento de agua (Christensen y col. 1990; Launderdale y col. 2012). Es un oxidante con menos poder de oxidación que el ozono, y normalmente requiere iluminación UV para su descomposición a radicales $\bullet OH$. Sin embargo, en combinación con el ozono y/o sales de hierro da origen a la formación de radicales libres con alto poder oxidante (Sun y col. 2011). Adicionalmente, se ha demostrado la efectividad de la combinación de ozono con H_2O_2 en la remoción parcial de componentes de las biopelículas

como los exopolisacáridos (EPS) haciéndolo efectivo para prevenir y/o controlar la biomasa en exceso en los sistemas de biofiltración (Tachikawa y Yamanaka, 2014).

En este contexto, el ozono ha sido utilizado, de manera efectiva, en la remoción de biomasa en exceso en biofiltros, sin comprometer el desempeño de los reactores. Moussavi y Mohseni, (2007) y Wang y col. (2009) reportaron que el ozono (e, i. 20 ppm_v) producido en un proceso previo de foto-oxidación por UV (UV-BF), fue efectivo para el control de biomasa en un biofiltro para tratar tolueno, orto-xileno y clorobenceno, respectivamente. Un amplio intervalo de concentraciones de ozono que van del orden de los ppbv (50 ppbv) hasta ppm_v (280 ppmv) (0.107 - 600 mgO₃ m⁻³) han sido evaluadas. En la **Tabla 1.2** se presentan diferentes trabajos que han reportado la efectividad del ozono como método para controlar o prevenir el exceso de biomasa originada por la degradación de diferentes compuestos.

Tabla 1.2. Uso de ozono para la remoción parcial de biomasa en sistemas de tratamiento de aire.

Sistema	Compuesto COVs	pH	Concentración de ozono (mg m ⁻³)	Referencia
BF	Clorobenceno	-	40 a 120	Wang y col. (2009)
BF	Formaldehído	3.6-9.5	0.107	García-Pérez y col. (2013)
BM	<i>o, m, p</i> - Xileno	7-7.5	200-600	Wang y col. (2013)
BF	Tolueno		80 a 320	Xi et al. (2014)
BF	Formaldehído	7, 8.2	0.19	Maldonado-Díaz y Arriaga, (2015)
BF	Acetato de etilo	2-8	0.19	Covarrubias-García et al. (2016)

Por otro lado, aunque menos estudiado, el H₂O₂ también es efectivo en la remoción de biomasa en biofiltración de aire. Cox y Deshusses, (1999), reportaron una remoción del 69 % de biomasa con una solución al 11.3 % (p/v) de H₂O₂ y, de 29 % con una solución al 1.1 % (p/v) en un BLE. Además, una alta efectividad del H₂O₂ también fue reportada por Lauderdale y col. (2012) en el desprendimiento de biomasa, utilizando concentraciones de H₂O₂ < 0.1 mM. Tachikawa y Yamanaka, (2014) demostraron que el tratamiento con ozono seguido por la adición de H₂O₂ tuvo una alta efectividad en la remoción de EPS de una

biopelícula formada por *Pseudomonas fluorescens*. Por lo que ambos compuestos son prometedores para ser usados bajo diferentes condiciones de operación en sistemas de biofiltración para el tratamiento de aire.

En muchas industrias, compuestos altamente solubles, como alcoholes, son liberados en conjunto con compuestos azufrados. Esto significa que las corrientes de aire a tratar pueden presentar variaciones en su composición. En la industria de la pulpa y el papel, dos grupos de compuestos que son altamente emitidos son los COVs y los CIVs (Martínez y col. 2008; Rene y col. 2009), dentro de ellos existen compuestos con alta solubilidad como el MeOH, incluido en la lista de compuestos peligroso del aire (Ramírez-López y col. 2010), y compuestos reducidos de azufre como H₂S (Ding y col. 2006; Zhang y col. 2007). La eliminación conjunta de estos compuestos genera problemas de taponamiento de los biofiltros ya sea por exceso de biomasa o por acumulación de azufre elemental. Sin embargo, a diferencia de los procesos reportados usando oxidantes para el control de biomasa, donde los compuestos han sido tratados de forma individual y a pH neutro, en el tratamiento de H₂S y MeOH, generalmente el pH es ácido debido a la oxidación del H₂S a sulfatos (SO₄²⁻) (Jin y col. 2005a y 2007). Bajo estas condiciones de operación tan frecuentes en los sistemas de biofiltración, no existen estudios que permitan conocer si el uso de oxidantes puede ser efectivo para la remoción o control de biomasa. Debido a lo anterior, es importante su estudio para conocer si esta estrategia puede funcionar para el control o prevención de biomasa en exceso en condiciones de acidez y de igual forma conocer que efecto tienen sobre el desempeño de los sistemas.

1.3.2. Eliminación de metano en sistemas de biofiltración

En el otro extremo de operación de sistemas de tratamiento de aire, se encuentra la de la falta de crecimiento microbiano debido a una pobre transferencia de masa. En este sentido, la oxidación biológica de compuestos poco solubles como el CH₄ se lleva a cabo utilizando la habilidad de ciertos microorganismos capaces de utilizar este compuesto como fuente de energía y carbono, oxidándolo en CO₂, H₂O y biomasa. Estos microorganismos denominados metanótrofos, constituyen la fuente principal de la eliminación de metano a nivel microbiano. Los metanótrofos llevan a cabo la oxidación de metano mediante el uso de una enzima clave de su metabolismo, la metano monooxigenasa (MMO) (Hoefman y

col. 2014; López y col. 2013a). Estos microorganismos se encuentran en diversos ambientes naturales (Macalady y col. 2002), su clasificación se basa en dos categorías, metanótrofos tipo I (γ -proteobacteria) o Tipo II (α -proteobacteria) (Strong y col. 2015). El conocimiento más profundo del tipo de microorganismos que consumen uno u otro compuesto ha permitido la implementación de procesos específicos, es decir, se enfocan en la eliminación de un compuesto en particular, en este caso CH_4 .

Diferentes autores han reportado la eliminación de CH_4 de corrientes gaseosas provenientes de varias fuentes. Para su eliminación se han estudiado diversos sistemas, dentro de los cuales la biofiltración es prometedora para su tratamiento (Girar y col. 2011). Si bien los biofiltros han mostrado ser efectivos para la remoción de CH_4 a bajas concentraciones, las capacidades de eliminación obtenidas aún son bajas (Gómez-Cuervo y col. 2016) por lo que existen limitantes que deben ser superadas para que estos sistemas sean efectivos en la eliminación no solo de CH_4 sino de otros compuestos de baja solubilidad.

Por otro lado, la eliminación de CH_4 representa también una ventaja para la obtención de productos de interés industrial como los polihidroxicanoatos (PHAs) (Strong y col. 2015). Una ventaja conferida a los metanótrofos, en especial los de tipo II, es su capacidad para la producción de bioplásticos. Aunque no es una característica única de los metanótrofos (Mokhtari-Hosseini y col. 2009; Yezza y col. 2006; Zhang y col. 2014), en las últimas décadas el interés por la obtención de bioplásticos a través de estos microorganismos ha incrementado debido a que el metano es una fuente de carbono de bajo costo (Khosravi-Darani y col. 2013; Pieja y col. 2012).

La problemática ambiental que representa el uso de plásticos convencionales a nivel mundial ha generado que se busquen alternativas más ecológicas y/o ambientalmente amigables para su producción (Reddy y col. 2013; Anjum y col. 2016; Kunasundari y col. 2017). Los polihidroxicanoatos (PHAs) han sido extensamente estudiados debido a que presentan propiedades muy similares a los plásticos convencionales, y, por lo tanto, con la ventaja que estos son fácilmente biodegradables, lo que permite su eliminación del ambiente en un periodo muy corto de tiempo (Kunasundari y col. 2017; Tamboli y col. 2010). Los PHAs son procesados por varios tipos de microorganismos bajo limitación de un componente esencial para su crecimiento, entre los principales compuestos estudiados

están O, N, P, S, elementos traza como Mg, Ca, Mn y Fe. Sin embargo, sus altos costos de producción han sido hasta ahora una limitante para poder ser procesados de forma industrial y competir con la producción de plásticos convencionales, debido al uso de materias primas de primera generación, representando hasta el 40 % del costo total de producción (Bugnicourt y col. 2015). Dado que, en diversas actividades se producen corrientes que contienen CH_4 en porcentajes que no son adecuadas para su uso como fuente de energía, su tratamiento representa una ventaja importante, ya que a la par de tratar un importante gas de efecto invernadero, también se obtiene un producto de interés industrial, lo que hace aún más atractivo el proceso de tratamiento. Sin embargo, para la obtención de los bioplásticos almacenados por las células, es necesario poder recuperar la biomasa para su extracción. Debido a lo anterior los biofiltros no son una alternativa adecuada, por lo que diferentes configuraciones de reactores con biomasa suspendida han sido implementados para el tratamiento de CH_4 (Zúñiga y col. 2013). Una alternativa poco estudiada para este tipo de compuestos son los biorreactores o columnas de burbujeo, los cuales tienen buena de transferencia de masa, debido a la geometría de los difusores de aire que permiten la obtención de microburbujas, así como de una fácil recuperación de biomasa, haciéndolos prometedores para la eliminación de contaminantes de baja solubilidad como CH_4 (Kantarci y col. 2005; Rahnama y col. 2012; Rivera-Terceros y col. 2015).

1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

La biofiltración ha mostrado ser un proceso altamente efectivo para el tratamiento de emisiones gaseosas obteniendo altas eficiencias de remoción para la gran mayoría de los contaminantes tratados bajo este proceso, ya sea a escala laboratorio, piloto o industrial. Sin embargo, a pesar de su implementación en la industria, aún presenta problemáticas que se deben superar para optimizar el proceso. En este sentido, dos de los principales cuellos de botella de los sistemas de biofiltración son: el taponamiento del lecho filtrante originado por una rápida acumulación de biomasa, causada de la degradación de los contaminantes fácilmente asimilables por los microorganismos y por otro lado problemas de transferencia de masa atribuidos principalmente a la baja solubilidad de los compuestos a tratar. En el primer caso, el taponamiento provoca obstrucción, canalizaciones y altas caídas de presión, incrementando el gasto energético en general y reduciendo la vida útil del sistema por lo que se buscan estrategias o nuevas alternativas que permitan mantener largos periodos de operación en los biofiltros con altas eficiencias de remoción sin que se presenten problemas de taponamiento por un exceso de biomasa. Por otro lado, cuando el compuesto es poco soluble, la transferencia de la fase gas a la fase líquida es muy baja y los microorganismos no tienen alta disponibilidad al contaminante para su eliminación por lo que se han implementado diversos métodos para la mejora de la transferencia de masa en sistemas de biofiltración como la adición de fases no acuosas o la implementación de biofiltros fúngicos. Otra alternativa poco probada es la implementación de reactores de burbujeo, los cuales pueden ser prometedores para la eliminación de compuestos poco solubles como el metano al mantener la biomasa en suspensión y no en biopelícula como en el caso de los biofiltros. Por lo anterior, en este trabajo se estudió la posibilidad de implementar diversos mecanismos que permitan, por un lado, revertir el exceso de biomasa mediante la adición de oxidantes de forma que se elimine de forma parcial la biomasa del sistema sin afectar su desempeño. Mientras que, para superar los problemas de transferencia de masa, se probó una configuración de columna de burbujeo con recirculación de la fase gas y se evaluó su desempeño en la eliminación de corrientes diluidas de CH_4 , un compuesto poco soluble y con un alto interés para su eliminación de corrientes gaseosas.

1.5. HIPÓTESIS GENERAL

La eliminación de compuestos contaminantes del aire será más efectiva mediante la implementación de estrategias que permitan superar la barrera de la transferencia de masa.

1.6. OBJETIVO GENERAL

Implementar estrategias de operación que mejoren el desempeño de sistemas biológicos de tratamiento de aire en la eliminación de contaminantes con diferentes propiedades fisicoquímicas.

CAPITULO 2. ADICIÓN DE OXIDANTES (OZONO Y H₂O₂) COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE BIOMASA EN EXCESO EN LA BIOFILTRACIÓN DE H₂S Y METANOL EN CONDICIONES ÁCIDAS.

2.1. INTRODUCCIÓN

Estudios recientes señalan que el uso de oxidantes puede ser efectivo en la remoción de biomasa en exceso sin afectar el desempeño del reactor (Moussavi y Mohseni, 2007; Wang y col. 2009). En este sentido, oxidantes como O₃ y H₂O₂ han sido utilizados para remover o prevenir la acumulación de biomasa, en especial la película superficial de polímeros extracelulares (EPS) que se crea por la secreción de estas sustancias por las células microbianas. Se ha demostrado que la eliminación parcial de los EPS mejora la transferencia de masa hacia la biopelícula haciendo más disponible el contaminante para los microorganismos en la película microbiana (Lauderdale y col. 2012; Tachikawa y Yamanaka, 2014). Sin embargo, el uso de oxidantes como el ozono para el control o remoción de biomasa en exceso aún es escaso, sobre todo en sistemas biológicos para el tratamiento de emisiones gaseosas, los estudios reportados hacen énfasis en el tratamiento de compuestos de forma individual a pH neutro. A pesar de lo anterior, el crecimiento excesivo de biomasa es un tema generalizado ya que, puede presentarse tanto en el tratamiento de mezcla de contaminantes como a diferentes condiciones de pH. Un ejemplo de ello, son el tratamiento de emisiones de industrias como la de la pulpa y el papel, donde se liberan compuestos orgánicos volátiles como MeOH y compuestos azufrados como el H₂S los cuales, al ser tratados en un mismo sistema, originan tanto una cantidad excesiva de biomasa debido al consumo de MeOH como acidificación originada por la oxidación del H₂S (Jin y col. 2007; Rene y col. 2010; Sologar y col. 2003). Dado lo anterior, es importante estudiar la efectividad de oxidantes como el O₃ y H₂O₂ en la remoción de biomasa a diferentes condiciones de pH y en corrientes con mezclas de diferentes contaminantes, debido a que son condiciones comunes de operación en biofiltración y representan condiciones más reales del proceso (Arellano-García y col. 2015; González-Sánchez y col. 2008; Rene y col. 2010). Por lo anterior en este capítulo se presentan los

resultados obtenidos en el estudio de la adición O_3 y H_2O_2 y su efecto sobre la remoción de biomasa en exceso en el tratamiento de H_2S y MeOH a pH ácido, dos contaminantes emitidos en la industria de la pulpa y el papel.

2.2. HIPÓTESIS

La adición de oxidantes permitirá remover parcialmente la biomasa en exceso al mismo tiempo que fomentará la transferencia de masa mejorando la capacidad de eliminación y eficiencia de remoción en un BLE para la eliminación de H_2S y metanol en condiciones de pH ácidas.

2.3. OBJETIVOS

Estudiar el desempeño del reactor en función de la capacidad de eliminación, actividad microbiana y contenido de biomasa en el lecho filtrante con y sin alimentación de oxidantes (ozono y H_2O_2) de un BLE en la eliminación de H_2S y MeOH.

Evaluar el efecto del ozono en las poblaciones microbianas durante el tratamiento de H_2S y MeOH en condiciones ácidas.

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. Medio de sales minerales

Tabla 2.1 Composición del medio mineral

Compuesto	Concentración (g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	4.0
K ₂ HPO ₄	4.0
NH ₄ Cl	0.8
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02

2.4.2. Preparación del inóculo.

El inóculo para tratar corrientes con MeOH-H₂S, se adaptó a partir de una mezcla de lodos aerobios, anaerobios y lodos de drenajes ácidos de mina, obtenidos respectivamente de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, ubicada en la delegación Iztapalapa, planta de tratamiento de la UAM-Iztapalapa y de drenajes ácidos de mina del estado de San Luis Potosí.

La mezcla de lodos se aclimató por tres meses a un pH entre 2.5 y 3 con adición de MeOH al 0.5 % (v/v) y 8 g L⁻¹ de Na₂S₂O₃·5H₂O como fuente de azufre. La composición del medio de sales minerales (MSM) usado para la aclimatación del inóculo y para la operación del reactor es la que se describe en la **Tabla 2.1**, la cual fue modificada de Jin y col. (2007), ajustando el pH a 2.5 con una solución de HCl para la operación del reactor.

2.4.3. Arranque y operación

El sistema de biofiltración constó de un biofiltro de lecho escurrido de configuración rectangular de 12 x 12 x 52 cm, empacado con cubos de espuma de poliuretano (PUF: por sus siglas en inglés), las características del material de empaque fueron descritas por Arellano-García y col. (2015). El reactor se dividió en dos secciones con un volumen total de lecho vacío de 2.3 L (**Figura 2.1**). Para la alimentación de MeOH en fase gas, una

corriente de aire se pasó a través de un tubo difusor, el cual contenía MeOH en fase líquida, la corriente con MeOH en fase gas se mezcló con otra que provenía de una bolsa tedlar que contenía H₂S. La corriente de aire con ambos compuestos se introdujo al reactor en la parte inferior del sistema a contracorriente del flujo de recirculación del MSM. El pH en el reactor se mantuvo en un valor de 2.5-2.6, mediante la alimentación de una solución 0.5 N de NaOH con una bomba dosificadora (Barnant-HD-MA-Pump). Para mantener un adecuado balance de nutrientes y evitar la acumulación de sales, la solución de nutrientes se renovó dos veces por semana; los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente. La caída de presión en el reactor se midió con un tubo en U conectado al sistema.

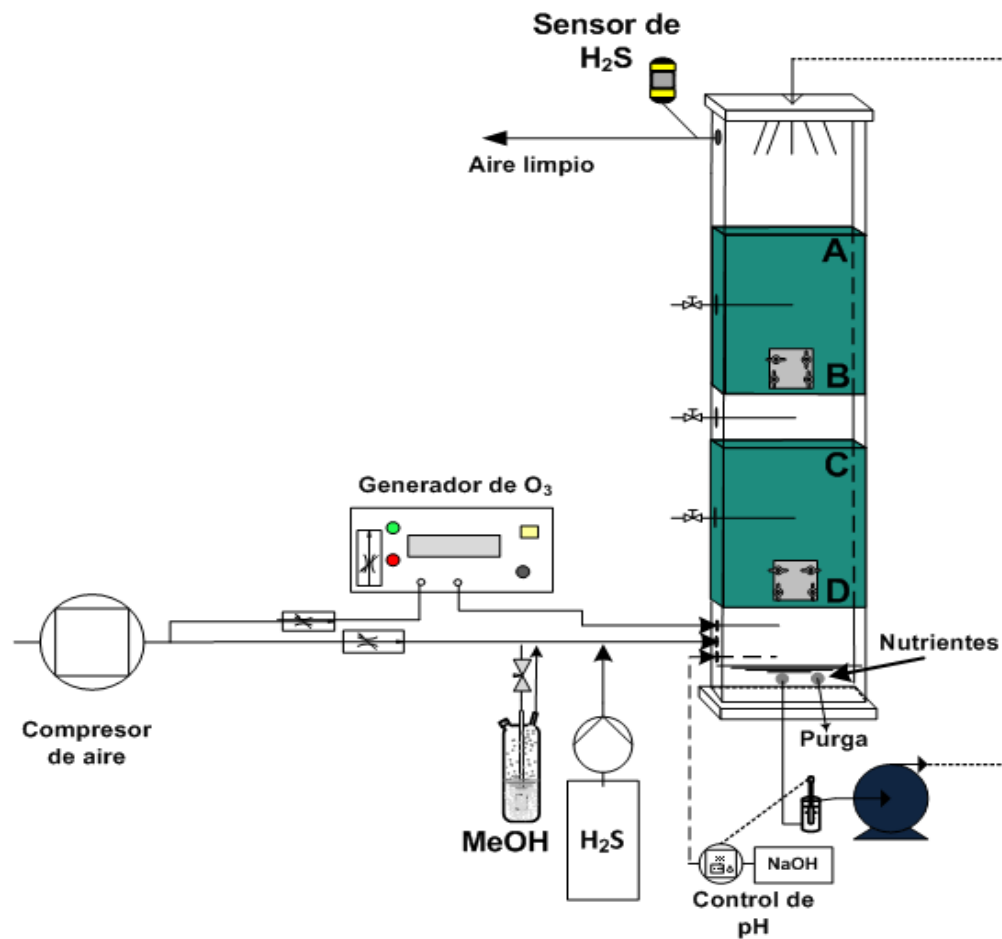


Figura 2.1 Esquema de operación del reactor: A, B, C y D, indican los puntos de muestreo para biomasa.

2.4.4. Mediciones de la fase gas.

Las concentraciones de MeOH en fase gas se determinaron mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 equipado con una columna de capilaridad (Alltech AT-FAME, 30 m x 250 μm x 0.25 μm) y un detector de ionización de flama (FID: por sus siglas en inglés). Como gas acarreador se utilizó helio con un flujo de 0.4 mL min^{-1} . Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 100 °C, 200 °C y 200 °C, respectivamente.

El CO₂ fue monitoreado con un analizador de dióxido de carbono (ZRH Infrared gas analyzer, Fuji Electronic; California Analytical instrument) con capacidad de medición de 0 a 2000 ppm. El H₂S se monitoreó con un sensor Odalog analyzer LL-H2S-1000 a la entrada, salida y puertos intermedios del sistema. El O₃ se determinó con el método iodométrico mediante la titulación con una solución de Na₂S₂O₃ 5H₂O, de acuerdo con el procedimiento descrito por Rakness y col. (1996).

2.4.5. Determinación del contenido de biomasa

La biomasa en la fase líquida se determinó mediante métodos estándar (APHA, 2005). De acuerdo con lo siguiente: se tomó una muestra de 40 mL medio mineral en el reactor (líquido de recirculación) cada vez que el medio mineral fue reemplazado por medio nuevo, la muestra se secó durante 48 horas y después el contenido se calcinó a 550 °C durante 1.5 h. El contenido de biomasa se determinó mediante diferencia de peso en cada etapa de medición, las muestras fueron analizadas por triplicado.

Para la determinación de biomasa en el reactor antes y durante la adición de oxidantes, la operación fue suspendida y se dejó escurrir el medio mineral durante una noche con el fin de determinar solo la biomasa con el menor contenido de humedad. Después de este tiempo, el empaque fue retirado del reactor y se pesó cada cubo del soporte con biomasa. El contenido de biomasa se calculó sustrayendo el peso promedio de cada cubo sin biomasa.

2.4.6. Determinación de sustancias en la fase líquida

Proteínas

El contenido de proteínas en el medio de recirculación del reactor se determinó con el Kit de Bio-Rad DC Protein Assay, el cual está basado en el método de Lowry (Lowry y col. 1951). Para la determinación de proteínas, primero se preparó una curva patrón utilizando como estándar albúmina de suero bovino. La curva se realizó a una longitud de onda de 750 nm en un espectrómetro UV/vis (Rayleig UV-1800).

Para determinar el contenido de proteínas en el líquido, se tomó una muestra de 400 mL del medio de recirculación y se adicionó la misma cantidad de NaOH (0.2 N) a un tubo eppendorf. La mezcla se sometió a baño maría durante 15 minutos a 100 °C, después se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, del sobrenadante se tomaron 200 µL y se pasaron a otro tubo eppendorf donde, además, se adicionaron 0.1 mL del reactivo A y 0.8 mL del reactivo B, del kit Bio Rad. Las muestras se colocaron en la oscuridad durante 15 minutos para su posterior lectura en el espectrofotómetro, se preparó un blanco con una solución de NaOH igual que la muestra problema.

Para medir las proteínas en la biopelícula se tomó una muestra del lecho filtrante, tratando que fuera lo más homogénea posible, la biomasa se maceró hasta lograr que toda la biomasa de la muestra quedara en suspensión. Haciendo las diluciones correspondientes, la cantidad de proteína se determinó con el procedimiento descrito anteriormente.

Carbohidratos

Los carbohidratos en el medio de recirculación se determinaron de acuerdo con el procedimiento propuesto por Dubois y col. (1956). El cual consiste en tomar 1 mL de muestra agregando 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, las muestras se dejan reposar por 10 minutos y luego se agitan en un vortex y se colocan en baño maría a una temperatura de entre 25-30 °C por 10 minutos. Después de este tiempo se mide la absorbancia del color amarillo-naranja de las soluciones a 490 nm en un espectrómetro UV/vis (usado en este estudio: Rayleig UV-1800). Para descartar ruidos en las soluciones de medición, se preparó un blanco con agua destilada y las demás soluciones.

Cada determinación se realizó por triplicado. Una curva patrón fue preparada con una solución estándar con glucosa de 1 g L^{-1} , realizando disoluciones de 0 a 100 ppm.

Determinación de peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno se agregó una vez al día al medio mineral de recirculación del reactor, el seguimiento de la concentración de H_2O_2 se realizó mediante la reacción con iodo y titulación volumétrica con una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, de acuerdo con el método descrito por Tachikawa y Yamanaka, (2014). Este oxidante se alimentó al reactor a concentraciones de 1 mg L^{-1} en dos intervalos de tiempo: día 437 y 438 y del 442-451 y a una concentración de 5 mg L^{-1} del día 453 al 459.

2.4.7. Determinación de la actividad microbiana

Para medir la actividad microbiana en el reactor, bajo diferentes condiciones de operación, se usó la técnica de respirometría, que consiste en el seguimiento del consumo de oxígeno en presencia del sustrato de interés, en este caso MeOH. Para realizar los experimentos se tomaron muestras de biomasa de diferentes secciones del lecho filtrante. La biomasa se resuspendió en el MSM y se maceró hasta obtener una suspensión homogénea, después se centrifugó y se resuspendió dos veces en medio fresco para eliminar cualquier residuo que pudiera interferir en las mediciones de consumo de oxígeno. Para evaluar la tasa de consumo de oxígeno se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de MeOH y se analizó la actividad microbiana para cada concentración en una cámara de respirometría (**Figura 2.2**) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Arellano-García y col. 2010). Los experimentos se realizaron por duplicado.

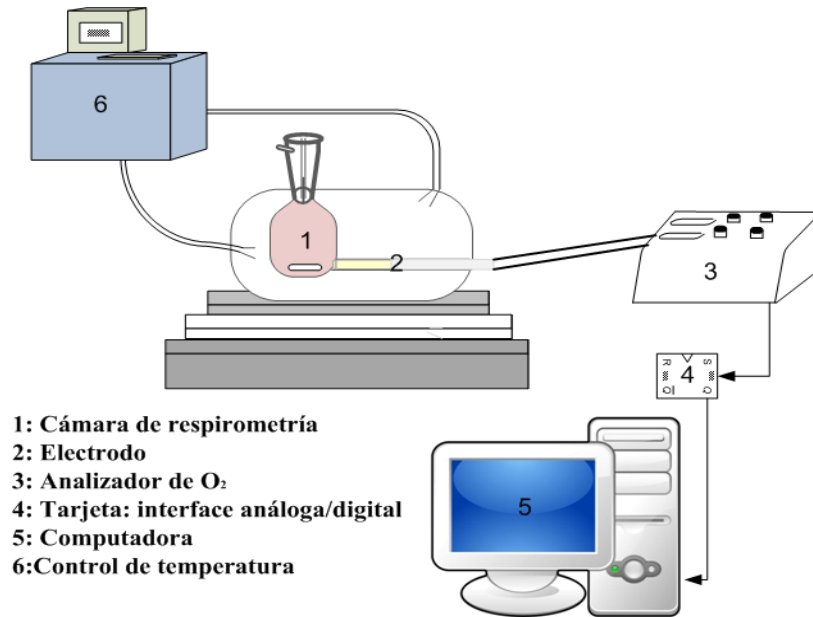


Figura 2.2. Sistema de experimentación para medir la actividad microbiana.

2.4.8. Distribución de biopelícula: Resonancia magnética de imágenes.

Para conocer la distribución de la biopelícula en los cubos del soporte, se realizaron análisis de resonancia magnética de imágenes (RMI). Dos cubos del material de empaque fueron removidos del lecho filtrate después de drenar el líquido retenido. El procedimiento de análisis de la distribución de biomasa se realizó de acuerdo con lo descrito por Arellano-García y col. (2015). Las imágenes fueron tomadas con un escáner magnético (Varian, VNMR7 T, USA), el volumen de ocupación de la biomasa se calculó con un software de imagenología (OsiriX imaging software) a partir de la reconstrucción tridimensional que se obtuvo de la secuencia de imágenes tomadas.

2.4.9. Biología molecular (Extracción de ADN, DGGE y Secuenciación)

Para conocer el efecto del ozono en la población microbiana, se tomaron diferentes muestras para la realización de análisis de biología molecular. Para la elaboración del gel de DGGE se tomaron muestras en diferentes secciones del reactor (Secciones A, B, C Y D; **Figura 2.1**) antes, durante y después de la primera adición de ozono. Las muestras se lavaron tres veces con una solución salina centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos y

recuperando el pellet en cada lavado. El pellet recuperado se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

El ADN total de cada muestra fue extraído con el kit PowerSoil® DNA Isolation, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la amplificación de las regiones V3-V5 del gen 16S rRNA en bacterias, se usaron los primers GC-338F y 907R. La reacción de PCR se llevaron a cabo con 50 ng de ADN (volumen final de 25 μL) usando HotStart DNA polymerase (Qiagen) como lo describe el fabricante, excepto por la adición de albumina de suero bovino a una concentración final de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El programa para la PCR consistió en una desnaturalización inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, 10 ciclos de desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, alineación a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por ciclo) por 30 s, y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, seguido por 25 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min; y una extensión final $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Para el análisis de la población de hongos, se amplificó la región V1-V2 del gen 18S rRNA usando los primers NS1 y GCFung. La reacción de PCR se desarrolló con 25 ng de DNA (volumen final de 25 μL) usando HotStart DNA polymerase (Qiagen) como lo describe el fabricante, excepto por la adición de albumina de suero bovino a una concentración final de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, además, de MgCl_2 a una concentración final de 2.5 mM. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, 35 ciclos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s, y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s; y una extensión final de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Para la elaboración del gel (DGGE) para bacterias la concentración de acrilamida fue del 6% con un gradiente de desnaturalización de 40 y 60 %. Se corrió una alícuota de 5 μL del producto de PCR a 50 V por 16 horas. Para elaborar el gel para hongos, la concentración de acrilamida fue la misma que para bacterias, pero con un gradiente de desnaturalización de 30 % y 60 %. Una alícuota de 3 μL del producto de PCR se corrió durante 19 h a 65 V (Dcode BioRad equipment). Las bandas en el gel preparado se visualizaron mediante la tinción del gel con nitrato de plata. Las bandas más representativas de cada gel fueron seleccionadas cortadas y amplificadas con el kit Wizard® SV gel y PCR Clean-Up System (Promega). Una vez realizada la amplificación, las bandas fueron secuenciadas en el laboratorio de biología molecular de la UAM-Iztapalapa (México). Los resultados del ADN secuenciado fueron analizados usando herramientas de computación provistas por el centro nacional para la información biotecnológica (NCBI: por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La

comparación de los datos se realizó usando la herramienta informática de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST: por sus siglas en inglés). Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio se depositaron en la base de datos de nucleótidos GenBank, los números de acceso asignados a cada secuencia se presentan en la **Tabla 2.3**

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Operación y desempeño del BLE

La operación del reactor (en adelante denominado R1) se llevó a cabo durante 460 días alimentando diferentes cargas de los contaminantes (**Tabla 2.2**). El H₂S y el MeOH se introdujeron de manera simultánea con cargas iniciales de $4.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0.2$ y $13.4 \pm 1.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Durante los primeros 26 días de operación las cargas alimentadas de H₂S fueron eliminadas por completo (**Figura 2.3**, etapa Ia), mientras que para el MeOH no se observó remoción alguna. Lo que se atribuyó a la acidez presentada en el reactor debido a la oxidación de H₂S a SO₄⁼, el pH en el sistema fue variable llegando a valores < 1.0. En el día 24 de operación el sistema se re-inoculó a la par que se estableció un control de pH, manteniendo un valor entre 3.8 - 4.3. La reinoculación del reactor y el incremento del pH en el sistema mostraron una rápida eliminación de MeOH con eficiencias de remoción del 100 % para el día 29 de operación. Una vez que se establecieron las condiciones para la remoción de MeOH el pH del sistema se fijó a un valor de 2.5 para el resto de la operación del reactor. Los resultados mostraron que al establecer el pH en 2.5, la capacidad de eliminación de MeOH disminuyó a 70 %, lo que indicó que la actividad de la comunidad microbiana responsable del consumo de MeOH fue susceptible a los cambios de pH en el sistema. La CE_{max} de MeOH y H₂S alcanzada en esta etapa fue de $565 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=97 %) y $13 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=100 %), respectivamente. Observaciones en microscopía óptica mostraron una abundante población de levaduras, lo cual fue consistente con lo reportado por estudios anteriores en el tratamiento de MeOH (Jin y col. 2008; Barcón y col. 2012) para la remoción de MeOH, encontrando una densa población eucariota favorecida por las condiciones ácidas presentes. Los resultados del desempeño del reactor son comparables con los reportados previamente en condiciones similares a las establecidas en este trabajo. En este contexto, Jin y col. (2007) reportaron una CE_{max} de $236 \text{ g}_{\text{CH}_3\text{OH}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una carga de $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $6.4 \text{ g}_{\text{H}_2\text{S}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una ER de 100% a pH de 2.0.

Tabla 2.2. Condiciones de operación y resultados de las diferentes etapas de operación en el reactor.

Etapa	Tiempo (d)	pH	MeOH			H ₂ S			Oxidantes	
			Carga (g m ⁻³ h ⁻¹)	CE (g m ⁻³ h ⁻¹)	ER (%)	Carga (g m ⁻³ h ⁻¹)	CE (g m ⁻³ h ⁻¹)	ER (%)	O ₃ (g m ⁻³ h ⁻¹)	H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)
Ia	1-15	6.4 - 1.2	13.4 ± 1.6	0.1 ± 0.3	1.0 ± 2.3	4.6 ± 0.3	4.6 ± 0.3	100		
	16-27	0.8 - 4.3	21.9 ± 2.2	0.02 ± 0.07	0.15 ± 0.4	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	100		
I	28-43	4.3-2.9	20.4 ± 2.4	18.2 ± 1.0	90.6 ± 11.6	6.3 ± 1.2	6.3 ± 1.2	100		
	44-68	2.2 - 3	30.5 ± 1.2	24.6 ± 2.3	80.5 ± 6.4	8.8 ± 0.8	8.8 ± 0.8	100		
	69-95	2.5	47.2 ± 7.8	32.8 ± 4.0	70.3 ± 8.0	9.9 ± 1.0	9.9 ± 1.0	100		
	96-129	2.5	270.6 ± 83.8	192.5 ± 56.4	71.7 ± 13.1	11.0 ± 0.8	11.0 ± 0.8	100		
	130-241	2.5	331.3 ± 42.6	306.0 ± 36.0	92.7 ± 5.1	11.5 ± 0.5	11.0 ± 1.2	95.9 ± 9.9		
II	242-259	2.5	569.9 ± 45.2	406.8 ± 85.1	71.2 ± 15.2	12.8 ± 0.2	11.5 ± 1.5	89.5 ± 11.7		
	260-298	2.5	646.1 ± 41.5	476.2 ± 59.1	73.5 ± 6.0	13.2 ± 1.1	11.1 ± 2.4	83.8 ± 15.1	150.2 ± 16.7 ⁺	
III	299-395	2.5	613.6 ± 17.6	388.8 ± 64.8	63.5 ± 11.0	13.4 ± 0.6	11.0 ± 2.1	82.4 ± 15.0		
	396-412	2.5	318.5 ± 14.3	198.8 ± 82.9	62 ± 25.1	13.7 ± 0.2	11.9 ± 1.7	86.4 ± 12.3		
IV	413-429	2.5	261.2 ± 3.0	132.8 ± 15.8	50.8 ± 6.0	13.6 ± 0.4	10.7 ± 2.1	78.4 ± 15.0		
	430-436	2.5	259.3 ± 5.3	79.7 ± 28.2	31.3 ± 11.3	13.7 ± 0.2	7.4 ± 2.1	54.1 ± 14.6	4.8 ± 0.1 ⁺	
V	437-451	2.5	261.8 ± 3.3	134.3 ± 52	51.7 ± 19.8	13.7 ± 0.3	8.2 ± 3.0	59.7 ± 21.6		1 [*]
	452-460	2.5	264.6 ± 3.8	151.7 ± 8.5	57.1 ± 2.9	13.9 ± 0.4	9 ± 1.5	64.8 ± 12.2		5 [*]

2.5.2. Acumulación de biomasa

Con el consumo de MeOH en el reactor, se propició un rápido crecimiento de la biomasa en el material de empaque; hecho que dio origen a una acumulación excesiva de biomasa y, como consecuencia, un notorio incremento en la caída de presión. Durante 180 días de operación la caída de presión se mantuvo por debajo de $25 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ logrando así mantener tasas estables de eliminación de H_2S y MeOH. Sin embargo, la acumulación de biomasa después de este periodo de operación redujo notablemente la eliminación de H_2S , alcanzando valores menores a 50 % de ER. En el día 236 de operación, el material de empaque fue extraído del reactor con el objetivo de conocer la cantidad de biomasa acumulada en el sistema. Esto debido a que la caída de presión ya registraba valores por encima de los $400 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$. La cantidad de biomasa registrada fue de $236 \text{ gX L}^{-1}_{\text{empaque}}$ (**Figura 2.3**). Los resultados mostraron que el reacomodo del lecho filtrante, una vez registrado el peso de la biomasa, ayudó a disminuir la caída de presión en el sistema, alcanzando eliminaciones cercanas al 100 % para ambos compuestos. Sin embargo, las altas tasas de remoción solo se mantuvieron por corto tiempo (10 días), una vez que la biomasa volvió a acumularse, la caída de presión en el sistema incrementó nuevamente ($212.5 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$)

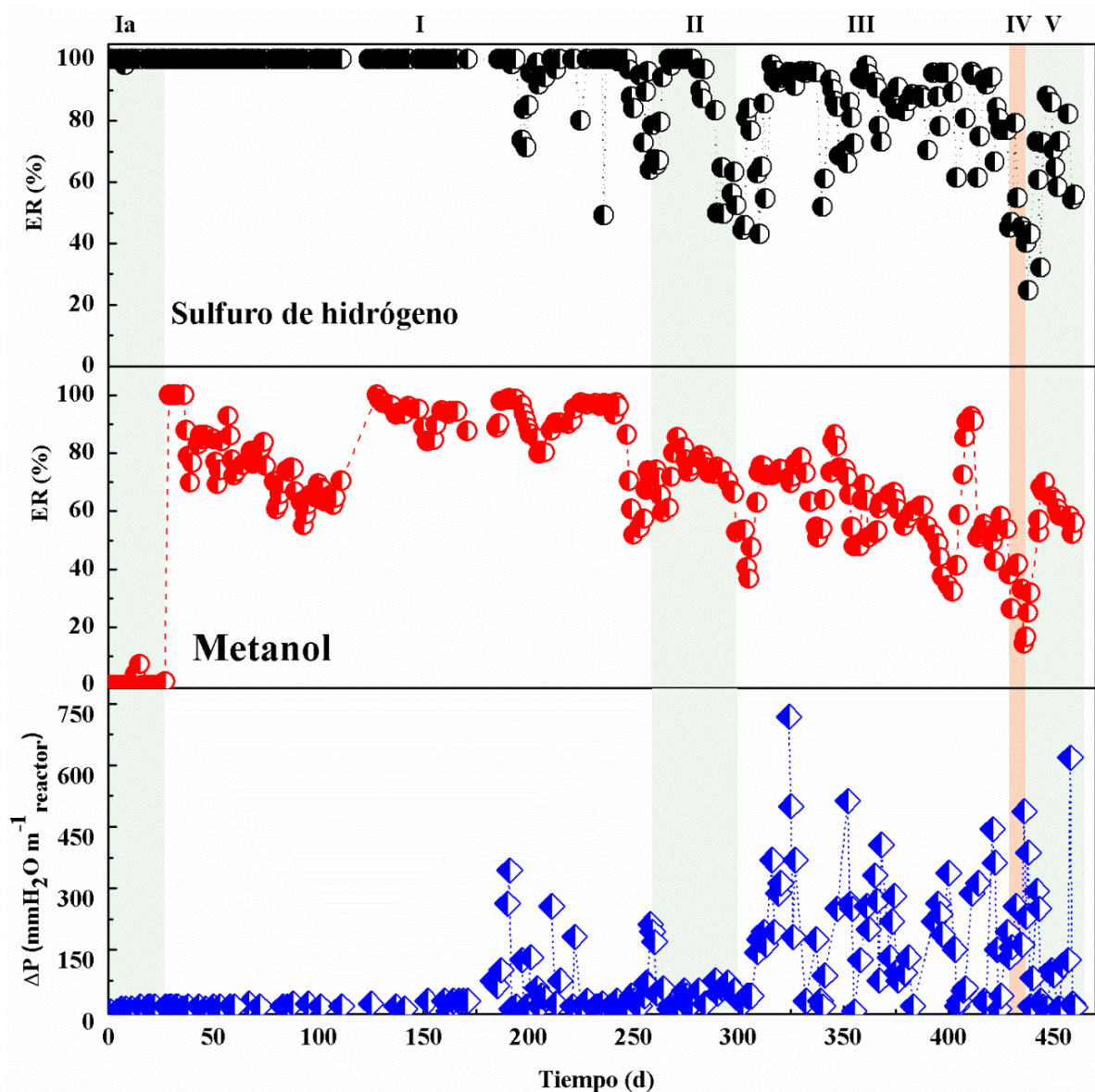


Figura 2.3. Perfil de remoción de MeOH y H₂S en el reactor, caída de presión en las diferentes etapas de operación.

El incremento de biomasa en el BLE se debió al rápido crecimiento de microorganismos heterotróficos debido al consumo de MeOH, los cuales tienen un rendimiento mayor de biomasa comparado con microorganismos autotróficos (Alcántara y col. 2004; Egli y Fiechter, 1981). Por lo tanto, el exceso de biomasa afectó la eliminación en primera instancia del H₂S y después la de MeOH. Un excesivo crecimiento de biomasa en conjunto con acumulación de azufre elemental fue reportado para el tratamiento de H₂S y MeOH (Jin y col. 2007), causando altas caídas de presión ($57 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$) y deficiencia en la

eliminación de H₂S disminuyendo hasta 15 %, comparado con el tratamiento de H₂S de forma individual. En nuestro estudio no se observó acumulación excesiva de azufre elemental en el lecho filtrante obteniendo concentraciones de sulfato cercanas a la estequiométrica. Los resultados son consistentes con los reportados por Alcántara y col. (2004) para bajas cargas de sulfuro alimentadas. El reacomodo del material de empaque en el día 236 de operación ayudó a que la caída de presión disminuyera (7 mmH₂O m⁻¹) observando un incremento en la ER (**Figura 2.3**, etapa I), esta estrategia permitió una reducción en la heterogeneidad del lecho filtrante, lo que había originado canalizaciones y zonas con exceso de biomasa, limitando el flujo tanto de la corriente de aire como de líquido, logrando recuperar así la actividad microbiana (Auria y col. 2000). Además, la formación de canales pudo provocar que zonas del lecho filtrante no mantuvieran la humedad adecuada, secando parcialmente la biopelícula y/o formando zonas muertas originando también una disminución en la actividad microbiana y por ende en el desempeño del sistema (Cercado y col. 2012; Torkian y col. 2003). La **Figura 2.4**, muestra la acumulación de una densa capa de biomasa en la parte superior del lecho filtrante provocando una notoria acumulación del medio de recirculación y obstruyendo aún más la circulación de la corriente de aire, afectando la eliminación tanto de H₂S como de MeOH llegando a valores de 50 % en la eficiencia de remoción.

Existen varios métodos reportados en la literatura que han demostrado efectividad para la remoción de biomasa, tales como, incremento en la velocidad de recirculación del líquido, retro-lavados con aire y agua, adición de soluciones químicas, entre otras, sin embargo, la aplicación de estos métodos puede no ser suficiente o tienen cortos periodos de efectividad (Flores-Valle y col. 2014; Wang y col. 2014), por lo que es necesario buscar otras estrategias.



Figura 2.4. Imágenes de la formación de una capa de biomasa y acumulación de líquido en el lecho filtrante, día 211 y 257 de operación.

2.5.3. Distribución de la biopelícula en el empaque

Debido a que la biomasa no crece homogéneamente en el material de empaque, la acumulación excesiva en una u otra zona puede llevar a la formación de canalizaciones, además, de obstruir los poros del material de empaque, provocando así un mayor gasto de energía y, por lo tanto, un incremento en los costos de operación. Para conocer la distribución de la biopelícula en el material de empaque, se realizaron tomas de imágenes del empaque con biopelícula en diferentes etapas de operación. Las imágenes tomadas mediante RMI muestran únicamente la biomasa contenida en cada cubo. La **Figura 2.5** muestra los diferentes aspectos del material de empaque. Se muestra que gran parte de los poros del empaque están cubiertos de biomasa, dificultado así el paso de la corriente de aire y del líquido en recirculación. La reconstrucción de imágenes mostró que la biomasa ocupó la mayor parte de la superficie del empaque. Adicionalmente se observó una reducción en diferentes lados, indicando que existió una compactación en el lecho filtrante, los cálculos indican que esta reducción fue alrededor del 20 % (**Figura 2.5B** y **Figura A1**) probablemente debido al peso contenido en los cubos superiores de cada sección del lecho. Otra causa pudo ser un efecto negativo en la resistencia del material de soporte causada por el ozono, lo que se discutirá más adelante. La estimación estadística de las imágenes obtenidas mediante RMI dio como resultado valores de ocupación del soporte alrededor del 85 %. La compactación fue observada en ambas secciones del BLE, reduciendo la altura en un valor cercano al 13 %, lo que también ayudó a incrementar los valores de caída de

presión en el sistema. El modelo matemático reportado por Arellano-García y col. (2015) muestra que con una ocupación del 32 % del material de empaque por la biomasa, la ER empieza a disminuir a pesar de tener una mayor área superficial, esto debido a que no toda la biomasa presente en el material de empaque tiene acceso al sustrato, limitando cinéticamente el sistema. Por otro lado, el modelo presentado también muestra como con un 80 % de ocupación por la biomasa, el TRLV y el área superficial disminuyen drásticamente a la par que lo hace la ER. La ocupación de la biomasa en el material de empaque en el presente estudio superó el 80 %, lo que explicaría el pobre desempeño del reactor en esta etapa de operación (Ryu y col. 2010).

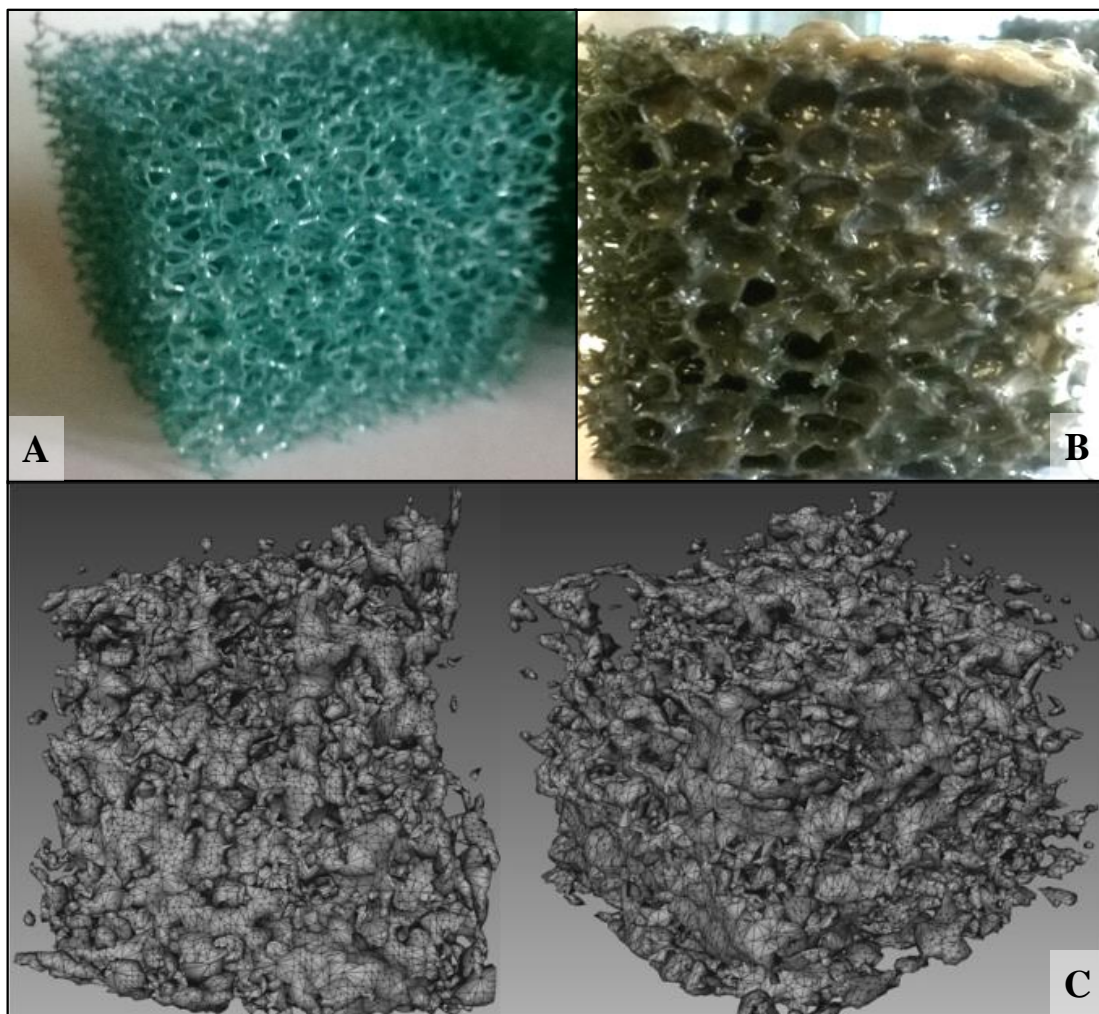


Figura 2.5. Cubo sin colonizar (A), cubo con biomasa (día 258 de operación) (B), imágenes de RMI obtenidas de la distribución de la biomasa en el material de empaque y la compactación del lecho y (C).

2.5.4. Efecto de la adición de oxidantes sobre el desempeño del sistema.

La acumulación de biomasa en exceso, después de 259 días de operación, provocó que el reactor alcanzara caídas de $344 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}_{\text{reactor}}$, esto se vio reflejado en una seria disminución en la eliminación de MeOH y H₂S, afectando en primera instancia la remoción de H₂S. Para revertir el efecto negativo de la acumulación de biomasa en exceso, en el día 260 se implementó la adición de ozono en fase gas al reactor. La carga de ozono aplicada fue de $150.2 \pm 16.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (**Figura 2.3, etapa II**), la implementación de esta estrategia permitió la recuperación del desempeño del sistema, alcanzando una CE_{max} de $587 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=81 %) y $15.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=97 %) para MeOH y H₂S, respectivamente. El crecimiento de biomasa no cesó al adicionar el ozono, indicando que en principio el sistema fue capaz de resistir la presencia del oxidante. La biomasa registrada durante esta etapa fue de $333 \text{ gX L}^{-1}_{\text{empaquete}}$ (**Figura 2.6**). En presencia de ozono la estabilidad en la ER para ambos compuestos se mantuvo por casi 30 días. Sin embargo, después de este tiempo se observó una disminución en la eliminación de los contaminantes tratados, posiblemente por un efecto negativo sobre la actividad microbiana debido a la exposición de ozono. Por esta razón el ozono fue suspendido y, como consecuencia se observó nuevamente una recuperación positiva en la eliminación de ambos compuestos.

El contenido de biomasa se controló durante el período de adición de O₃ el cual por la estructura de la biopelícula ataca en primer lugar a la estructura de los EPS, lo que induce a un desprendimiento de la biomasa, disminuyendo la caída de presión, mejorando la distribución del gas y el desempeño del reactor (Wang y col. 2009; Xi y col. 2016). El potencial oxidante del O₃ aumenta conforme disminuye el pH (pH<4), reaccionando principalmente con enlaces dobles y grupos aromáticos y ligeramente con hidratos de carbono (Adams y Gorg, 2002; Meng y col. 2002; Roncero y col. 2003). Esta selectividad del O₃ bajo condiciones ácidas explicaría la actividad presente en el sistema a pesar de las altas cargas de O₃ utilizadas. Los resultados son consistentes con estudios previos reportados por Xi y col. (2014) donde la caída de presión en el lecho permaneció por debajo de $5.7 \text{ mmH}_2\text{O m}_{\text{reactor}}^{-1}$ (velocidad superficial: 17.7 m h^{-1}) durante todo el período de funcionamiento con una carga de O₃ de 10.5 a $18.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en un biofiltro convencional.

Después de la suspensión de la alimentación de ozono, el reactor operó durante más de 100 días observando con el paso del tiempo una disminución en la eliminación de MeOH alrededor del día 370 de operación (**Figura 2.6, etapa III**). Para evaluar un posible efecto negativo de las altas concentraciones del MeOH hacia el sistema, se decidió disminuir la carga de entrada al sistema (día 395), esta estrategia mejoró de manera global el desempeño del reactor, alcanzando una ER de 92 % (CE de $293 \text{ g}_{\text{MeOH}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) pero sin mantenerse estable por un periodo prolongado. En el transcurso de la etapa tres de operación (**Figura 2.3**), el lecho filtrante fue extraído y pesado nuevamente en el día 373 y 423, la biomasa registrada fue $549 \text{ gX L}^{-1}_{\text{empaquetado}}$ y $607 \text{ gX L}^{-1}_{\text{empaquetado}}$, respectivamente (**Figura 2.6**).

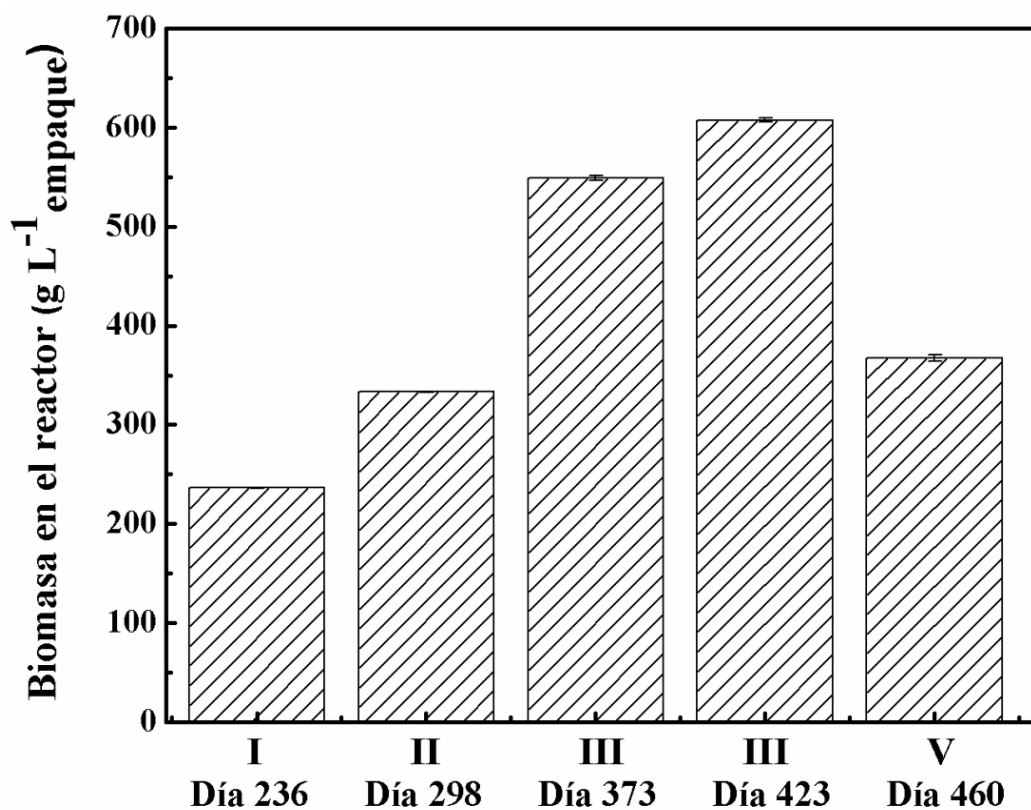


Figura 2.6. Biomasa contenida en el reactor en diferentes etapas de operación.

La caída de presión alcanzó un máximo de $344 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ antes de la primera adición de ozono, la cual disminuyó hasta un mínimo de $7 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ durante el tratamiento con este oxidante (la carga alimentada de MeOH en este periodo fue de $622 \pm 55.3 \text{ gm}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Una vez suspendido el ozono, la caída de presión se observó fluctuante alcanzando valores de

hasta $718 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ en el día 324 de operación donde nuevamente se observó una capa de biomasa sobre la cama del lecho filtrante obstruyendo el paso del líquido de recirculación y la corriente de aire (**Figura 2.7**). En la **Figura A2** se observa el perfil de los valores promedio de la caída de presión respecto a la cantidad de biomasa acumulada en cada etapa, se observa que a mayor cantidad de biomasa la caída de presión incremento alcanzando un valor promedio de $209 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ reactor



Figura 2.7. Imágenes de la formación de una capa de biomasa y acumulación de líquido en el lecho filtrante, día 317 de operación.

Debido al incremento en la acumulación de biomasa observada dentro de los 100 días después de la adición de ozono, se realizó una segunda adición de ozono al sistema, ésta se llevó a cabo durante siete días a partir del día 430 de operación. Esta segunda aplicación se realizó con una carga menor que la primera, es decir, $4.8 \pm 0.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, con el fin de reducir el impacto negativo observado sobre la actividad microbiana durante la primera adición de ozono y también para estudiar el efecto del ozono sobre la remoción de biomasa a bajas concentraciones en condiciones ácidas. Durante esta segunda adición, el sistema no mostró ninguna mejora continuando una reducción en la ER durante los subsecuentes días, llegando hasta una ER de 14 % para MeOH y 44 % de ER para H_2S . Sin embargo, a pesar de no mostrar un efecto positivo sobre el desempeño del reactor, con la segunda adición de O_3 se redujo ligeramente la variación en la caída de presión. Estos resultados poco favorables pueden explicarse por la baja carga de O_3 usada en esta etapa (**Figura 2.3, etapa IV**). Adicionalmente, el cuantioso crecimiento de la biomasa también contribuyó a limitar

la difusión del O_3 a través de la biopelícula, reduciendo así su potencial de oxidación sobre toda la biomasa (Mendoza y col. 2004).

Como una alternativa al uso de ozono para la reducción de exceso de biomasa en el sistema, se implementó la adición de peróxido de hidrógeno en el medio de recirculación del reactor inmediatamente después de suspender la alimentación de O_3 . Esta estrategia permitió una rápida recuperación en el desempeño del sistema obteniendo una ER de 88 % y 70 % para H_2S y MeOH, respectivamente. Adicionalmente se observó una reducción alrededor del 40 % en el contenido de biomasa (**Figura 2.6**) y una disminución en la caída de presión alrededor del 98 % (de $487 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$ a $7 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$). Un repentino incremento en la caída de presión fue observado alrededor del final de la operación ($619 \text{ mmH}_2\text{O m}^{-1}$), cuando se adicionó al sistema una concentración de 5 mg L^{-1} de H_2O_2 , adición que provocó un desprendimiento notorio de biomasa, quedándose en el medio de recirculación y obstruyendo los poros que se encontraban libres al paso de líquido y aire (**Figura 2.3, etapa V**). De manera interesante, la adición de H_2O_2 provocó la formación de burbujas lo que originó que la biomasa permaneciera flotando en el reservorio del medio de recirculación, lo que indujo el incremento repentino de la caída de presión. La obstrucción de los poros en presencia de H_2O_2 se explica por el arrastre de la biomasa, un fenómeno no observado en presencia de ozono donde la biomasa sedimentó. En contraste con el ozono, el H_2O_2 si puede oxidar algunos polisacáridos a pH ácidos (Christensen y col. 1990; Miller, 1986) permitiendo un fuerte desprendimiento de la biomasa, disminuyendo también la caída de presión y mejorando el desempeño del sistema. La efectividad del H_2O_2 puede atribuirse al efecto sinérgico que presenta en presencia de O_3 (Tachikawa y Yamanaka, 2014) sin descartar las interacciones del H_2O_2 con partículas de Fe^{2+} que pudieron estar presentes en el medio mineral produciendo radicales $\cdot OH$, los cuales reaccionan con la biopelícula y favorecen el desprendimiento de biomasa (Gosselin y col. 2013). Por otro lado, aunque no se estudió en el presente trabajo, el incremento de la concentración de oxígeno debido a la descomposición del H_2O_2 también pudo favorecer el incremento de la actividad microbiana en el reactor y contribuir en la mejora del desempeño del reactor (Host y col. 1985, Iwase y col. 2013)

El desprendimiento de la biomasa por acción de los oxidantes provocó un incremento en la cantidad de sólidos contenidos en el medio de recirculación. Los resultados mostraron un

notable incremento en la cantidad de estas sustancias en presencia tanto de ozono como de H_2O_2 (**Figura 2.8**). Respecto del tipo de oxidante y cantidad alimentada, se encontró que, durante la primera adición de ozono, los valores de SST incrementaron alrededor de un 80 % (de 3.84 g L^{-1} a 7 g L^{-1}) y un 40 % (de 3.75 g L^{-1} a 5.5 g L^{-1}) durante la segunda adición, el incremento más notorio fue durante la adición de H_2O_2 , donde el contenido de estas sustancias se incrementó 170% comparado con las concentraciones presentes antes de la adición de ozono al sistema (3.75 g L^{-1} sin O_3 y 10.5 g L^{-1} en presencia de H_2O_2). Los componentes de la biomasa como proteínas y carbohidratos también incrementaron durante la adición de oxidantes (**Figura 2.9**). Es interesante que el incremento de estos componentes vario conforme el tipo de oxidante, presentando valores mayores de proteína durante la alimentación de H_2O_2 . Estudios previos han reportado una disminución en el espesor de la biopelícula aunado a una disminución en el contenido de proteínas y un incremento en la actividad microbiana en presencia de ozono a bajas concentraciones (García-Pérez y col. 2013; Wang y col. 2009). En este estudio, la adición de oxidantes pudo favorecer la despolimerización de la biomasa, en especial los polisacáridos secretados por las células, trasladando este contenido al medio de recirculación, lo cual explica las variaciones en el contenido de sustancias como SST, proteínas y carbohidratos durante la etapa de adición de oxidantes (Duan y kasper 2011; Meng y col. 2016).

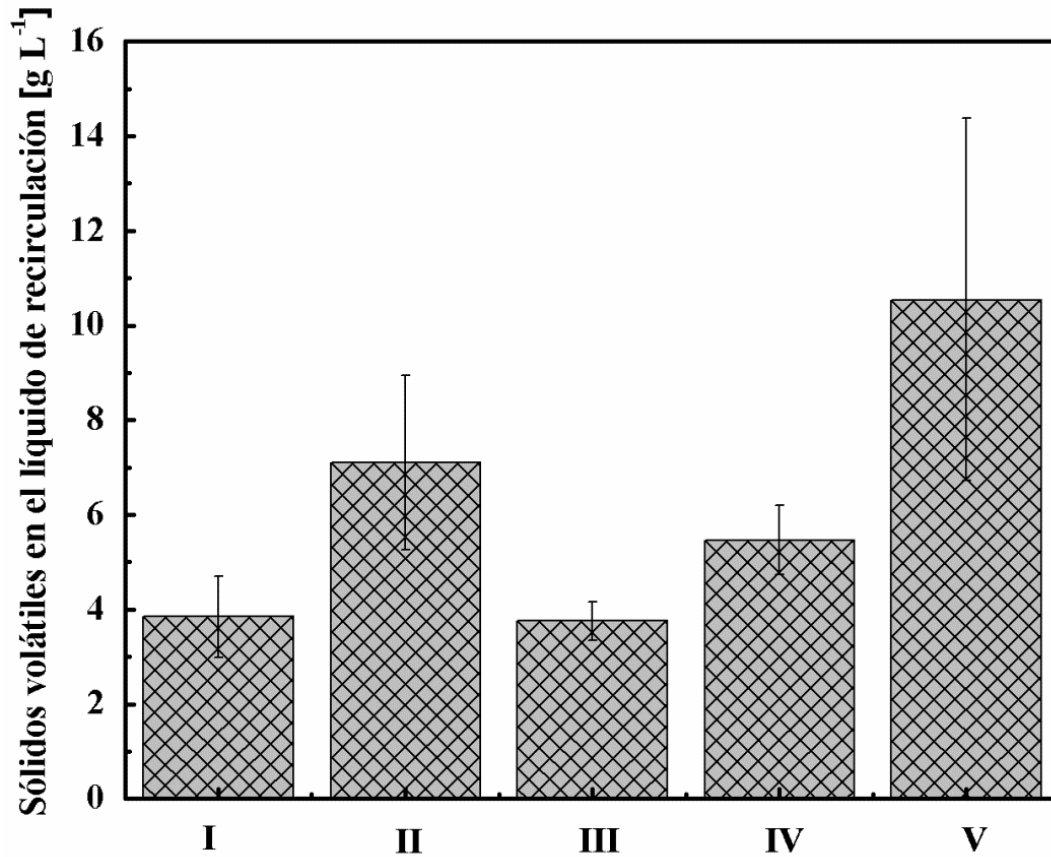


Figura 2.8. Contenido de sólidos en el medio de recirculación en las diversas etapas de operación del BLE.

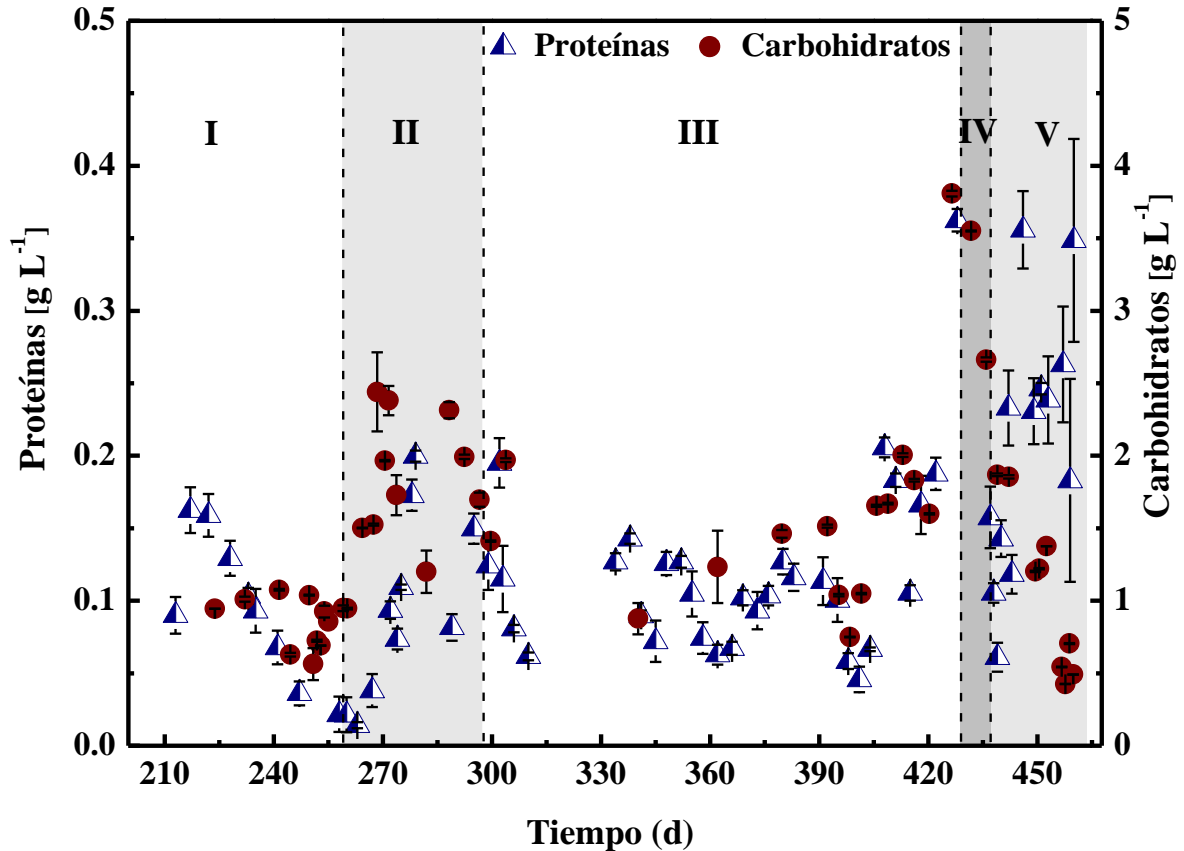


Figura 2.9. Contenido de proteínas y carbohidratos en la fase líquida en las diferentes etapas de operación del reactor.

2.5.5. Efecto del ozono en la actividad microbiana.

Con el objetivo de conocer el efecto de la alimentación de ozono sobre la población microbiana, se evaluó la actividad mediante el consumo de oxígeno. Los resultados mostraron que antes de la primera adición de ozono, la respiración endógena del consorcio microbiano fue de $61 \pm 8 \mu\text{molO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ min}^{-1}$ y $35.8 \pm 2.4 \mu\text{molO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ min}^{-1}$ en presencia de ozono. La **Figura 2.10** muestra los valores de actividad microbiana al restar la respiración endógena de cada análisis. Estos valores indicaron que la presencia de ozono redujo la actividad microbiana aproximadamente al 50%, teniendo un valor máximo de consumo de oxígeno de $97 \mu\text{molO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ min}^{-1}$ antes de ozono y $43 \mu\text{molO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ min}^{-1}$ en presencia de ozono. El valor de K_s obtenido al ajustar los datos al modelo de Monod fue de 67 mmol L^{-1} sin exposición de ozono, la cual se redujo drásticamente con adición de ozono.

Por otra parte, la respiración endógena redujo alrededor de 40 % cuando el ozono fue alimentado al sistema, lo que significó una reducción en la viabilidad celular, viéndose reflejado en la actividad microbiana y desempeño del reactor. Esta alteración en la actividad metabólica reflejo un cambio en la estructura de la población que pudo ser causada por la sensibilidad de las especies presentes en el lecho filtrante (Wei y col. 2013). Un efecto negativo de la adición de ozono fue reportado también por Xi y col. (2014), donde se observó una disminución en la remoción de tolueno, la cual fue atribuida a un decremento de la actividad microbiana de microorganismos susceptibles a la presencia de ozono, consistente con lo encontrado en el presente estudio.

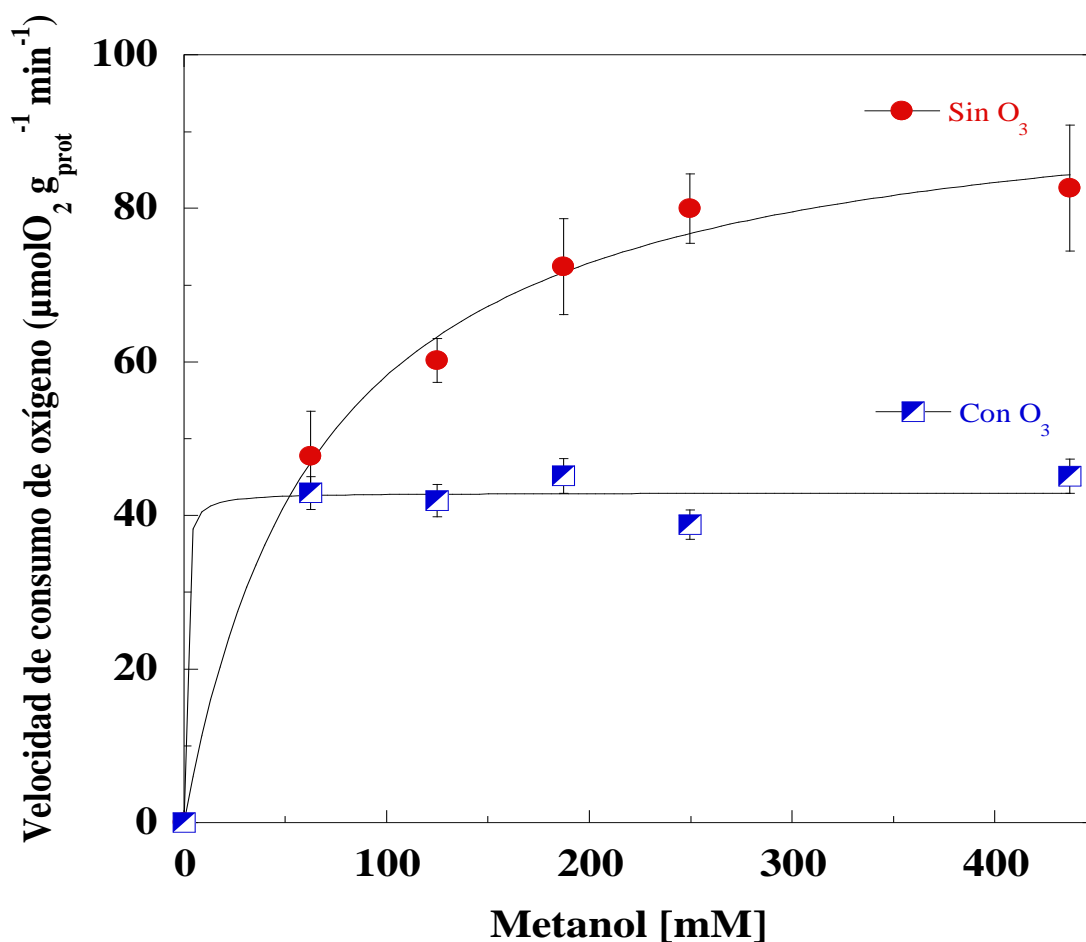


Figura 2.10. Consumo de oxígeno de la población microbiana en el BLE a diferentes concentraciones de MeOH antes y durante la alimentación de ozono.

2.5.6. Efecto del ozono sobre el material de empaque.

Para lograr el buen funcionamiento de un sistema de biofiltración los materiales de empaque deben soportar las condiciones de tratamiento de las corrientes gaseosas. Aunque en el caso de la biofiltración se han estudiado una gran variedad de materiales de empaque (Filho y col. 2010; Prenafeta-Boldú y col. 2008), no existen estudios reportados acerca de la susceptibilidad del soporte en la adición de oxidantes. En este estudio una consecuencia no esperada de la adición de ozono fue un daño a la estructura del soporte que se encontraba colocado en la sección inferior del BLE (**Figura 2.11**) es decir, la sección con mayor exposición al ozono. Pequeñas partículas del material se observaron en el medio de recirculación cuando se realizaron los cambios de medio mineral durante la adición de ozono, lo que indicó una degradación del material. La espuma de poliuretano contiene dobles enlaces en su estructura química, lo cual lo hace susceptible al ataque por ozono debido a la alta reactividad que presenta la molécula de ozono a los compuestos insaturados (Adams y Gorg, 2002). Por otro lado también ha sido reportado que el ozono puede cambiar las propiedades químicas y físicas de la PUF incrementando su porosidad y reduciendo su hidrofobicidad (Bertoldi y col. 2015), lo que explicaría el deterioro del material de empaque en presencia de altas concentraciones de O_3 .

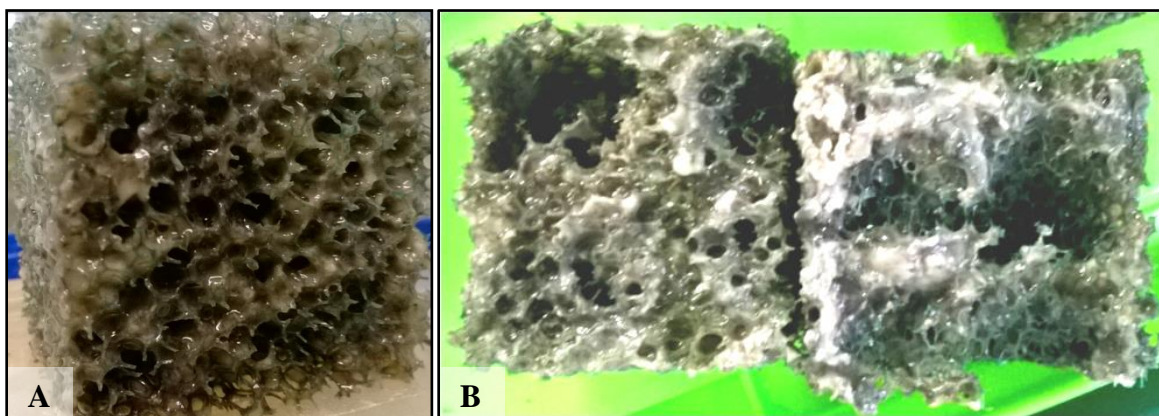


Figura 2.11. Imágenes del material de empaque antes (A) y después (B) de la primera exposición de ozono.

2.5.7. Análisis de la comunidad microbiana y el efecto de la adición de ozono.

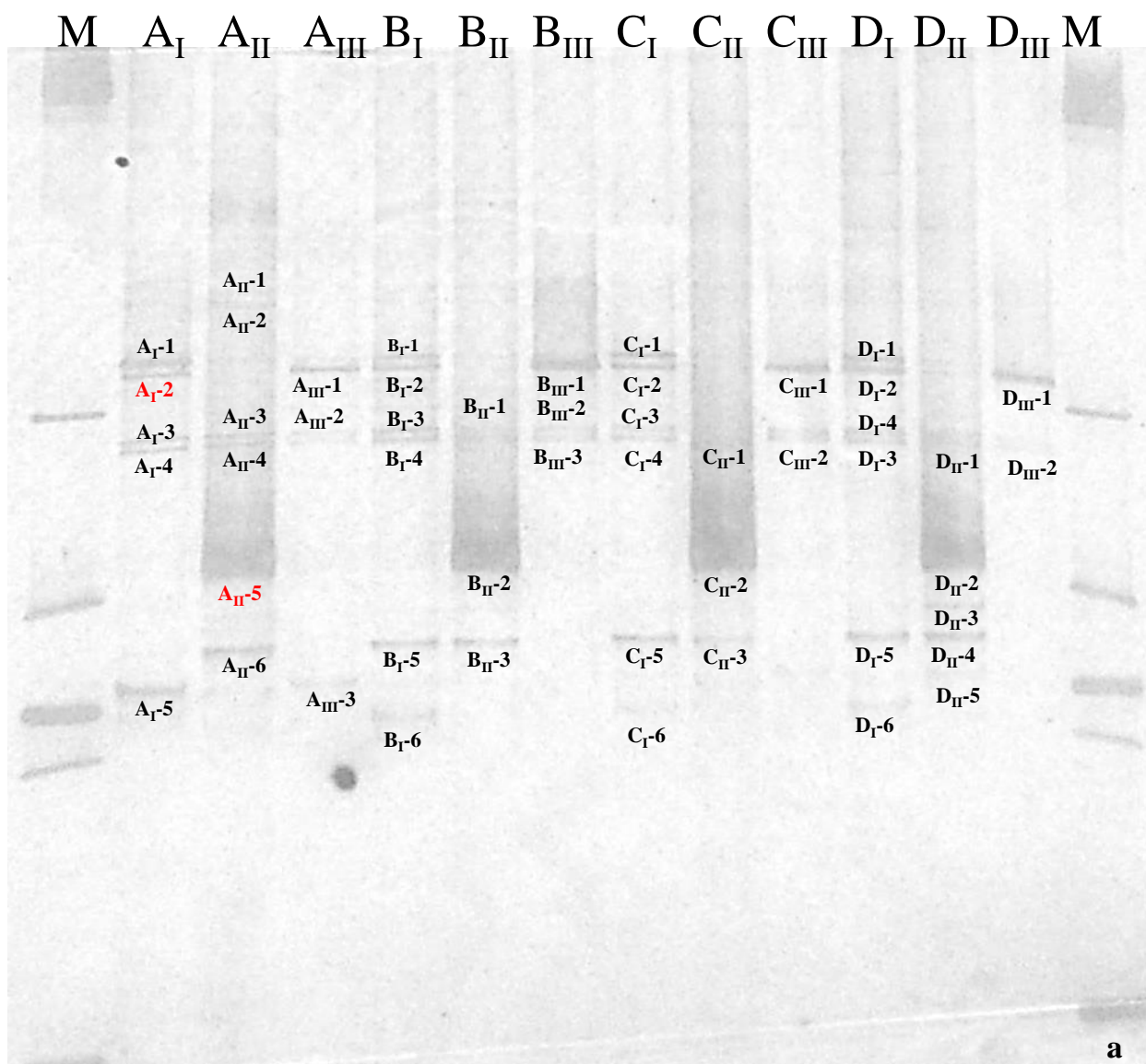
Para conocer el cambio de poblaciones microbianas en el reactor durante la adición de altas concentraciones de ozono, se realizaron análisis de biología molecular para las poblaciones de bacterias y hongos. Las imágenes de los geles de DGGE muestran (**Figura 2.12**) una disminución en el número de bandas en los carriles correspondientes a la sección inferior del reactor (D_{II} and D_{III}) después de la adición de ozono; estos resultados se relacionan con el efecto negativo que tuvo el ozono en el sistema sobre la actividad microbiana y con el daño estructural del material de empaque. Es interesante destacar que ambas poblaciones, (bacterias y hongos), presentaron la misma susceptibilidad al ozono.

Respecto a la estratificación del biofiltro para el gel de hongos, solo cuatro bandas fueron distintas (A_I , B_I , C_I y D_I) encontrándose únicamente en la sección superior del reactor (**Figura 2.12b**), indicando que presentaron susceptibilidad a las condiciones particulares que se mantenían en cada sección del biofiltro y también a la presencia de ozono, ya que después de la adición, la banda no se observó nuevamente. La secuenciación de la banda A_I-1 de este primer grupo de bandas arrojó una alta similitud con el hongo *Ophiostoma* sp. (**Tabla 2.3**). De manera general la imagen del gel de DGGE para hongos mostró un mayor número e intensidad de bandas comparado con el de bacterias, sin embargo, también se vieron disminuidas una vez que el tratamiento con ozono se implementó.

Respecto al gel de bacterias, la adición de ozono provocó un cambio notorio en la población microbiana. Nuevas bandas fueron registradas en los carriles de las muestras tomadas durante la presencia de ozono (**Figura 2.12a: A_{II} , B_{II} , C_{II} and D_{II}**), las cuales desaparecieron una vez que el oxidante se dejó de alimentar (Bandas A_{II-5} , A_{II-6} , B_{II-2} , B_{II-3} , C_{II-2} , C_{II-3} , D_{II-2} , D_{II-3} , D_{II-4} and D_{II-5}). La secuenciación de las bandas seleccionadas arrojó que una banda de alta intensidad (A_{II-5}) tuvo una alta similitud con *Acidiphilium* sp., y su aparición se vio favorecida por la presencia de ozono, ya que solamente prevaleció durante esta etapa indicando que este microorganismo presenta una alta tolerancia al ozono y posiblemente a algunos compuestos generados en el sistema con ozono (Wei y col. 2013). Se ha reportado que algunas cepas de estos microorganismos son capaces de oxidar el azufre elemental a sulfato, compuesto que se forma de la oxidación de H_2S , y también de

consumir una alta variedad de compuestos orgánicos como diferentes alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos (Arellano-García y col. 2015; Zhang y col. 2013).

Después del tratamiento con ozono, una banda (A_{III}-1, B_{III}-1, C_{III}-1, D_{III}-1), la cual se encontró también antes de la adición de ozono (A_I-2, B_I-2, C_I-2, D_I-2), se enriqueció. Esta banda correspondía en un 98% a *Acidithiobacillus* sp. Dg-E11 (**Tabla 2.3**), otro análisis del Blast también indicó que la secuencia de la misma banda tenía una afiliación muy cercana a la especie *A. thiooxidans*. El enriquecimiento de la banda indicó que las condiciones en el reactor cambiaron y que favorecieron a unos microorganismos respecto a otros que estuvieron presentes antes de la adición de ozono.



M A_I A_{II} A_{III} B_I B_{II} B_{III} M C_I C_{II} C_{III} D_I D_{II} D_{III} M

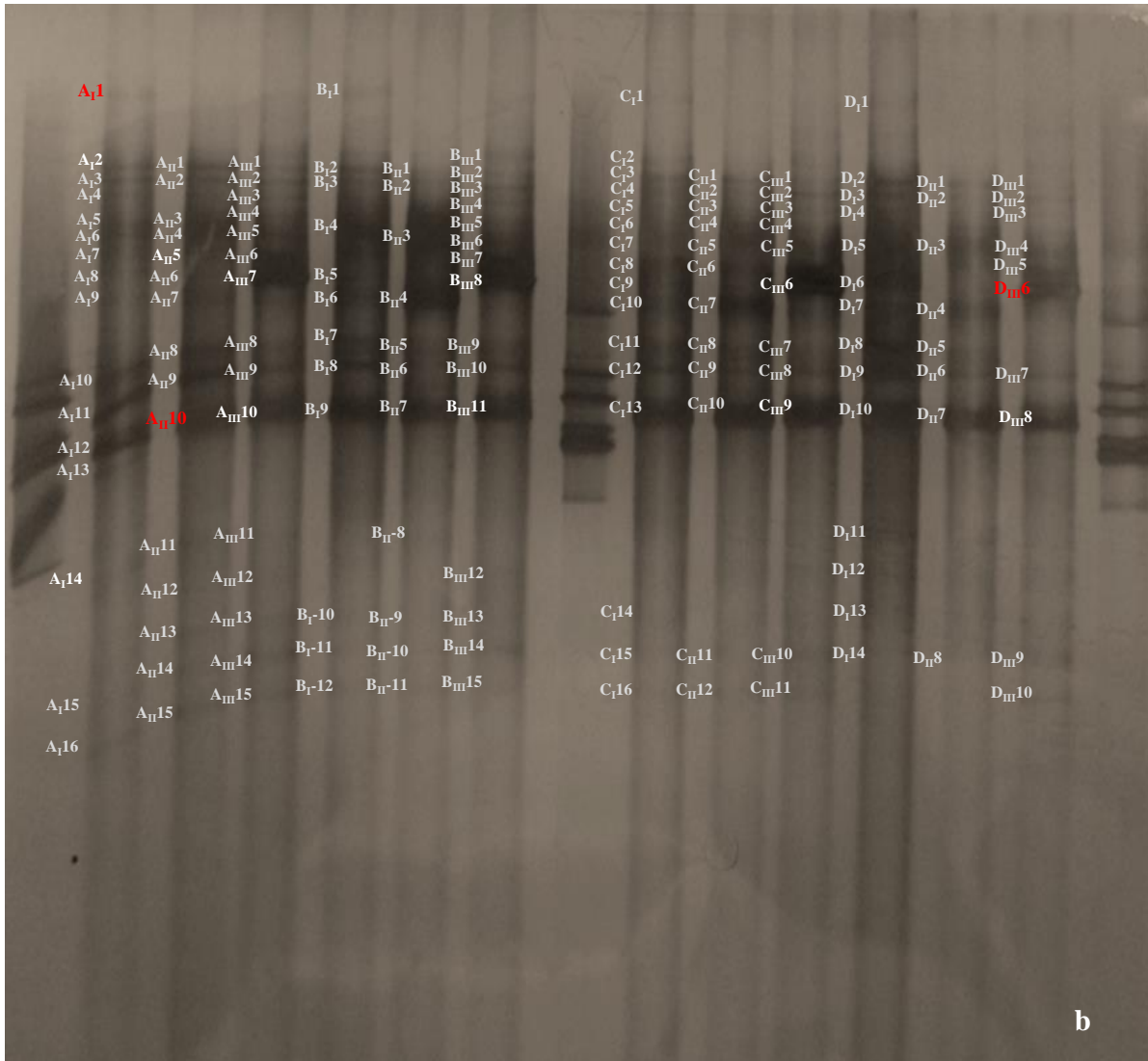


Figura 2.12. Perfiles de PCR-DDGE de las comunidades microbianas para bacterias (a) y hongos (b). Las letras A, B, C Y D indican la sección del biofiltro (**Figura 2.1**) donde se tomó cada muestra para su análisis; los números romanos I, II y III indican el periodo cuando se tomó la muestra, es decir, antes, durante o después de la adición de ozono. M indica el carril del marcador molecular.

El gel de hongos mostró que después del tratamiento con ozono, dos bandas fueron más intensas (**A_{III}-7**, **B_{III}-8**, **C_{III}-6**, **D_{III}-6** y **A_{III}-10**, **B_{III}-11**, **C_{III}-9**, **D_{III}-8**), lo que indicó que al igual que con la población de las bacterias, ciertas especies de hongos también se vieron favorecidas con las condiciones que persistieron en el reactor después del tratamiento con ozono. La secuenciación de las bandas seleccionadas del gel de hongos indicó que las bandas **D_{III}-6**, **A_{II}-10** y **A_I-14** presentaron un alto porcentaje de similitud con un hongo no

cultivable denominado *Pezizomycotina* **Tabla 2.3 y Figura 2.12b**). El efecto de la adición de oxidantes como el ozono fue más evidente a través de los diferentes periodos de operación que sobre el perfil del lecho filtrante. Las bandas de hongos secuenciadas fueron todas relacionadas con *Pezizomycotina*, a subfilo de *Ascomycota*. Análisis filogenéticos comparativos muestran que los genes que utilizan MeOH son conservados en varios linajes de *Pezizomycotina*, indicando su potencial para consumir MeOH como fuente de carbono y energía (Ravin y col. 2013), estos microorganismos pudieron contribuir al consumo de este sustrato en el reactor. Por otra parte, *Ophiostoma* sp., que aparentemente fue eliminada después de la adición de ozono, también es un hongo que ha sido reportado en sistemas de biofiltración para la degradación de mezclas de contaminantes como MeOH, α -pineno y H_2S en corrientes de aire (López y col. 2013).

El alto número de bandas presentes en el gel de hongos comparados con el de bacterias puede explicarse de la siguiente manera: la biomasa de hongos es más abundante en el BLE debido al consumo de MeOH, el cual es fácilmente consumido por los microorganismos heterótrofos y, por lo tanto, su crecimiento es más rápido comparado con el crecimiento de microorganismos autótrofos que consumen H_2S . Así, el consumo de MeOH por la población de hongos promovió la formación de una densa biopelícula. Además, el rápido crecimiento de los microorganismos consumidores de MeOH pudo limitar el crecimiento de los microorganismos autótrofos, lo que explicaría el bajo número de bandas para bacterias en cada una de las etapas (Zhang y col. 2006). Por otro lado, la resistencia de los hongos a las condiciones con ozono y la acidez presente en el sistema ayudaron preservar su abundancia, adicionalmente el material soluble que se desprendió de la biomasa durante la adición de ozono también pudo promover el crecimiento de otros microorganismos latentes en el lecho filtrante (Dong y col. 2105; Mara y Horan, 2003).

Tabla 2.3. Bandas secuenciadas del análisis de DGGE-PCR para bacterias y hongos. * Los nombres de cada banda están relacionadas con los códigos asignados en los diferentes carriles de las imágenes de los geles de la **Figura 2.12** y se señalan en rojo.

Banda*	Número de acceso	Número de acceso de GenBank más cercano	Similitud (%)	Afiliación
Hongo				
A_I1	KX097001	<i>Ophiostoma</i> sp. LLC 18s ribosomal RNA gene. KM652632	93	<i>Dikarya</i> ; <i>Ascomycota</i> ; <i>Pezizomycotina</i> ; <i>Sordariomycetes</i> ; <i>Sordariomycetidae</i> ; <i>Ophiostomatales</i> ; <i>Ophiostomataceae</i> ;
D_{III}6	KX097002	Uncultured eukaryote gene for 18S rRNA, partial sequence clone: AOan_H_2012Dec_49 AB901584.	94	
A_{II}10	KX097003	Uncultured fungus isolate DGGE gel band 15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence JQ007331.	97	
Bacteria				
A_I2	KX097005	<i>Acidithiobacillus</i> sp. Dg-E11 LN864666	98	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Acidithiobacillia</i> ; <i>Acidithiobacillales</i> ; <i>Acidithiobacillaceae</i>
A_{II}5	KX097004	<i>Acidiphilium</i> sp. BER EU711075	98	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodospirillales</i> ; <i>Acetobacteraceae</i>

2.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se estudió el efecto de la biomasa en exceso en el desempeño de un biofiltro de lecho escurrido para el tratamiento de H_2S y MeOH . Se encontró que la falta de control de pH en el sistema no favoreció la eliminación de MeOH durante los primeros días de operación, siendo necesario reinocular e implementar un control de pH en el sistema. Otro factor negativo fue el exceso de biomasa en el lecho filtrante el cual provocó notorias caídas en la eliminación de MeOH y H_2S , siendo la remoción de H_2S la que mostró una más rápida afectación. El reacomodo del material filtrante como estrategia para disminuir la caída de presión provocada por el excesivo crecimiento microbiano resultó efectiva, sin embargo, solo fue por un corto periodo de tiempo.

La primera adición de ozono ($150.2 \pm 16.7 \text{ gm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) eliminó parcialmente la biomasa del sistema trasladándola a la fase líquida, la cual mostró una mayor cantidad de SST cuando éste estuvo presente, además, de ayudar a recuperar rápidamente la capacidad de eliminación de ambos compuestos tratados. Lo anterior demostró la efectividad del ozono en el control y/o prevención de una alta cantidad de biomasa en condiciones ácidas y con mezclas de contaminantes que presentan diferentes propiedades químicas como el H_2S y MeOH . Sin embargo, aún hay que desarrollar mejoras para lograr mantener un alto desempeño del sistema por periodos más largos que los reportados en este estudio. La alteración de la población microbiana provocada por la alimentación de ozono puede dar origen a estudios interesantes para la selección de microorganismos capaces de subsistir en condiciones extremas que, además, sean capaces de eliminar compuestos de interés como los aquí tratados.

Si bien la adición de bajas cargas de ozono ($4.8 \pm 0.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) no mostró la efectividad esperada, también ayudó a eliminar la biomasa en exceso, aunque en menor cantidad comparada con la primera carga alimentada. Por otra parte, la adición de bajas concentraciones de H_2O_2 mostró también ser efectiva en la remoción de biomasa, alcanzando en esta etapa, la mayor cantidad de biomasa en el medio líquido y logrando también una rápida recuperación del sistema, haciéndolo prometedor para su aplicación en el control de biomasa en sistemas de biofiltración. Aunque desde el punto de vista práctico, la adición de oxidantes como el ozono podría incrementar los costos de operación de dichos

sistema, su generación y aplicación en diversas áreas ha generado una disminución de sus costos de producción. Además, de acuerdo con los resultados también, la adición de H_2O_2 podría ser una alternativa prometedora.

2.7. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda, (i) estudiar concentraciones intermedias de ozono en sistemas de biofiltración de manera que se pueda mantener por un largo periodo de operación el sistema, alcanzando altas capacidades de eliminación de los contaminantes. (ii) Realizar los estudios correspondientes, de forma que la adición continua de ozono (concentración adecuada) mantenga la actividad en el sistema. (iii) Estudiar el efecto de los oxidantes aquí estudiados, en diversos materiales de empaque que han mostrado ser efectivos en sistemas de biofiltración a diferentes concentraciones de oxidantes con el objetivo de conocer el efecto que estos compuestos pudieran tener sobre la estructura física y química de cada material.

CAPITULO 3. ELIMINACIÓN DE H₂S, EL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES DE OZONO EN UN BIOFILTRO DE LECHO ESCURRIDO.

3.1. INTRODUCCIÓN

El H₂S es un contaminante corrosivo, de olor desagradable, altamente tóxico y ampliamente liberado al ambiente por muchas industrias. La emisión significativa de H₂S y otros contaminantes, incluidos otros compuestos azufrados y compuestos orgánicos volátiles, está asociada a la producción de alimentos, fabricación de pulpa y papel y al tratamiento de aguas residuales y rellenos sanitarios (Tsang y col. 2015). Aunque existen diversas tecnologías para su tratamiento, la biofiltración ha mostrado ser efectiva para la remoción de este compuesto, ya sea de forma individual o en conjunto con COVs (Ding y col. 2006; Rene y col. 2010; Sologar y col. 2003).

Entre las configuraciones utilizadas en el sistema de biofiltración, los biofiltros de lecho escurrido son uno de los más populares y ampliamente utilizados para eliminar H₂S, ya sea individualmente o junto con otros compuestos. La configuración del BLE permite la eliminación de metabolitos gracias a la fase líquida en recirculación, lo que ayuda a mantener una óptima actividad microbiana (Deshusses y Gabriel 2005; Giri y col. 2014; Jin y col. 2005b; Zhou y col. 2016).

Una amplia variedad de microorganismos son capaces de eliminar H₂S en un amplio intervalo de concentración y pH (González y col. 2008; Tu y col. 2016); en este sentido, la eliminación de H₂S a condiciones ácidas representa una ventaja operativa y económica, evitando un gasto adicional al no requerir un control de pH. Sin embargo, algunos autores reportan efectos negativos en la remoción de H₂S a pH<2.5 (Mannucci y col. 2012) por lo que la mayoría de los estudios se enfocan en la remoción de H₂S a pHs mayores a 2. No obstante, se han reportado altas eficiencias de eliminación a pH<1, además, de una alta tolerancia a la concentración de sulfatos originado de la oxidación de H₂S, pero su estudio a un es escaso (Jaber y col. 2016; Lee y col. 2006).

Durante la oxidación del H₂S que se produce por microorganismos autótrofos, lo que ocurre generalmente a un pH ácido, la fuente de carbono proviene del CO₂ contenido en la corriente de aire (Jin y col. 2005a; Mudliar y col. 2010). Sin embargo, existe muy poca

información acerca del consumo de CO₂ en los sistemas de biofiltración y el efecto de las concentraciones de H₂S alimentadas sobre la fijación de CO₂ por parte de los microorganismos. Estudios muestran que un incremento en la concentración del donador de electrones, en este caso el H₂S, puede incrementar la cantidad de CO₂ fijado o consumido por microorganismos autótrofos no fotosintéticos como las bacterias sulfooxidantes (Hu y col. 2010).

Por otro lado, el funcionamiento de los BLEs puede limitarse por la obstrucción debido al alto crecimiento microbiano y la acumulación de azufre por el tratamiento de mezclas simples o complejas de COVs y H₂S (Jin y col. 2007; Sologar y col. 2003; Zhang y col. 2006). Recientemente, se ha propuesto el uso de oxidantes para eliminar el exceso de biomasa en los BLE mediante oxidación con O₃. En este sentido, la adición de O₃ ha sido eficaz para el tratamiento de COVs individuales en condiciones de pH neutro (García-Pérez y col. 2013; Wang y col. 2009; Xi y col. 2014). Sin embargo, el uso de estos oxidantes en el capítulo anterior mostró que también puede ser implementado bajo condiciones ácidas, donde también se tiene la problemática de la acumulación de exceso de biomasa. En consecuencia, esto podría afectar la actividad microbiana de las bacterias sulfooxidantes, ya que la cantidad de estas en un sistema donde se tratan compuestos diversos es limitada debido a su baja tasa de crecimiento (Alcántara y col. 2004). Lo que se puede traducir en un deterioro global de los sistemas de biofiltración. Por lo anterior, en esta etapa de investigación se evaluó el desempeño de un BLE para el tratamiento del H₂S, así como el consumo de CO₂ en toda la etapa de operación. De igual forma se estudió el desempeño global del sistema a la exposición de bajas concentraciones de O₃ con el objetivo de evaluar de forma individual el efecto del ozono sobre la eliminación de H₂S en condiciones ácidas, también se evaluó el desempeño del sistema haciendo un comparativo con el reactor R1 (MeOH-H₂S), donde la biomasa fue abundante.

3.2. OBJETIVOS

- A. Evaluar la eliminación de H₂S, asimilación de CO₂ y el efecto de la adición de bajas concentraciones de ozono bajo condiciones ácidas en un biofiltro de lecho escurrido.
- B. Evaluar la actividad microbiana de la biomasa del reactor con diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio y MeOH para estudiar el efecto de altas concentraciones de ambos compuestos en la actividad biológica del reactor.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Inóculo y medio mineral

El inóculo y la composición del medio mineral están descritos en la sección 1.6.3 y 1.6.4. El biofiltro para la eliminación de H₂S se construyó con las mismas características descritas en la sección 1.6.5. Una corriente de aire se mezcló con otra que contenía H₂S y se introdujo en la sección inferior del sistema con flujo a contracorriente con la recirculación del líquido (**Figura 3.1**). La alimentación del H₂S se realizó con ayuda de una bolsa tedlar realizando las diluciones correspondientes con aire para la alimentación de H₂S al reactor. Los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente y la caída de presión en el sistema se realizó conectando un tubo en U a la entrada y salida del reactor. Las mediciones de caída de presión se expresaron en mmH₂O m_{reactor}⁻¹.

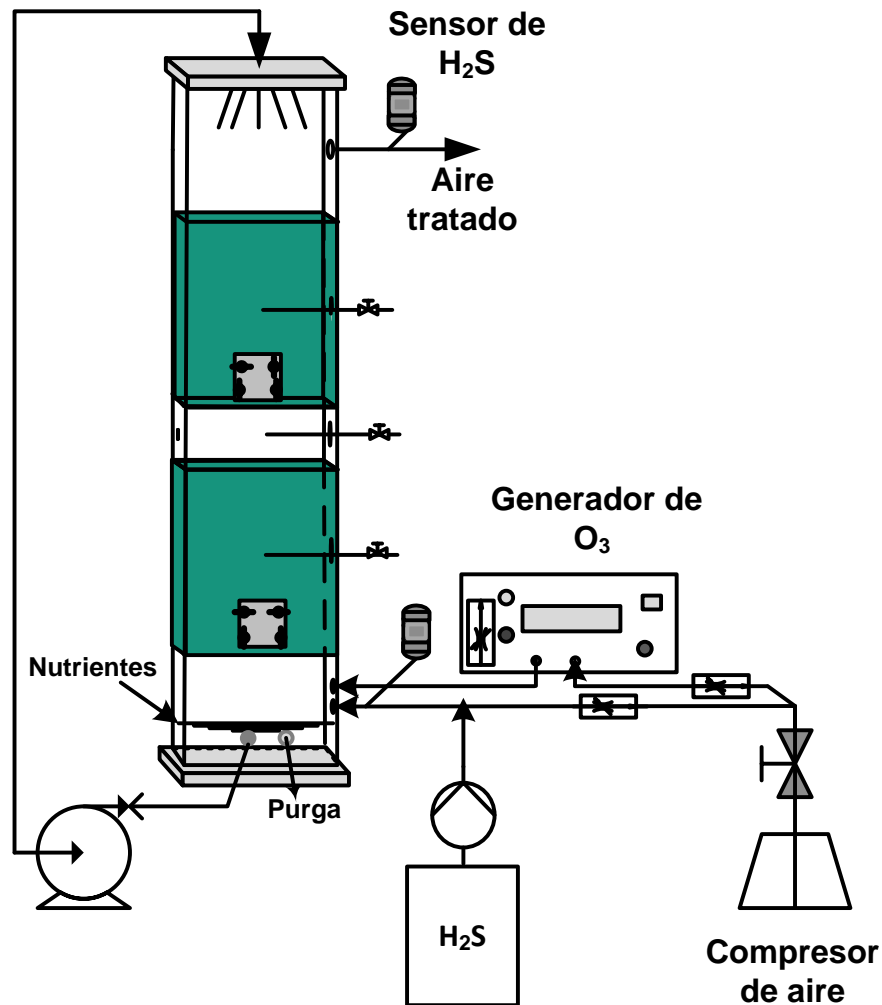


Figura 3.1. Esquema de experimentación.

3.3.2. Mediciones de la fase gas.

La determinación de CO_2 , H_2S y O_3 se realizó de acuerdo con los métodos descritos en las secciones 2.4.4 del capítulo 2.

3.3.3. Determinación de sustancias en la fase líquida

Carbohidratos

Los carbohidratos y proteínas en la fase líquida del reactor fueron determinados de acuerdo con lo descrito en la sección 2.4.6 del capítulo 2.

3.3.4. Determinación de la actividad microbiana

La determinación de la actividad microbiana se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 2.3.7 del capítulo 2 con diferentes concentraciones de tiosulfato de sodio y MeOH, el estudio de la actividad microbiana se llevó a cabo a 25 °C y un pH de 2.5.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Arranque y operación.

A la par que se llevó a cabo la operación del reactor (R1) para el tratamiento de H₂S y MeOH, también se puso en operación un BLE adicional para la eliminación H₂S (denominado en adelante como R2), para investigar las diferencias en la eliminación de H₂S de forma individual y en mezcla con MeOH. La operación del reactor R2 se inició con una carga de $4.2 \pm 0.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, muy similar a la alimentada en R1 ($4.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0.2$) la cual se eliminó totalmente desde el primer día de operación. A partir de obtener ER > 99.9 % y un estado estable, la carga de H₂S se incrementó gradualmente hasta $9.1 \pm 0.4 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y 8.8 ± 0.8 para R1 y R2, respectivamente, después del día 40 de operación. Sin embargo, en R2, se observó un decremento en la ER de 100 a 82 % entre el día 54 al 58. Una concentración de sulfato de 6.1 ± 2.8 y $11.2 \pm 1.8 \text{ g L}^{-1}$ se registró para R1 y R2, respectivamente. La alta concentración de sulfato y el incremento en la carga de H₂S pudo provocar inhibición en la actividad microbiana debido a una baja cantidad de biomasa (**Figura 3.2**) en R2 (Omri y col. 2013). A diferencia de R2 con un pH de operación < 1.0, en R1, el pH fue > 2.5 y la cantidad de biomasa presente fue mayor (observaciones visuales en las primeras etapas de operación), además, de una menor concentración de sulfatos, lo que favoreció que la ER de remoción de H₂S se mantuviera a pesar del incremento en la carga alimentada. Para corroborar que la alta concentración de sulfatos fue una de las causas principales por la que el desempeño del reactor disminuyó, se reemplazó todo el medio mineral en R2 y se incrementó el periodo de reemplazo de una a dos veces por semana. Con esta estrategia se logró recuperar y mantener el desempeño del reactor a pesar de registrar valores mayores a 15 g L^{-1} en la concentración de sulfatos e incrementar la carga de H₂S (**Tabla 3.1**).



Figura 3.2. Imágenes del lecho filtrante (día 274 de operación), sección inferior del BLE.

3.4.2. Efecto de la adición de una fuente adicional de azufre.

Para promover un mayor crecimiento de biomasa en el reactor, se decidió agregar una fuente adicional de azufre en el día 234 de operación, usando tiosulfato de sodio. La concentración de tiosulfato agregada fue de 2 g L^{-1} (258 mgS L^{-1}), la cual se introdujo en el medio mineral sin dejar de alimentar H_2S . Los resultados muestran que la adición de tiosulfato indujo un pronto decremento en la actividad microbiana lo cual se reflejó en la ER alcanzando valores cercanos a cero y manteniéndose así por 7 días (**Figura 3.4A**). Para reestablecer la actividad en el reactor, se disminuyó la carga de H_2S alimentada a valores similares al arranque ($4.9 \pm 0.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$: **Tabla 3.1**) y se reemplazó el medio de recirculación a fin de eliminar residuos de tiosulfato. El sistema se recuperó gradualmente alcanzando una $\text{ER} > 85 \%$ en los siguientes 7 días. Se ha reportado que bajas concentraciones de tiosulfato ($0.7\text{-}7 \text{ mgS L}^{-1}$ a un pH entre 1.9-2.1) fueron efectivas para mejorar la eliminación de H_2S en un BLE diferencial (Kim y Deshusses, 2005), sin embargo, los mismos autores mencionan que concentraciones arriba de 300 mgSL^{-1} también pueden inhibir significativamente la remoción de H_2S . Aunque la concentración adicionada al reactor en este estudio fue menor de 300 mgS L^{-1} , también presentó un efecto negativo en la eliminación de H_2S . Este efecto negativo se vio reflejado en el porcentaje de conversión a sulfatos registrando en este periodo un 46 % mientras que, antes de la adición de tiosulfato se mantuvo alrededor de 73 %. Por otro lado, microorganismos quimiolitótrofos acidófilos como *Thiobacillus thiooxidans* que utilizan compuestos inorgánicos de azufre como fuente de energía, solo son capaces de consumir compuestos como tiosulfato a un $\text{pH} > 4.5$, mientras que, a pHs menores, su crecimiento se ve

inhibido (Masau y col. 2001). Adicionalmente, estos microorganismos presentan una alta actividad microbiana con altas concentraciones de H₂S y pH<1(Lee y col. 2005 y 2006), condiciones presentes en el reactor aquí descrito (pH <0.5 y H₂S >300 ppm_v). En los estudios de biología molecular en R1, se encontró que *Thiobacillus thiooxidans* estuvo presente en el reactor por lo que también pudo encontrarse en R2 y ser una de los principales responsables del consumo de H₂S debido a su tolerancia a pHs bajos (Tu y col. 2016). El hecho de que este género estuviera presente en conjunto con la susceptibilidad a tiosulfato puede explicar el decaimiento de la ER en el sistema. Las ERs antes de la adición de tiosulfato fueron >99.9 % y cabe destacar que después de suspender la adición de tiosulfato y una vez que se recuperó la actividad en el sistema, la carga de H₂S se incrementó de 12 a 38 g m⁻³ h⁻¹, alcanzando ER> 99.9 %.

Tabla 3.1. Condiciones de operación en el reactor y resultados obtenidos de capacidad de eliminación y eficiencia de remoción.

Días	Carga (gm ⁻³ h ⁻¹)	CE (gm ⁻³ h ⁻¹)	ER (%)	Condición
1-26	4.2 ± 0.4	4.2± 0.4	99.7 ± 1.1	
27-40	5.8 ± 0.8	5.8±0.8	100 ± 0	
40-65	9.1 ± 0.4	8.9 ± 0.6	98.5 ± 5.4	
66-72	11.3 ± 0.7	11.3 ± 0.7	100 ± 0	
73-101	12.9 ± 1.2	12.9 ± 1.2	100 ± 0	
102-155	17.6 ± 0.4	17.6 ± 0.4	100 ± 0	
156-239	25.8 ± 0.4	22.6 ± 8.5	87.9 ± 33.1	Adición de tiosulfato
240-247	4.9 ± 0.6	1.1 ± 1.4	23.3 ± 30.9	
248-249	12.6 ± 0.1	12.6 ± 0.1	100 ± 0	
250-253	19 ± 1	19 ± 1	100 ± 0	
254-256	26.3 ± 0.8	26.3 ± 0.8	100 ± 0	
257-278	35.2 ± 1.2	35.2 ± 1.2	100 ± 0	
279-437	51.9 ± 0.9	50.8 ± 4	97.9 ± 7.5	
438-450	52.3 ± 0.7	50.5 ± 1.4	96.6 ± 2.9	Adición de ozono
451-460	52.8 ± 0.8	52.7 ± 0.9	99.8 ± 0.2	

3.4.3. Efecto del incremento en la alimentación de H₂S en el sistema

Un decremento en el desempeño del sistema se registró en el día 290 atribuido a un incremento de la carga de H₂S. Este efecto se observó a partir de 50 g m⁻³ h⁻¹ alcanzado un mínimo de 40 % en la ER en el octavo día de haber suministrado dicha carga. Después de este periodo, se requirieron dos días para que el sistema alcanzara el estado estable y ERs >99.9 %. Este efecto negativo de la carga en el desempeño del reactor se atribuyó a la susceptibilidad de la biomasa presente en el reactor a causa del incremento de la concentración de H₂S, la cual requirió de un periodo de adaptación a la carga alimentada. Aunque estudios reportan que los BLE pueden remover altas concentraciones de H₂S (Aita y col. 2016), también se ha encontrado que, dependiendo de las condiciones de operación, concentraciones entre 0.2 a 1.2 g m⁻³ de H₂S pueden ser inhibitorias para las bacterias sulfooxidantes, adicionalmente un incremento en la concentración del contaminante, hace aún más selectiva la población, llegando a afectar su remoción (Omri y col. 2013). En este contexto, Jaber y col. (2013) reportaron un efecto inhibitorio con concentraciones menores a 0.5 g m⁻³ y pH<1, condiciones de pH similares en nuestro estudio, aunque un punto interesante es que las concentraciones eliminadas en el presente reactor (0.88 ± 0.02 g m⁻³) fueron mayores a las reportadas y el efecto del incremento de la concentración alimentada solo se mostró por un corto periodo de tiempo (**Figura 3.4A**). La máxima capacidad de eliminación alcanzada en el reactor fue de 53.7 g m⁻³ h⁻¹ (640 ppmv) (RE= 100 %) la cual es comparable con trabajos reportados previamente en la literatura (Jaber y col 2016; Giri y col. 2014; Jin y col. 2005a; Kim y col. 2008; Rene y col. 2010). Cabe destacar que la caída de presión en el reactor se mantuvo alrededor de 12.5 mmH₂O m_{reactor}⁻¹ durante todo el periodo de operación y que la mayor cantidad de biomasa se registró en la sección inferior del reactor, registrando un valor al final de la operación de 19 gX L⁻¹_{empaquetado}. Esto representa una ventaja para la eliminación de H₂S por largos periodos de operación, ya que a pesar de que se observó la producción de azufre elemental, este fue removido en cada cambio de medio mineral, lo que contribuyó a mantener una caída de presión baja en el sistema (Roshani y col. 2012).

Un comparativo entre R1 y R2 en este punto es que el pH en R2 no fue controlado durante el arranque del reactor, el medio mineral se alimentó a un pH neutro (6.8), sin embargo, este disminuyó rápidamente a valores < 0.5, después el medio se alimentó a un pH de 2.5,

lo cual no influyó en la remoción de H_2S . Otro punto importante es que la cantidad de biomasa acumulada por la degradación de MeOH pudo influir en la eliminación de H_2S , ya que no se logró eliminar concentraciones mayores a 170 ppm_v a pesar de tener un control de pH y una mayor cantidad de biomasa (Jin y col. 2007). Los problemas de difusión de los contaminantes por la alta cantidad de biomasa presente y un lento crecimiento de los microorganismos quimiolitótrofos pudieron dificultar la remoción de H_2S (Alcántara y col. 2004; Egli y Feichter, 1981; Yang y col. 2010) un fenómeno que no se presentó en R2, explicando porque en un sistema con menor cantidad de biomasa se logró una mayor remoción de H_2S (**Figura 3.3**).

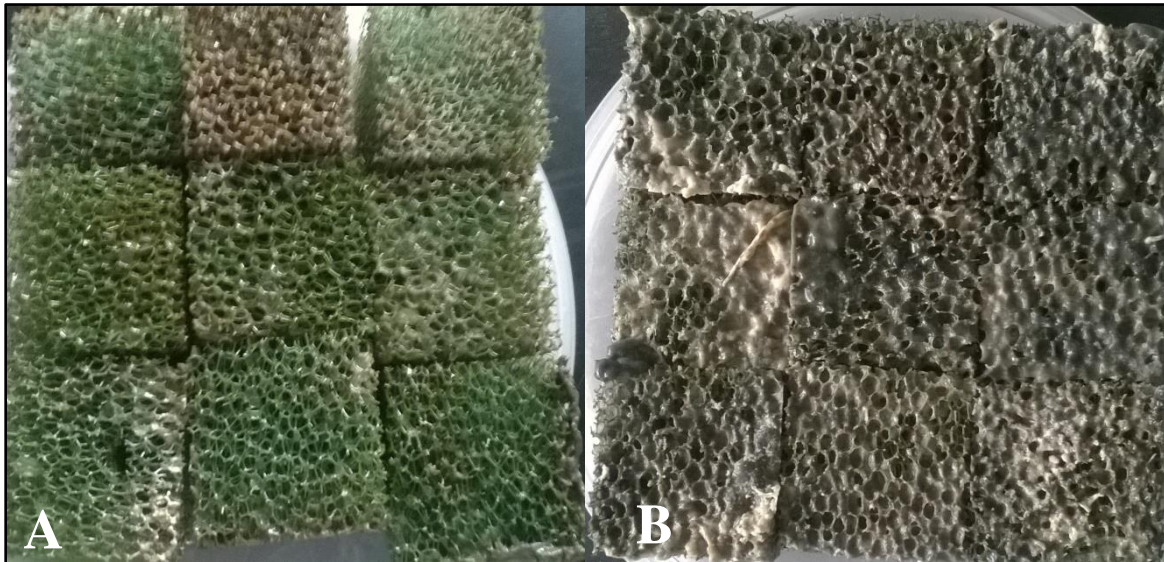


Figura 3.3. Imagen comparativa del contenido de biomasa en R2 (A) y R1 (B) al final de los 460 días de operación.

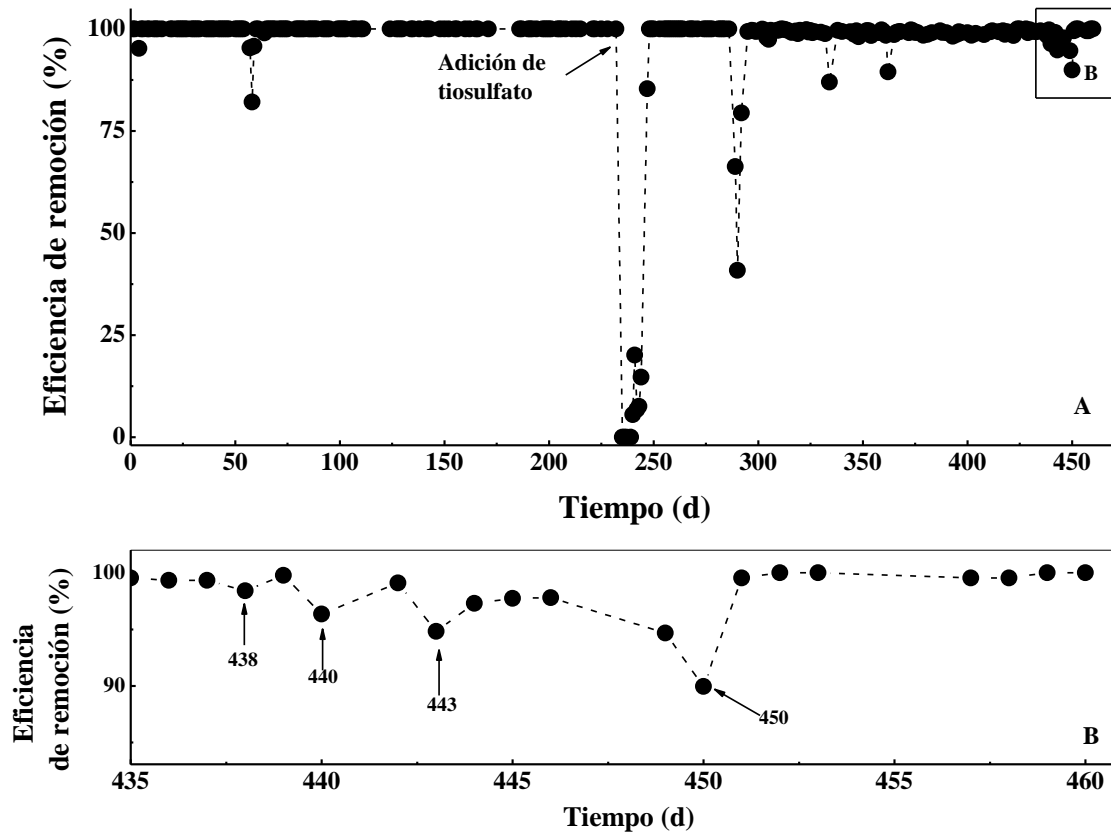


Figura 3.4. Perfil de desempeño del reactor en el BLE (A), resultados del desempeño durante la adición de ozono (B).

3.4.4. Efecto del ozono sobre la biomasa.

Con el objetivo de verificar el efecto del ozono en la eliminación de H₂S y comparar su efecto con los resultados obtenidos en R1, debido a que se conoce que la velocidad de crecimiento de los microorganismos quimiolitótrofos es menor que los heterótrofos y pueden tener una mayor susceptibilidad a ser afectados en el uso de oxidantes. Por lo anterior en esta etapa del proyecto se evaluó el efecto del ozono a bajas concentraciones sobre el desempeño de R2. La concentración de ozono alimentada fue de $98 \pm 5.4 \text{ mg m}^{-3}$ ($5.9 \pm 0.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). El ozono se alimentó en periodos de 20 horas durante 4 días (**Figura 3.4B**, flechas en 438 y 440) donde se observó un ligero decremento en la eliminación de H₂S, recuperándose después de suspender el O₃, para el segundo día con O₃ la ER disminuyó nuevamente y se volvió a recuperar una vez que la adición de O₃ fue suspendida. Después el oxidante se alimentó de forma continua durante 7 días a la misma

concentración. Los resultados mostraron la exposición continua de O₃ originó que la ER disminuyera de 99.1 a 94.8 % en el primer día y se mantuviera en 97.6 ± 0.3 en los siguientes 4 días, para después alcanzar un valor mínimo de 90% en el día 450 de operación (día 7 con alimentación continua e O₃).

Se observó que los microorganismos presentes fueron susceptibles a la presencia de ozono, esto se relaciona también con el efecto que tuvo el ozono en el reactor H₂S-MeOH, donde se observó que la eliminación de H₂S fue la primera que se vio afectada cuando la primera carga de ozono se mantuvo después de 30 días. Sin embargo, en R2, el efecto negativo del ozono hacia la actividad microbiana no fue prolongado y una vez que se suspendió, el sistema volvió a alcanzar ER cercanas al 100%.

Con la finalidad de conocer si la concentración de ozono alimentada al sistema tuvo un efecto sobre el contenido de carbohidratos de la biopelícula y si de alguna forma había desprendido parte de estos componentes de la biopelícula se cuantificó la cantidad de carbohidratos presentes en el medio de recirculación (**Tabla 3.2**). Los resultados mostraron que no hubo diferencia en el contenido de carbohidratos con y sin presencia de ozono, confirmando que este oxidante tiene poca reactividad con estos azúcares cuando las condiciones de reacción son ácidas (Adams y Gorg, 2002; Meng y col. 2016; Roncero y col. 2003). Respecto al contenido de proteínas, los valores registrados fueron de 63.8 ± 14 y 64.1 ± 23.7 mg L⁻¹ antes y con alimentación de ozono, respectivamente. Estos valores tanto de carbohidratos como de proteínas indicaron que las concentraciones de ozono alimentadas no tuvieron un efecto en la remoción de los componentes de la biopelícula comparado con el efecto a un pH de 2.5 registrado en R1, lo que se atribuyó principalmente a las condiciones de pH en el sistema, que evitaron una afectación mayor en el desempeño del reactor a pesar de la poca cantidad de biomasa presente.

Tabla 3.2. Contenido de carbohidratos en la fase líquida del BLE en diferentes etapas de operación.

Antes de ozono		Durante ozono		Después de ozono	
Días	mg L ⁻¹	Días	mg L ⁻¹	Días	mg L ⁻¹
408	81.8 ± 13	440	67.7 ± 16.2	453	106 ± 21.6
415	45 ± 1.9	442	73.7 ± 5.9	457	101.7 ± 14.3
418	61.8 ± 10.4	443	86.4 ± 10.5	459	47.2 ± 4.3
422	74.1 ± 5.8	450	94.8 ± 10.1	460	75.7 ± 13.5
433	108.5 ± 2				

3.4.5. Perfil de eliminación de H₂S.

La evaluación del perfil de eliminación de H₂S a través de la columna del reactor mostró que este fue eliminado principalmente en la sección inferior del BLE para todas las cargas alimentadas. Sin embargo, la sección superior ayudó a amortiguar la eliminación de H₂S cuando las condiciones no fueron favorables como en el caso de la introducción de tiosulfato de sodio y ozono, en donde se registraron concentraciones de H₂S también a la salida del reactor (**Figura 3.5**). Estos resultados mostraron ser satisfactorios para la remoción de H₂S, ya que indicaron que el biofiltro no presentó una marcada inhibición por la presencia de altas concentraciones de H₂S (Chaiprapat y col. 2011, Silva y col. 2012), a pesar de la poca cantidad de biomasa que hubo en el reactor a lo largo de los 460 días de operación.

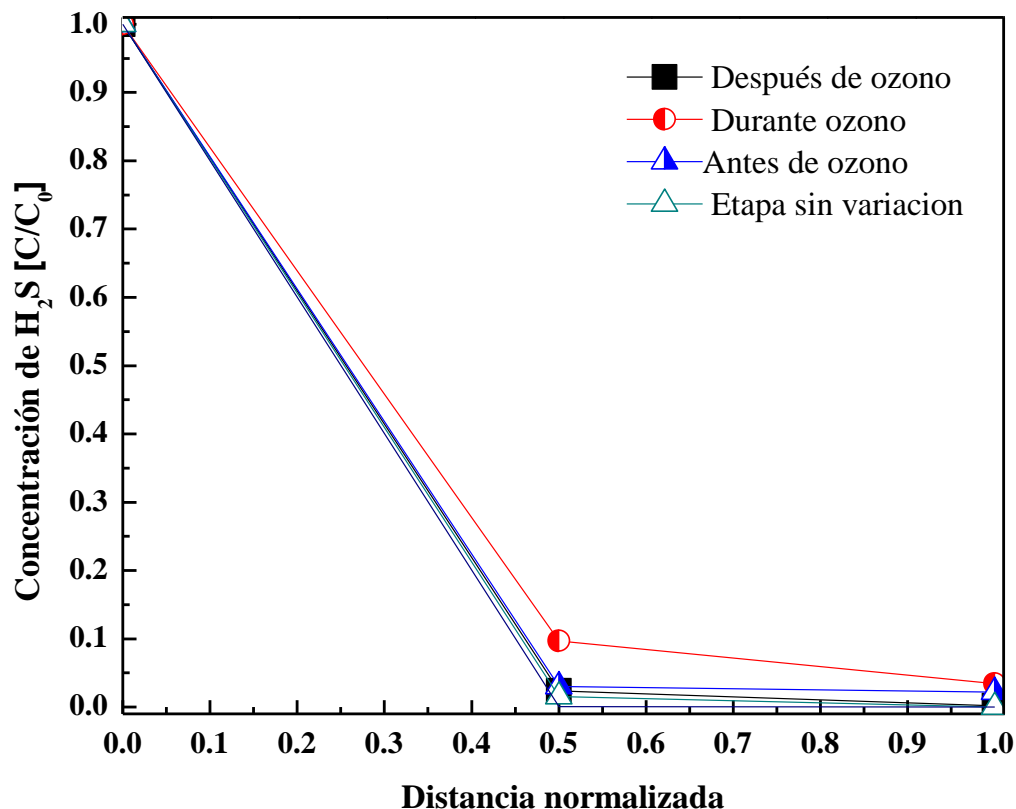


Figura 3.5. Perfil de eliminación de H₂S a lo largo de la columna del reactor.

3.4.6. Perfil de eliminación de CO₂

A diferencia del tratamiento de compuestos orgánicos volátiles, en el tratamiento de H₂S, la fuente de carbono es, por lo general el CO₂ contenido en el aire, el cual es asimilado por la biomasa presente en el sistema. Aunque es ampliamente conocido que los microorganismos quimiolitótrofos utilizan el CO₂ como fuente de carbono, en la literatura existen pocos estudios acerca de la utilización de este compuesto en sistemas de biofiltración. Sin embargo, es importante conocer hasta qué punto el CO₂ puede ser asimilado y que influencia tiene la carga o concentración alimentada de H₂S sobre su tasa de asimilación. Es por lo anterior que en este estudio se monitoreo el consumo de CO₂ durante todo el periodo de operación del reactor y su relación con la concentración de H₂S alimentada. El ajuste de los datos que se presentan en la **Figura 3.6**, muestran que conforme la concentración de H₂S incrementa, también incrementa la eliminación de CO₂, alcanzando una tasa de eliminación de 6 g m⁻³ h⁻¹ con una concentración de alrededor de 0.9 g m⁻³ de H₂S (ER=

100 %), estos resultados concuerdan con lo reportado por Hu y col. (2010), donde un incremento en el consumo de CO₂ fue registrado al incrementar la concentración de sulfuro de sodio.

Estudios previos han reportado que el CO₂ puede contribuir a un 13% del carbono celular en microorganismos heterotróficos mientras que para quimiolitótrofos facultativos que consumen compuestos de azufre puede contribuir en un 32% (Pérez y Matin, 1982). En este estudio el sistema no tuvo una fuente de carbono adicional por lo que se supone que toda la biomasa contenida en el lecho filtrante obtuvo el carbono del CO₂ del aire. Así, los datos obtenidos durante todo el periodo de operación fueron una asimilación del 7.7 % del total del CO₂ alimentado en la corriente de aire equivalente a 0.11 gCO₂/gH₂S removido, consistente con el ajuste de los datos presentados en la **Figura 3.6**. Jin y col. 2005b reportaron un incremento en la eliminación de H₂S con concentraciones de 865 a 1087 ppm de CO₂. En este estudio el CO₂ alimentado al reactor se mantuvo por debajo de 500 ppm, lo que podría haber limitado el crecimiento de la biomasa en el sistema, ya que el rendimiento obtenido fue de 0.06gX/gH₂S consumido, un valor 2.5 veces menor al reportado por Manucci y col. (2012), quien reportó un rendimiento de 0.15gX/gH₂S consumido.

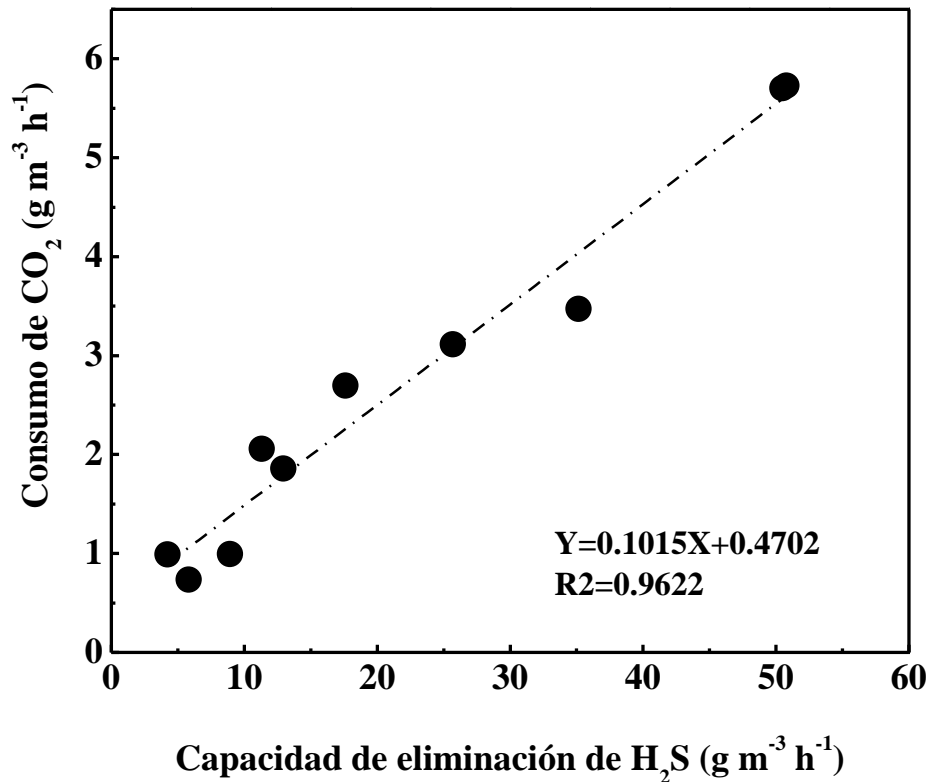


Figura 3.6. Correlación entre la capacidad de eliminación de H₂S y el consumo de CO₂, R²= 0.95.

3.4.7. Actividad microbiana.

Experimentos de respirometría para tiosulfato y MeOH fueron realizados para conocer la actividad microbiana a altas concentraciones de azufre y a una fuente orgánica de carbono y energía para los microorganismos en el reactor. Los experimentos se llevaron a cabo en los días 395 y 424 de operación del reactor con cargas de H₂S alimentadas de 53.2 y 52.5 gm⁻³ h⁻¹. Para el experimento con tiosulfato el resultado de respiración endógena de los microorganismos fue de 8.5 ±1.6 μmol O₂ g⁻¹ proteína min⁻¹, después se determinó la actividad microbiana con diferentes concentraciones de tiosulfato. La **Figura 3.7** muestra que a concentraciones de tiosulfato menores a 2 g L⁻¹ los microorganismos presentaron baja actividad, lo que es consistente con los resultados obtenidos al adicionar tiosulfato al BLE. Un notorio incremento en la actividad se observó conforme se incrementó la concentración de tiosulfato. El valor máximo de consumo de oxígeno, de acuerdo con el ajuste de los datos, fue de 91.0 μmol O₂ g⁻¹ proteína min⁻¹ y una K_s de 215.0 mmol O₂ L⁻¹. Arellano-García y col. (2010) reportaron un consumo máximo de oxígeno de 7.0 μmol O₂ g_{proteína}⁻¹

min^{-1} y una K_s de $0.46 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$ para disulfuro de carbono y $11.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y una K_s de $2.91 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$ para etanotiol, con microorganismos sulfooxidantes a pH alcalino, aunque los datos se dieron en diferentes condiciones, es notorio que la fuente de azufre puede influir sobre la actividad de los microorganismos sulfooxidantes, ya que, dependiendo de la concentración, dicha fuente puede llegar a ser tóxica a concentraciones relativamente bajas.

La actividad microbiana evaluada para MeOH se muestra en la **Figura 3.7**. El consumo máximo de oxígeno para MeOH fue $22.3 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{proteína}} \text{ min}^{-1}$ y una K_s de $128.8 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$. Dicha actividad fue 4 veces menor comparada con la obtenida con tiosulfato y 4.3 veces menor a la encontrada en R1 sin presencia de O_3 . Cabe destacar la presencia de microorganismos que consumen carbono orgánico bajo condiciones de acidez extrema, lo que indicó condiciones de mixotrofia en el sistema (Johnson 1998; Pronk y col. 1990).

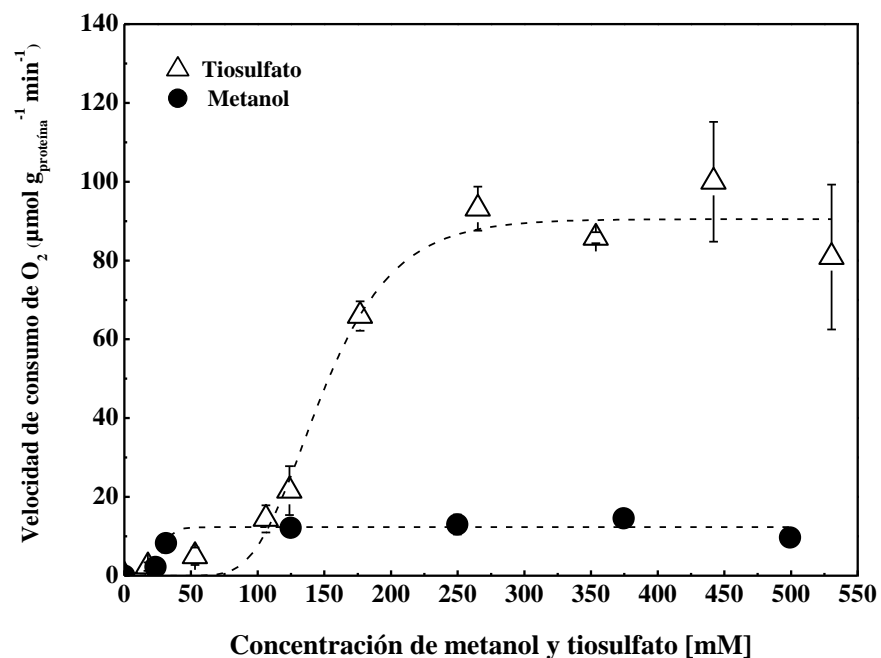


Figura 3.7. Influencia de la concentración de tiosulfato y MeOH sobre la actividad microbiana en la biomasa del reactor. Los datos fueron ajustados a un modelo tipo Monod con $R^2=0.99$ y $R^2=0.94$, respectivamente.

3.5. CONCLUSIONES

La operación del reactor se vio afectada por diversos factores, entre ellos fueron

(i) La concentración de sulfatos en el medio líquido durante la etapa de arranque, (ii) la presencia de tiosulfato a bajas concentraciones y (iii) la carga de H₂S alimentada, aunque esta afectación solo fue por un corto periodo de tiempo, siendo este suficiente para que la población se adaptará al incremento de H₂S. (iiii) Por último y en menor proporción, la adición de ozono. A pesar de lo anterior, el reactor fue capaz de remover concentraciones de H₂S alrededor de 600 ppm_v con ER de 100 %, las cuales son superiores a las reportadas bajo condiciones de operación similares. Una importante relación lineal fue observada en el consumo de CO₂ y la capacidad de eliminación de H₂S, con una asimilación similar a la estequiometría pero, con un rendimiento de biomasa (gX/gH₂S) 2.5 veces menor a lo reportado.

Adicionalmente, la evolución de la actividad microbiana mostró la presencia de microorganismos quimiolitótrofos facultativos al manifestar actividad en presencia de metanol, sin embargo, esta actividad fue menor (4 veces) a la encontrada con tiosulfato y con metanol en R1.

3.6. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron responder las preguntas de investigación planteadas, sin embargo, también dieron pie a otros cuestionamientos, como si la concentración de CO₂ en el sistema puede afectar la eliminación de H₂S y también sí puede influir en el contenido de biomasa. Por lo que se recomienda ampliar esta investigación haciendo énfasis en los dos aspectos mencionados. Así también se recomienda hacer un estudio de biología molecular para conocer los microorganismos presentes en el reactor, ya que este presentó una alta efectividad en la remoción de H₂S, tolerancia a la acidez extrema y a altas concentraciones de H₂S.

CAPITULO 4. ELIMINACIÓN DE CH₄ EN UN REACTOR BURBUJEO CON RECIRCULACIÓN DE LA FASE GAS.

4.1. INTRODUCCIÓN

Debido a que en los sistemas de biofiltración se dificulta la eliminación de compuestos de baja solubilidad, es necesaria la implementación de otras configuraciones de reactores que permitan superar los problemas de transferencia de masa, sobre todo al tratar corrientes con bajas concentraciones de contaminantes poco solubles. El metano es como se ha mencionado, un gas de efecto invernadero con mayor potencial de calentamiento que el CO₂, sin embargo, el uso de los biofiltros para llevar a cabo su eliminación de corrientes gaseosas no ha sido adecuado debido a las bajas eficiencias de remoción obtenidas (Ganendra y col 2005; Nikiema y col 2005). Comparado con lo presentado en el capítulo 2 de este trabajo, donde una alta cantidad de biomasa puede acumularse al eliminar compuestos altamente solubles, presentando problemas de transferencia de masa debido al exceso de biomasa, en el caso de la eliminación del CH₄, los problemas de transferencia de masa son debido a la baja solubilidad de este compuesto. Por lo anterior, se han propuesto estrategias que permitan incrementar las tasas de eliminación de CH₄ en los sistemas de biofiltración, tales como, el uso de reactores de partición y/o modificación en la configuración de los biofiltros (Estrada y col 2014; Rocha-Ríos 2009). Sin embargo, como parte de su mitigación, el metano puede ser aprovechado como una fuente factible para la obtención de P3HB o PHB (Poli-3-hidroxibutirato) por microorganismos metanótrofos, los cuales tienen la capacidad e acumular bioplásticos (Metanótrofos tipo II) cuando se encuentran limitados por algún nutriente. El uso de CH₄ representa una alternativa económica para la obtención de P3HB ya que se puede encontrar en diversas fuentes, siendo la más recurrente en actividades de ganadería, donde las concentraciones emitidas a la atmósfera no son adecuadas para ser usadas como combustible, pero que, representan una importante fuente de emisión. Sin embargo, para que la extracción de los bioplásticos sea factible, se debe tener un reactor que además de tener altas tasas de remoción de CH₄, también facilite la recuperación de la biomasa. Aunque se tienen diversas fuentes de CH₄

que pueden ser tratadas y aprovechadas para la obtención de bioplásticos, la baja solubilidad de este compuesto representa una limitante para su tratamiento en sistemas biológicos.

Se han implementado diversas configuraciones de reactores biológicos para la eliminación de metano. Dentro de las configuraciones estudiadas, los reactores de burbujeo representan una alternativa viable ya que la biomasa se encuentra en suspensión y no en biopelícula como en el caso de los biofiltros facilitando la recuperación y extracción de los bioplásticos (Rahnama y col 2012). Por lo anterior en esta sección del proyecto se investigó la eliminación de CH₄ en un reactor de columna de burbujeo con la cepa *Methylocystis hirsuta*, así como la acumulación de P3HB en experimentos en lote bajo diferentes limitaciones de nutrientes (manganeso, potasio, nitrógeno y limitación de nitrógeno con exceso de hierro).

4.2. HIPÓTESIS

La implementación de recirculación de la fase gas en conjunto con el uso de difusores microporosos permitirá incrementar las eficiencias de remoción de CH₄ al tratar corrientes diluidas (4 % v/v) de este contaminante en un reactor de columna de burbujeo.

4.3. OBJETIVOS

Estudiar la eliminación de CH₄ (a bajas concentraciones: 4 %) en un reactor de burbujeo bajo diferentes tasas de recirculación de la fase gas y diferentes tiempos de retención de lecho vacío.

Determinar la mejor condición para la producción de polihidroxibutirato bajo diferentes condiciones de limitación y adición de nutrientes (limitación de N, K, y Mn y adición de Fe).

4.4. METODOLOGÍA

4.4.1. Medio mineral e inóculo.

El medio mineral utilizado para llevar a cabo los experimentos abajo descritos se enlista en la **Tabla 4.1** y su composición fue modificada de Mokhtari-Hosseini y col. (2009).

Tabla 4.1. Composición del medio mineral.

Compuestos	Concentración (g L ⁻¹)	Elementos traza	Concentración (mg L ⁻¹)
NaNO ₃	2.25	FeSO ₄ ·7H ₂ O 1.3	1.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	MnCl ₂ ·4H ₂ O 3.5	3.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 1.5	1.5
KH ₂ PO ₄	0.68	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.04
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6.14	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04
NaNO ₃	0.78	CoCl ₂	0.32
		H ₃ BO ₃	0.2

4.4.2. Reactivación de la cepa *Methylocystis hirsuta*.

La cepa utilizada para este estudio fue la cepa *Methylocystis hirsuta* (DSMZ 18500), la cual se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso. Para su reactivación se inocularon 4 ml de cultivo en 40 ml de medio mineral a 25 °C y 250 rpm durante 48 horas con 197.2 ± 2.1 g m⁻³ de metano (33 % CH₄-67 % O₂) en botellas serológicas de 125 ml. Posterior a este tiempo, el contenido total de cada botella serológica se llevó a un volumen de 200 ml con medio mineral en botellas de cultivo de 1.25 L, las cuales se llenaron con la misma mezcla de metano-oxígeno ya descrita, incubando a 25 °C y 600 rpm. El crecimiento microbiano y consumo de metano se evaluó cada 48 h hasta que la densidad óptica (DO_{600nm}) del cultivo fue alrededor de 1.1, correspondiente a una concentración de sólidos suspendidos totales (SST) de 295 ± 16 mg L⁻¹.

4.4.3. Influencia del TRLV y la recirculación de la fase gas sobre la degradación de CH₄.

Se construyó un biorreactor de columna de burbujeo (BCB) escala laboratorio de PVC transparente con una altura de 0.6 m y 0.08 m de diámetro interno, con un volumen de trabajo de 2.5 L, el esquema de operación se muestra en la **Figura 4.1**. El aire contaminado con CH₄ al 4% (v/v) se burbujea dentro del reactor instalando difusores metálicos con 0.5 µm de tamaño de poro. La corriente sintética se suministró a partir de la mezcla de CH₄ de alta pureza (≥99.5 %) con aire, controlando el flujo de CH₄ mediante un controlador de flujo másico (Aalborg). La temperatura de los experimentos se mantuvo a 25 °C. Para asegurar un balance óptimo de nutrientes y estabilidad en el pH de operación, se retiraron 500 ml del caldo de cultivo cada 48 horas los cuales se centrifugaron (10000 rpm durante 7 minutos) y la biomasa recuperada se resuspendió en 500 ml de medio mineral fresco y se regresaron al reactor.

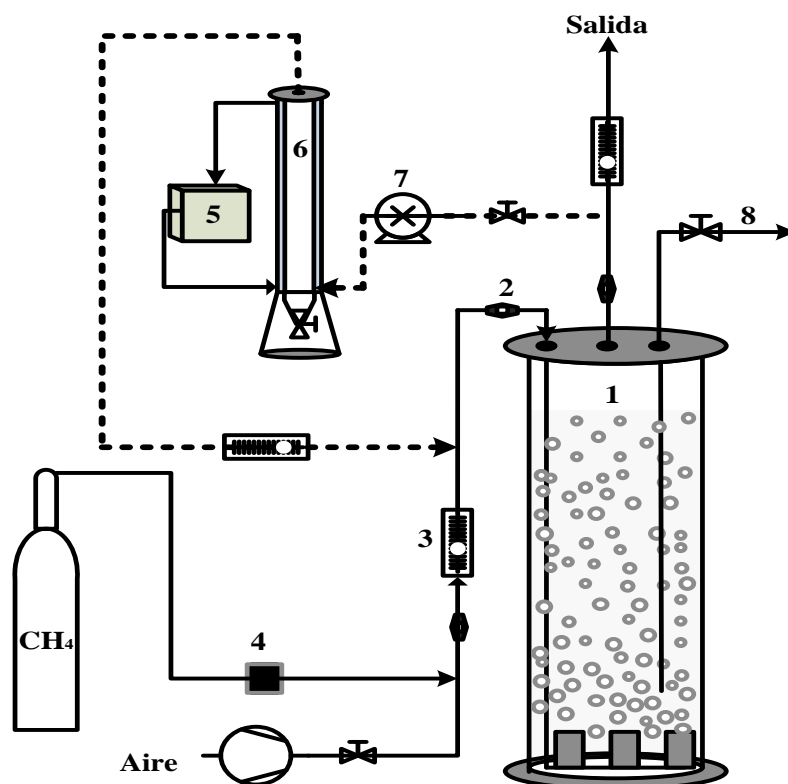


Figura 4.1 Esquema experimental. (1) Reactor, (2) puertos de muestreo, (3) rotámetro, (4) controlador de flujo másico, (5) control de temperatura, (6) condensador, (7) bomba peristáltica, (8) toma de muestras líquidas.

El reactor se inoculó con una concentración de biomasa de $194 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ y se operó durante 13 días (hasta alcanzar el estado estable) con un TRLV de 60 minutos sin recirculación de la fase gas. Después de este periodo, se investigó la influencia del TRLV sobre la eliminación de CH_4 (120, 60, 30 y 15 minutos) con una relación de recirculación (Q_R/Q) de gas de 0, 2, 3, 6, 10 y 15 (**Tabla 4.1**). El monitoreo a la entrada y salida de CH_4 , O_2 y CO_2 se monitoreo diariamente. La densidad óptica, el pH, SST y las concentraciones de nitrógeno total (NT) en el cultivo se determinaron cada 48 horas. La capacidad de eliminación (CE), eficiencia de remoción (ER), la producción de CO_2 (PCO_2), el contenido y la productividad de P3HB y la tasa máxima específica de consumo de CH_4 (datos ajustados al modelo de Gompertz) se calcularon de acuerdo con lo reportado por Zúñiga y col. (2011).

Tabla 4.1 Condiciones experimentales evaluadas durante la optimización de la eliminación de CH₄ con recirculación de la fase gas en el BCB.

Condición	TRLV (min)	Carga alimentada (g m ⁻³ h ⁻¹)	Q _R /Q	PCO ₂ /CE	Tasa de recirculación (m ³ _{gas} m ⁻³ _{reactor} min ⁻¹)	Tiempo virtual de residencia (min)
1	15	96	15	2.0 ± 0.1	1.00	0.94
2	30	48	15	1.9 ± 0.2	0.500	2
3			10	1.8 ± 0.2	0.333	3
4			15	1.7 ± 0.4	0.250	4
5	60	24	10	1.7 ± 0.1	0.167	5
6			6	1.6 ± 0.4	0.100	9
7			3	1.7 ± 0.2	0.050	15
8			2	1.7 ± 0.5	0.033	20
9			0	1.4 ± 0.2	0.000	60
10			15	2.0 ± 0.1	0.125	8
11	120	12	10	1.9 ± 0.3	0.083	11
12			6	1.7 ± 0.2	0.050	17
13			3	1.8 ± 0.4	0.025	30
14			2	2.1 ± 0.2	0.017	40
15			0	2.5 ± 0.2	0.000	120

4.4.4. Influencia de la limitación de macro y micro nutrientes sobre la acumulación de P3HB.

Se estudió la influencia de la limitación de N (con alta y baja concentración de Fe), K y Mn sobre la acumulación de P3HB y la degradación de CH₄ con cultivos de *M. hirsuta* en experimentos por lote. Los experimentos se realizaron en dos fases, en la primera fase se realizó el crecimiento del cultivo sin limitación de nutrientes, esto se llevó a cabo en un periodo de 15 días seguido por una fase de acumulación de P3HB (10 días) bajo diferentes condiciones de limitación de nutrientes (Tabla 4.2). Los experimentos de las dos fases se

realizaron por duplicado en botellas de 2 L, las cuales contenían 400 mL de MSM y una concentración inicial de biomasa de $128 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$. Las botellas se sellaron con septos de butil y aros de aluminio, agregando CH_4 en el espacio de cabeza, el crecimiento de la cepa y la acumulación de P3HB se iniciaron con una concentración de $193.2 \pm 6.8 \text{ g m}^{-3}$ ($32.5 \pm 1.1 \%$ v/v) de CH_4 en una atmósfera de oxígeno. Para los experimentos con limitación, toda la biomasa de cada botella se centrifugó y después se resuspendió en el MSM correspondiente. Un control con medio sin limitación de nutrientes se incorporó al experimento el cual se trató de la misma forma que las botellas del experimento. El consumo de CH_4 , producción de CO_2 y crecimiento de biomasa fueron periódicamente monitoreados durante todo el experimento. Mientras que el contenido de P3HB se monitoreo periódicamente durante toda la etapa de limitación.

Tabla 4.2. Experimentos propuestos para la obtención de P3HB.

Condición	Nutrientes limitados	Nutrientes in exceso	Concentración (μM)
Control	-	-	4.6
1	K	-	4.6
2	Mn	-	4.6
3	N	-	4.6
4	N	Fe	60

4.4.5. Métodos analíticos

La medición de los gases (CH_4 y CO_2) se realizó con un cromatógrafo Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, USA) equipado con una columna CP-Molsieve 5A ($15 \text{ m} \times 0.53 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$) y una CP-PoraBOND Q ($25 \text{ m} \times 0.53 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron $45 \text{ }^\circ\text{C}$, $150 \text{ }^\circ\text{C}$ y $200 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Como gas acarreador se usó helio a un flujo de 13.7 mL min^{-1} . La concentración de los SST se determinó de acuerdo con los métodos estándares (APHA 2005). La absorbancia del cultivo se determinó a una longitud de 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu, Japan). La concentración de NT se cuantifico filtrando una muestra por un poro de $0.45 \mu\text{m}$ y se analizó en un analizador de

carbono orgánico total (TOC-VSCH, Shimadzu, Japan) acoplado a un módulo de NT con detección de quimioluminiscencia (TNM-1) (Shimadzu, Japan).

4.4.6. Determinación de P3HB

La extracción de los P3HB se llevó a cabo usando cloroformo con digestión de 4 horas a 100 °C. Las muestras descongeladas se re suspendieron en un ml de una solución de propanol/HCl al 20% v/v, adicionando al mL de muestra 50 µL de patrón interno (ácido benzoico) y 2 mL de cloroformo (CHCl₃). Para la curva de calibración, se prepararon patrones de P3HB con concentraciones de 256, 102.4, 10.2 g L⁻¹ adicionando 2 mL a cada tubo de digestión y 50 µL de patrón interno. Después de la digestión las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionó 1 ml de agua destilada para separar la fase orgánica. Una vez filtrada (filtro de 0.2 µm) la fase orgánica, el contenido de P3HB se determinó mediante cromatografía de gases-masas (Agilent Technologies: GC System 7820A MSD 5977E, Santa Clara, USA) equipado con una columna DB-wax (30 m × 250 µm × 0.25 µm), siguiendo la metodología descrita por López y col. (2014).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Influencia del TRLV y la velocidad de recirculación del gas sobre la remoción de CH₄.

El reactor se operó con un TRLV de 120 minutos sin recirculación de la fase gas, obteniendo una CE de $4.7 \pm 0.48 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER= $38 \pm 4 \%$), mientras que para el mismo TRLV aplicando diferentes tasas de recirculación ($Q_R/Q=2, 3, 6, 10, 15$), el intervalo de capacidad de eliminación fue de $6.6 \pm 0.30 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a $9.80 \pm 0.10 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con eficiencias de remoción para cada tasa de recirculación de $54 \pm 2.4 \%$ a 60 ± 0.90 , 69 ± 1.6 , 73 ± 0.6 , y $79 \pm 0.6 \%$. Tanto la CE y la producción de CO₂ se relacionaron con las diferentes tasas de recirculación, incrementado conforme la tasa de recirculación aumentó (**Figura 4.2A**). De igual manera, con un TRLV de 60 minutos, sin recirculación de la fase gas, se obtuvo un CE de $8.5 \pm 0.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una PCO₂ de $12 \pm 0.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y una ER de $35 \pm 1.3 \%$.

La implementación de las tasas de recirculación con relaciones de 2, 3, 6, 10 y 15 resultaron en eficiencias de remoción de 50 ± 1.7 , 56 ± 1.6 , 67 ± 0.7 , 71 ± 1.2 , y $75 \pm 0.6 \%$, respectivamente. Tanto la capacidad de eliminación como la producción de CO₂ en el reactor incrementaron conforme se incrementó la relación de la recirculación del gas, alcanzando una CE_{max} de $19 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=75%) a una relación (Q_R/Q) de 15 (**Figura 4.2B**). Eficiencias de remoción similares han sido reportadas en la eliminación de CH₄ con un TRLV arriba de 50 minutos (du Plessis y col. 2003). El incremento en la tasa interna de recirculación no afectó la mineralización en el sistema (PCO₂/CE), la cual mostró valores similares entre cada condición (2.0 ± 0.1 , 1.9 ± 0.2 , 1.7 ± 0.4 , 2.0 ± 0.1 a una Q_R/Q de 15, para cada TRLV, 15, 30, 60 y 120 min, respectivamente (**Tabla 4.2**). Lo anterior sugiere que los incrementos en la Q_R/Q en el reactor fueron adecuados para mantener una óptima actividad microbiana. Cabe destacar que independientemente la relación entre la tasa de recirculación, las eficiencias de remoción alcanzadas para 60 y 120 min de TRLV fueron muy similares. Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado previamente por Estrada y col. (2014) bajo una relación de recirculación de la fase gas de 18 (Q_R/Q), registró un incremento de 2.5 en la eficiencia de remoción de CH₄ en un BLE comparado con la operación convencional de reactor, es decir, sin recirculación de la fase gas.

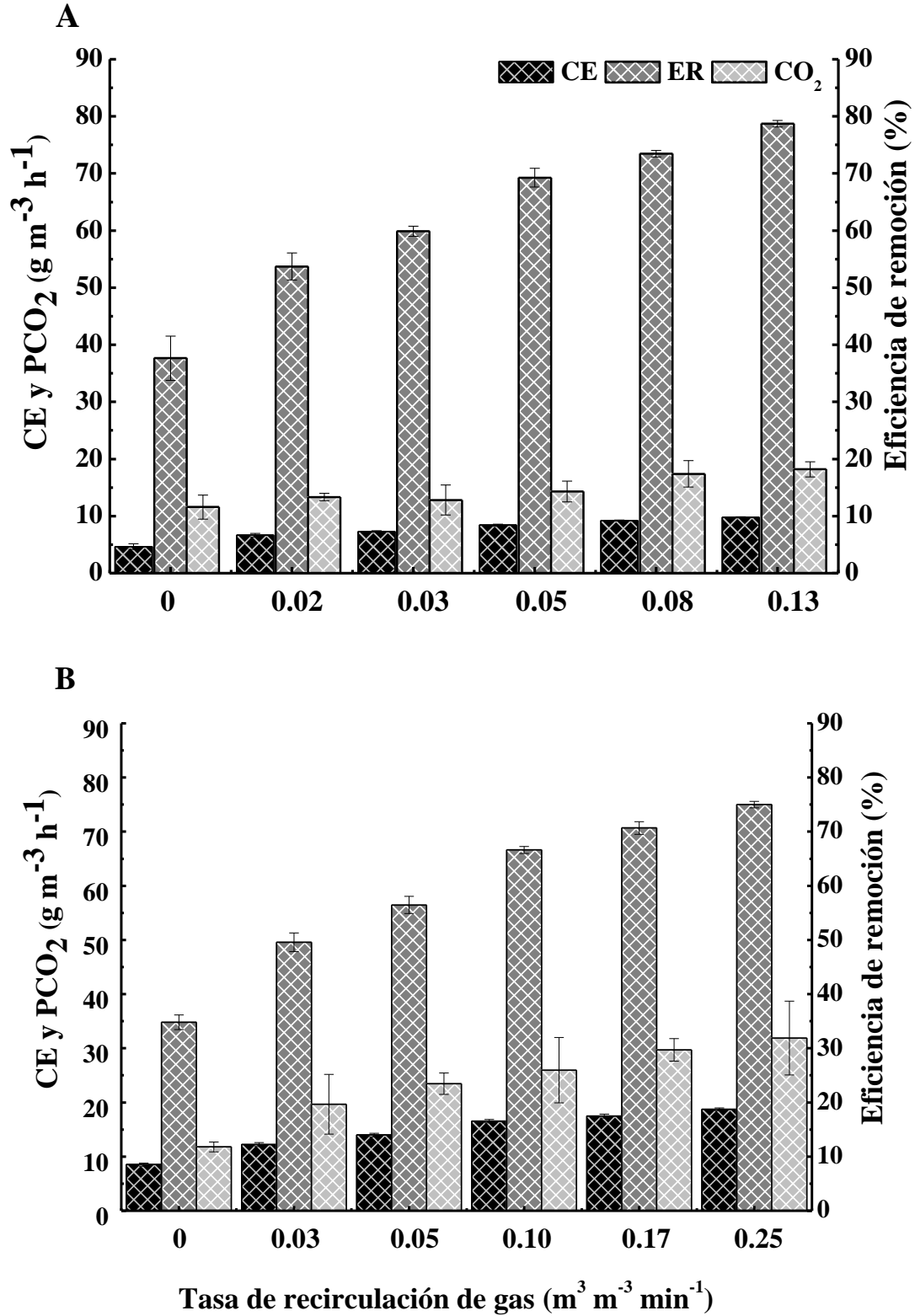


Figura 4.2. 120 minutos (A) y 60 minutos de tiempo global de residencia (B).

A pesar de obtener un buen desempeño del sistema para TRLVs de 60 y 120 minutos, éstos aún son altos comparados con lo reportado en la literatura Estrada y col. (2014), pudiendo limitar la puesta en marcha del proceso a escala real al requerir reactores de gran volumen. Por lo tanto, también se evaluó el desempeño del proceso a un TRLV de 30 y 15 minutos. La evaluación se llevó a cabo para una $Q_R/Q= 10$ y 15, para 30 minutos y una $Q_R/Q= 15$ para un TRLV de 15 minutos. En este contexto, una reducción en el TRLV originó siempre un incremento en la PCO_2 y CE a expensas de una disminución en la eficiencia de remoción (**Figura 4.2.3**). Una CE_{max} de $36 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=74 %) se registró con 30 minutos de TRLV mientras que con 15 minutos se obtuvo una CE_{max} de $55.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER=58.1%). Sin embargo, el estrés al esfuerzo cortante causado por la alta turbulencia en el medio de cultivo durante el TRLV y la relación Q_R/Q de 15, causó un deterioro en la actividad microbiana y, por lo tanto, una disminución en la CE a $21.1 \pm 5.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (ER= 23.3 \pm 4.7 %). La alta turbulencia causó que la biomasa formara agregados y sedimentará en el fondo del reactor, reduciendo la concentración de biomasa activa en el volumen efectivo del reactor (**Figura 4.4**).

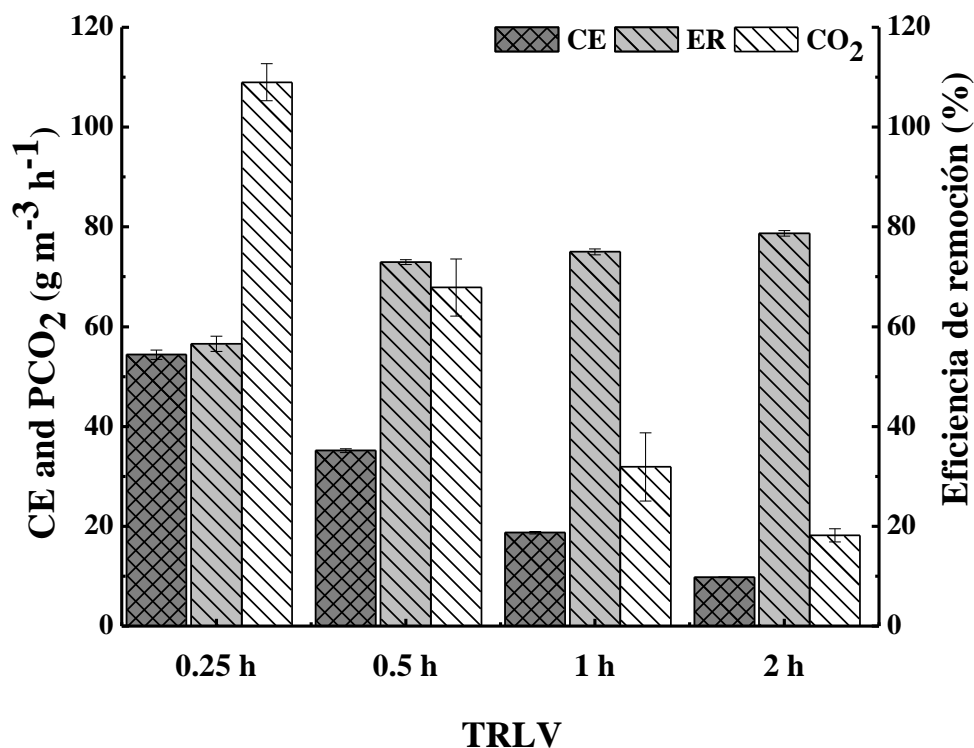


Figura 4.2.3. Desempeño del reactor bajo diferentes TRLV con una relación $Q_R/Q= 15$.

Un incremento en la relación PCO_2/CE (1.8 veces mayor, comparado con la misma relación de 15 Q_R/Q para TRLV anteriores) indicó un probable incremento en la respiración endógena, provocada por un fuerte estrés relacionado con la alta turbulencia a un TRLV de 15 minutos. Estudios previos han reportado que altas turbulencias inducen un daño en la membrana y un impacto negativo en el desempeño del tratamiento de gases (Toma y col. 1991). Adicionalmente, las bacterias Gram-negativas como *M. hirsuta*, muestran sensibilidad al esfuerzo de corte, razón que podría limitar el desempeño en los biorreactores para el tratamiento de CH_4 (Lindner y col. 2007). Este hecho se observó claramente en este estudio promoviendo una disminución en la remoción de metano. Es interesante destacar que todos los experimentos se realizaron con limitaciones de transferencia de masa, lo que ocurrió a concentraciones $> 1 \text{ g L}^{-1}$ de biomasa.

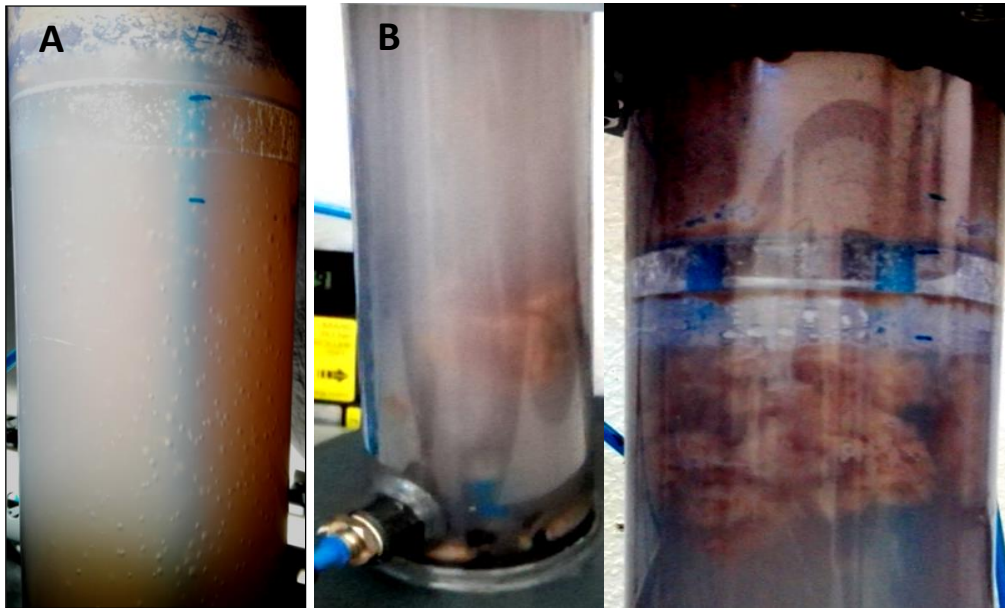


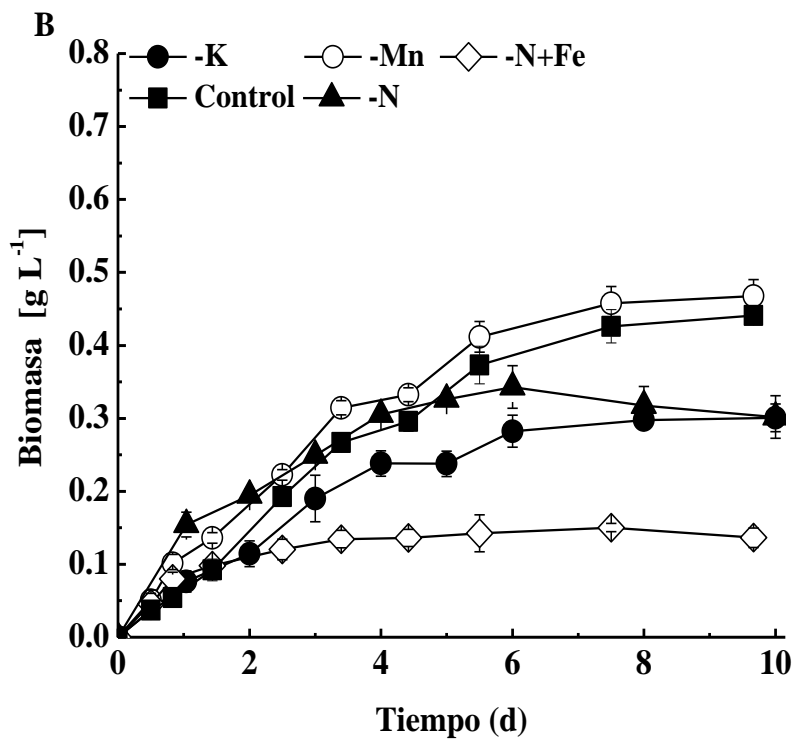
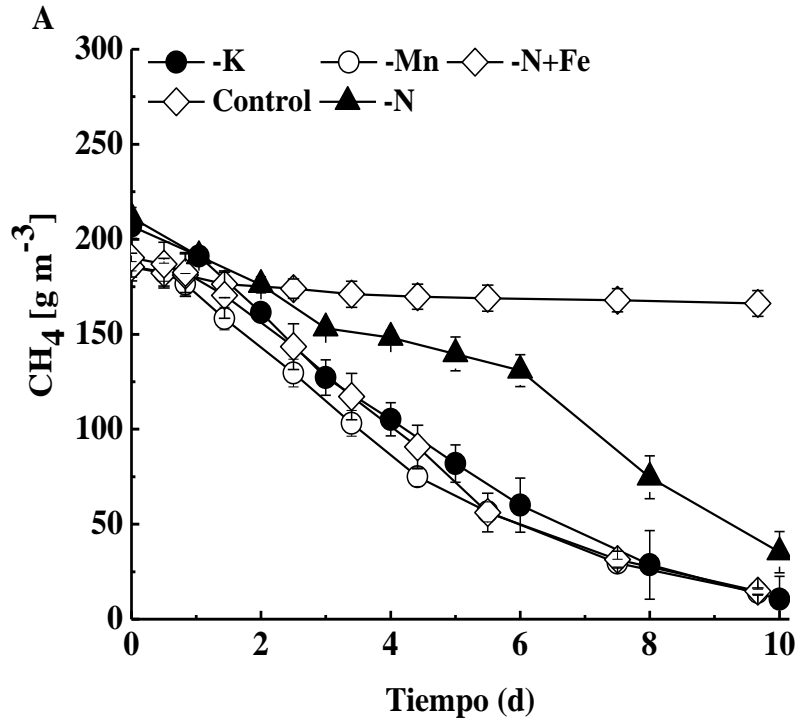
Figura 4.4. Imágenes del estado de la biomasa en el reactor, en suspensión, TRLV= 30 minutos (A), en forma de agregados, TRLV=15 minutos (B). Tasa de recirculación de la fase gas, 15 veces el flujo global del reactor.

Se ha demostrado que la fuente de nitrógeno puede agotarse conforme se incrementa en tiempo de operación de los reactores y esto limita el desempeño del sistema (Estrada y col. 2014). Por lo tanto, la tasa de dilución aplicada al reactor en este estudio (0.1 d^{-1}) ayudó a prevenir el agotamiento de la fuente de nitrógeno registrando las menores concentraciones

($146 \pm 1.8 \text{ mgNT L}^{-1}$) cuando el reactor se operó con el TRLV más bajo (15 min) y a una relación de $Q_R/Q= 15$, sin mostrar un decaimiento atribuido a la falta de este nutriente.

4.5.2. Influencia de la limitación de macro y micronutrientes en la acumulación de P3HB en experimentos por lote.

El consumo de metano se llevó a cabo durante 15 días sin limitación y durante 10 días bajo diferentes condiciones de limitación de macro y micronutrientes. El rendimiento de biomasa para la prueba control fue de $0.63 \pm 0.04 \text{ g}_X \text{ gCH}_4^{-1}$ con un contenido celular de P3HB de $7.8 \pm 1.0 \%$. La degradación de metano bajo limitación de nutrientes indujo una rápida acumulación de P3HB y un crecimiento microbiano consistente con el consumo de CH_4 , para cada condición de limitación de nutrientes (**Figura 4.5: A, B y C**). Los resultados obtenidos para cada condición evaluada mostraron que al privar a las células de un micronutriente como Mn únicamente solamente se indujo una acumulación de PHB de $8.1 \pm 1.1 \%$ (*p/p*) además, de un rendimiento celular también muy similar al experimento control ($0.68 \pm 0.02 \text{ g}_X \text{ gCH}_4^{-1}$). Por otro lado, con la limitación de potasio se obtuvo un ligero incremento en el % de acumulación de P3HB ($12.5 \pm 1.1 \%$) con $0.38 \pm 0.02 \text{ g}_X \text{ gCH}_4^{-1}$ durante la fase de estado estacionario (**Figura 4.8B**). Ambas condiciones de limitación no afectaron la tasa de consumo de metano y la tasa de producción de CO_2 , los cuales presentaron valores análogos al control (**Figura 4.6**). Aunque se obtuvo una mayor acumulación de P3HB comparado con la limitación de Mn, el contenido de P3HB con limitación K fue 2 veces menor que lo reportado en la literatura para el género *Methylocystis* sp., lo cual se atribuye a que la composición del medio mineral utilizado fue diferente al reportado en el estudio (Helm y col. 2008). Además, la tasa de consumo específico ($\text{gCH}_4 \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$) si mostró diferencia respecto a los valores obtenidos para el experimento con K, Mn y el control, siendo menor la de potasio, mientras que la velocidad máxima de consumo de CH_4 fue muy similar para las tres condiciones (**Figura 4.6 y Figura 4.7**).



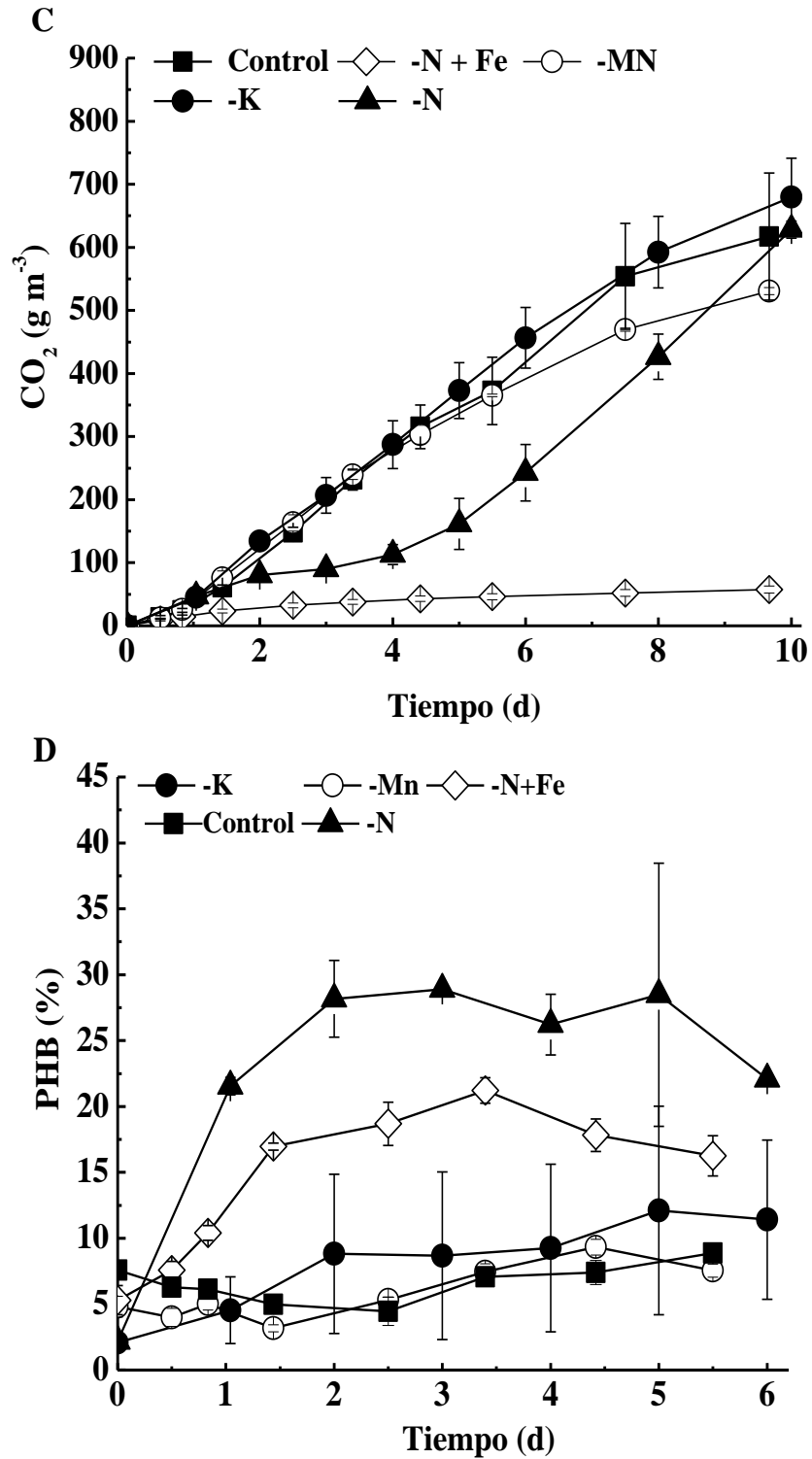


Figura 4.5. Concentración en el tiempo de (A) CH₄, (B) biomasa, (C) CO₂ y (D) P3HB durante el cultivo de *M. hirsuta* bajo limitación de nitrógeno, potasio, manganeso y hierro con limitación de nitrógeno, y experimento control.

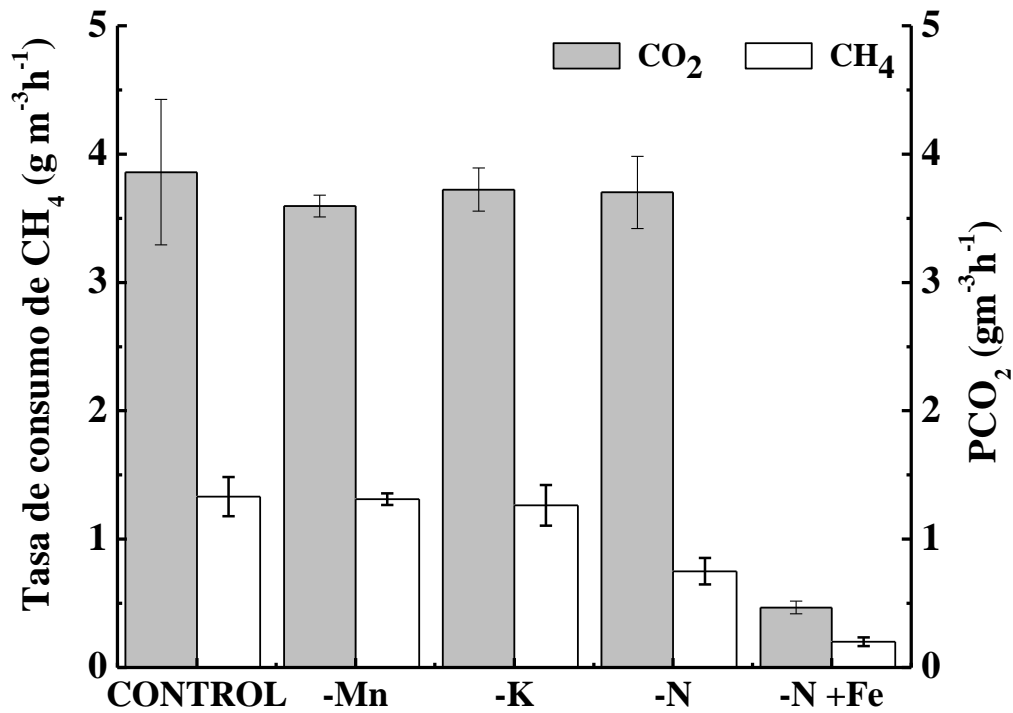


Figura 4.6 influencia de la limitación de nutrientes sobre la tasa máxima volumétrica de consumo de CH₄ y tasa máxima volumétrica de producción de CO₂ por *M. hirsuta* en cultivo en lote.

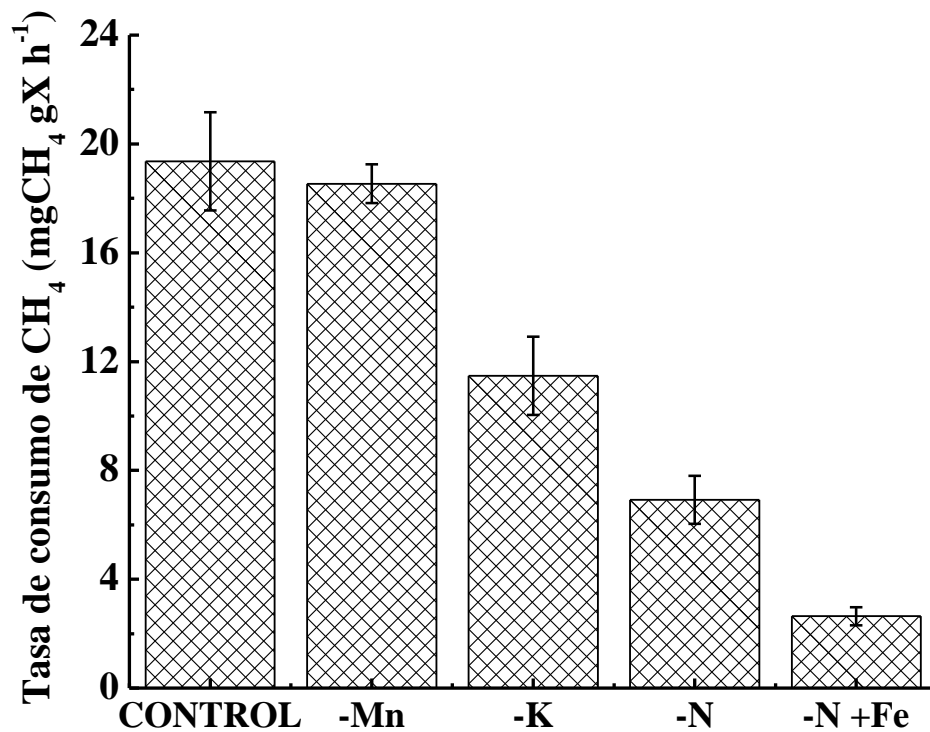


Figura 4.7 influencia de la limitación de nutrientes sobre la tasa específica de consumo de CH₄ para *M. hirsuta*.

La limitación de N mostró un claro incremento en la acumulación de P3HB ($28.0 \pm 1.2 \%$) con concentraciones de biomasa similares a la limitación con K, pero con una tasa de consumo de CH_4 menor a la obtenida sin K (**Figura 4.5D** a **Figura 4.7**). No obstante, los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado en la literatura, donde la limitación de N generó altos porcentajes de acumulación de P3HB con especies metanotróficas pertenecientes a los géneros *Methylocystis* y *Methylosinus* (Helm y col. 2008; Pieja y col. 2012; Zhang y col. 2008). Finalmente, la limitación de N con exceso de hierro indujo una acumulación de P3HB de $19.2 \pm 1.8 \%$ mayor a la registrada para Mn y K, pero 1.4 veces menor a la alcanzada con la sola limitación de N, además, de registrar la menor tasa de consumo de CH_4 , concentración de biomasa, producción de CO_2 y tasa de consumo específica de CH_4 respecto a las demás condiciones. Este hallazgo sugiere que la presencia de altas concentraciones de Fe induce una inhibición microbiana en *M. hirsuta*. Estudios previos indicaron que se requieren concentraciones de Fe^{2+} de 40-80 μM para una actividad MMO efectiva, mientras que tanto Fe^{2+} como Cu^{2+} (ambos presentes en el MSM en este estudio) son cofactores importantes en el metabolismo de los metanótrofos (Karthikeyan y col. 2015). Sin embargo, la presencia de Cu^{2+} podría promover la formación de peróxido de hidrógeno, que puede reaccionar con Fe^{2+} a altas concentraciones y producir radicales libres como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), inhibidor de la actividad microbiana, especialmente cuando ésta se encuentra en suspensión, ya que no cuenta con la protección que puede tener cuando forma biopelícula (Sun y col. 2011) explicando los resultados obtenidos bajo la condición de limitación de un macronutriente como el N y el exceso de un micronutriente como el Fe.

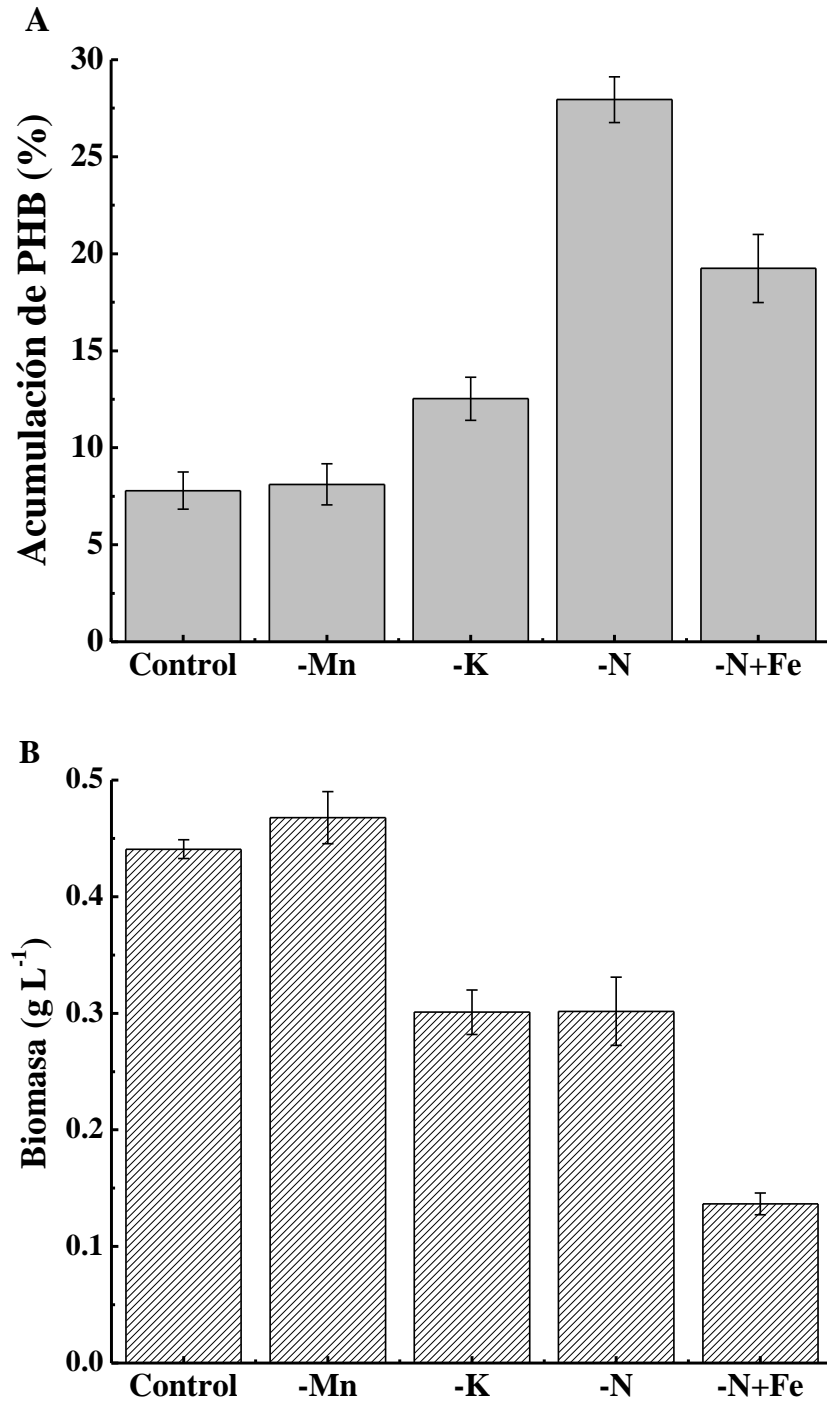


Figura 4.8 influencia de la limitación de nutrientes sobre la acumulación de P3HB (A) y concentración final de biomasa en los experimentos por lote (B).

4.6. CONCLUSIONES

La implementación de la estrategia de recirculación interna de la fase gas en un BCB resultó en un incremento en el desempeño para la eliminación de CH₄ por encima de una etapa sin recirculación de la fase gas, para los 4 TRLVs aquí estudiados. Lo anterior como resultado del desacoplamiento entre el TRLV y la turbulencia generada que ayudó a un mejor transporte de masa gas-líquido. El aumento en la tasa de recirculación del gas provocó un aumento concomitante tanto en la CE como en la PCO₂ (independientemente del TRLV), mientras que la disminución del TRLV de 120 min a 30 min aumentó la CE sin un deterioro significativo en la ER.

Durante la acumulación de P3HB en lote se observó que un incremento en el contenido de hierro en conjunto con la limitación de nitrógeno no favoreció el consumo de metano ni la acumulación de P3HB con *M. hirsuta* afectando el crecimiento celular, producción de CO₂ y consumo de CH₄, comparado con la implementación de la sola limitación de nitrógeno donde se alcanzó un 28 % de P3HB con tasas de consumo de CH₄ similares a las obtenidas bajo las otras limitaciones probadas. De esta forma, la sola limitación de N en experimentos en lote se identificó como la limitación de nutrientes más eficaz para inducir la síntesis de P3HB (comparado con K, Mn y N en exceso de Fe).

4.7. RECOMENDACIONES

Implementar la producción y recuperación de bioplásticos (PH3B) de forma continua y en conjunto con la eliminación de metano en un BCB, evaluando diferentes escenarios de limitación de nutrientes para alcanzar altos porcentajes de acumulación de bioplásticos, así como, establecer tiempos adecuados de limitación de forma que no se vea afectada la capacidad de eliminación de CH₄ y se logren obtener altas capacidades y eficiencias de remoción en conjunto con altas productividades de PH3B.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

En este trabajo se investigaron diversas problemáticas que se presentan en los sistemas de biofiltración, tales como la acumulación de biomasa en exceso en el lecho filtrante, la influencia del pH sobre la eliminación de MeOH la efectividad de dos oxidantes como O₃ y H₂O₂ en la remoción de la biomasa en exceso, así como el efecto del ozono sobre la actividad microbiana. Se investigó también la eliminación de H₂S a altas concentraciones bajo condiciones de acidez extrema y la relación de la eliminación de H₂S con el consumo de CO₂, adicionalmente se evaluó el efecto de bajas concentraciones de O₃ sobre la eliminación global de H₂S.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones.

Ambos reactores (R1 y R2) fueron capaces de eliminar los contaminantes de estudio (MeOH-H₂S y H₂S) alcanzando eficiencias de remoción > 99.9 % con cargas similares o superiores a las reportadas en la literatura.

El pH jugó un papel importante tanto en la eliminación de metanol en el reactor R1, así como en la eliminación de H₂S en R2, donde se logró eliminar concentraciones superiores a 600 ppm_v de H₂S.

Se probó la efectividad del uso de oxidantes en la remoción de biomasa en exceso bajo condiciones ácidas, demostrando que el ozono fue más efectivo cuando se alimentó a altas concentraciones, sin embargo, la adición de ozono a bajas concentraciones seguido de la adición de H₂O₂ también mostró una alta efectividad para recuperar el desempeño del sistema removiendo la biomasa en exceso en R1. De manera interesante, se encontró que el ozono a altas concentraciones causó un daño parcial al material de empaque (PUF), algo que hay que tomar en cuenta para su aplicación bajo las condiciones estudiadas. Por otro lado, el ozono solo mostró un ligero efecto negativo sobre el desempeño en R2, esto se atribuyó principalmente a la alta selectividad que presenta el ozono a pHs ácidos. En este

mismo sistema se encontró una relación lineal entre la eliminación de H₂S y el consumo de CO₂ y una corta afectación por la concentración de H₂S alimentada permitiendo remover concentraciones de H₂S superiores a las reportadas en la literatura, en condiciones de operación similares.

En una segunda etapa del trabajo se investigó la puesta en marcha de un biorreactor de columna de burbujeo, con la finalidad de incrementar la transferencia de masa y eliminar un compuesto poco soluble donde como CH₄. Se estudió el efecto de la recirculación de la fase gas a diferentes tasas de recirculación y diferentes TRLV, obteniendo las siguientes conclusiones

La implementación de recirculación de la fase gas en un BCB mostró ser una estrategia efectiva para la eliminación de corrientes diluidas de CH₄, facilitando la eliminación de bajas concentraciones de CH₄. Se encontró que a mayor tasa de recirculación, la CE de eliminación y la tasa de producción de CO₂ fueron mayores para todos los TRLVs probados (120, 60, 30 y 15 minutos). Los resultados mostraron una mayor eficiencia de remoción con un TRLV de 30 minutos y una relación $Q_R/Q= 15$, siendo este tiempo donde además, de eliminar una mayor cantidad de CH₄, el sistema mostró una mayor estabilidad en todo el periodo de operación, ya que después de este tiempo y relación de recirculación, el sistema se fue afectado biológicamente por la alta turbulencia.

Los tres sistemas estudiados en este trabajo presentan resultados favorables para la eliminación de tres diferentes compuestos.

5.2. RECOMENDACIONES

Los alcances de este trabajo permitieron comprender un poco más el desempeño de los sistemas de tratamiento de aire. Sin embargo, también surgen nuevas preguntas a contestar, por lo que a partir de los resultados obtenidos, se recomienda ampliar el estudio de la efectividad de los oxidantes para la remoción de biomasa de forma que, el uso de oxidantes no solo sea implementado para revertir la biomasa en exceso en los sistemas de biofiltración. Sino también puedan usarse como método de control que permita una operación prolongada de los reactores sin afectar su desempeño. Para ello se recomienda

estudiar el efecto de la alimentación de oxidantes como método preventivo al crecimiento excesivo de biomasa implementando un sistema control, así como realizar experimentos con diferentes concentraciones de ozono y peróxido de hidrógeno para estudiar el efecto de estos oxidantes sobre biopelículas microbianas sulfooxidantes en sistemas de biofiltración de forma que se pueda implementar un sistema que sea económica y ambientalmente viable.

Respecto a la eliminación de CH_4 también surgen nuevas inquietudes acerca de cómo mejorar los sistemas de forma que permitan obtener altas tasas de eliminación de este compuesto. En este sentido, se recomienda implementar la producción y recuperación de bioplásticos (P3HB) con un medio de sales minerales diferentes, para optimizar la producción en lote y después implementar la producción de P3HB de forma continua y en conjunto con la eliminación de CH_4 , evaluando diferentes escenarios de limitación de nutrientes y tiempos de limitación, de forma que se puedan obtener una alta productividad de P3HB sin deteriorar la capacidad de eliminación y la eficiencia de remoción de CH_4 .

6. REFERENCIAS

- Adams**, C.D. y Gorg, S. (2002) Effect of pH and gas-phase ozone concentration on the decolorization of common textile dyes. *Journal of Environmental Engineering* 128 (3), 128(3).
- Aita**, B.C., Mayer, F.D., Muratt, D.T., Brondani, M., Pujol, S.B., Denardi, L.B. and Silveira, D.D. (2016) Biofiltration of H₂S-rich biogas using *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Clean Technologies and Environmental Policy* 18(3), 689-703.
- Alcántara**, S., Velasco, A., Revah, S. (2004) Sulfur formation by steady-state continuous cultures of a sulfoxidizing consortium and *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645. *Environmental Technology* 25 (10), 1151-1157.
- Alfonsin**, C., Hernández, J., Omil, F., Prado, O.J., Gabriel, D., Feijoo, G. and Moreira, M.T. (2013) Environmental assessment of different biofilters for the treatment of gaseous streams. *Journal of Environmental Management* 129, 463-470.
- Anet**, B., Couriol C., Lendormi T., Amrane, A., Le Cloirec, P., Cogny G., Fillières, R. (2013) Characterization and selection of packing materials for biofiltration of rendering odourous emissions. *Water Air Soil Pollution* 224, 1622.
- Anjum**, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N. and Tabasum, S. (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* 89, 161-174.
- APHA** (2005) *Standards Methods for the Examination of Water of Wastewater*, twentyfirst ed., American Public Health Association-American Water Works. Association-Water Pollution Control Federation (AWWA-WPCF) Washington, DC.
- Arellano-García**, L., Dorado, D.A., Morales-Guadarrama, A., Sacristan, E., Gamisans, X., Revah, S. (2015) Modeling the effects of biomass accumulation on the performance of a biotrickling filter packed with PUF support for the alkaline biotreatment of dimethyl disulfide vapors in air. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (1), 97-107.
- Arellano-García**, L., González-Sánchez, A., Baquerizo, G., Hernández-Jiménez, S., Revah, S. (2010) Treatment of carbon disulfide and ethanethiol vapors in alkaline

- biotrickling filters using an alkaliphilic sulfo-oxidizing bacterial consortium. *Journal of Chemical. Technology and Biotechnology* 85 (3), 328-335.
- Arriaga**, S. y Revah, S. (2005) Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnology and bioengineering* 90 (1), 107-115.
- Aslanidou**, S., Lydakis-Simantiris, N., Kotsifaki, C., Pentari, D., Katsivela, E. (2008). Ferric chloride (FeCl_3) as regulatory agent for the reduction of hydrogen sulfide (H_2S) in municipal wastewater. In *Proceedings of the International Conference on the Protection and Restoration of the Environment IX*.
- Auria**, R., Frere, G., Morales, M., Acuna, M.E. and Revah, S. (2000) Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnology and Bioengineering* 68 (4), 448-455.
- Barcón**, T., Alonso-Gutiérrez, J., Omil, F. (2012) Molecular and physiological approaches to understand the ecology of methanol degradation during the biofiltration of air streams. *Chemosphere* 87, 1179-1185.
- Bayrakdar**, A., Tilahun, E., Calli, B. (2016) Biogas desulfurization using autotrophic denitrification process. *Applied Microbiology Biotechnology* 100, 939-948.
- Bertoldi**, S., Farè, S., j., H.H., Tanzi, M.C. (2015) Exploiting novel sterilization techniques for porous polyurethane scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26 (5), 182.
- Boncz**, M.A. (2002) Selective oxidation of organic compounds in waste water by ozone-based oxidation processes, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Bugnicourt**, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, A.V. (2015) *Handbook of Sustainable Polymers Processing and Applications*, pp. 899-927, Pan Stanford.
- Canadell**, J.G., Le Quéré, C., Raupach, R., M., Field, B., C., Buitenhuis, T., E., Ciais, P., Conway, J., T. (2007) Contributions to accelerating atmospheric CO_2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *PNAS* 104 (47), 18866-18870.
- Cárdenas**, B., Revah, S., Hernández-Jiménez, S., Martínez., A., Gutiérrez V. (2003) *Tratamiento biológico de compuestos orgánicos volátiles de fuentes fijas*. INE-SEMARNAT, México. ISBN: 968-817-499-8.

- Carvalho, G., Nopens, I., Novais, J.M., Vanrolleghem, P.A., Pinheiro, H.M. (2001)** Modelling of activated sludge acclimisation to a non-ionic surfactant. *Water Science and Technology* 43 (7), 9-17.
- Cercado, B., Auria, R., Cárdenas, B., Revah, S. (2012)** Characterization of artificially dried biofilms for air biofiltration studies. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 47 (7), 940-948.
- Chaiprapat, S., Mardthing, R., Kantachote, D. and Karnchanawong, S. (2011)** Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. *Process Biochemistry* 46 (1), 344-352.
- Christensen, B., Naper, T., Vollan, K., Smidsrod, O., Bake, R. (1990)** Biofilm removal by low concentration of hydrogen peroxide. *Biofouling* 2 (2), 165-175.
- Chung, Y.-C., Lin, Y.-Y., Tseng, C.-P. (2004)** Operational characteristics of effective removal of H₂S and NH₃ waste gases by activated carbon biofilter. *Journal of the Air and Waste Management Association* 54 (4), 450-458.
- Cox, H.H.J. y Deshusses, M.A. (1999)** Chemical removal of biomass from waste air biotrickling filters: screening of chemicals of potential interest. *Water Research* 33(10).
- Deshusses, M.A. y Gabriel, D. (2005)** Biotechnology for odor and air pollution control. Shareefdeen, Z., Singh, A. (eds), pp. 147-168, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Detchanamurthy, S. y Gostomski, P.A. (2012)** Biofiltration for treating VOCs: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 11 (3), 231-241.
- Ding, Y., Das, K.C., Whitman, W.B., Kastner, J.R. (2006)** Enhanced biofiltration of hydrogen sulfide in the presence of methanol and resultant bacterial diversity. *Transactions of the ASABE* 49 (6), 2051-2059.
- Duan, J., Kasper, L. D. (2011)** oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology* 21 (4), 401-409.
- du Plessis, C.A., Strauss, J.M., Sebapalo, E.M.T., Riedel, K.H.J. (2003)** Empirical model for methane oxidation using a composted pine bark biofilter. *Fuel* 82 (11), 1359-1365.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350-356.
- Dumars, C.T. y Delrio, S.B. (1988)** A survey of the air and water-quality laws of México. *Natural Resources Journal* 28 (4), 787-813.
- Egli, T. y Fiechter, A. (1981)** Theoretical-analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *Journal of General Microbiology* 123, 365-369.
- Estrada, J.M., Hernández, S., Muñoz, R., Revah, S. (2013)** A comparative study of fungal and bacterial biofiltration treating a VOC mixture. *Journal of Hazardous Materials* 250-251, 190-197.
- Estrada, J.M., Lebrero, R., Quijano, G., Perez, R., Figueroa-Gonzalez, I., Garcia-Encina, P.A., Munoz, R. (2014)** Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chemical Engineering Journal* 253, 385-393.
- Fakruddin, M. and Mannan, K.S.B. (2013)** Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon Journal of Science* 42 (1), 19-33.
- FASEB (2010)** Federation of American Societies for Experimental Biology. Mexico City air pollution adversely affects the hearts of young people. *ScienceDaily*. From www.sciencedaily.com/releases/2010/04/100428153256.htm
- Ferdowsi, M., Avalos-Ramirez, A., Jones, P., Heitz, M. (2017)** Elimination of mass transfer and kinetic limited organic pollutants in biofilters: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 119, 336-348.
- Ferdowsi, M., Veillette, M., Ramirez, A.A., Jones, J.P., Heitz, M. (2016)** Performance evaluation of a methane biofilter under steady state, transient state and starvation conditions. *Water Air and Soil Pollution* 227(6): 168.
- Filho, J.L.R.P., Sader, L.T., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., Silva, E.L. (2010)** Performance evaluation of packing materials in the removal of hydrogen sulphide in gas-phase biofilters: Polyurethane foam, sugarcane bagasse, and coconut fibre. *Chemical Engineering Journal* 158 (3), 441-450.

- Ganendra, G., Mercado-García, D., Hernandez-Sanabria, E., Boeckx, P., Ho, A., Boon, N.** (2015) Methane biofiltration using autoclaved aerated concrete as the carrier material. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (17), 7307-7320.
- García-Pérez, T., Aizpuru, A., Arriaga, S.** (2013) By-passing acidification limitations during the biofiltration of high formaldehyde loads via the application of ozone pulses. *Journal of Hazardous Materials* 262(0), 732-740.
- Ghoshal, A.K. and Manjare, S.D.** (2002) Selection of appropriate adsorption technique for recovery of VOCs: an analysis. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries* 15 (6), 413-421.
- Giri, B.S., Kim, K.H., Pandey, R.A., Cho, J., Song, H., Kim, Y.S.** (2014) Review of biotreatment techniques for volatile sulfur compounds with an emphasis on dimethyl sulfide. *Process Biochemistry* 49 (9), 1543-1554.
- Gómez-Cuervo, S., Hernández, J. and Omil, F.** (2016) Identifying the limitations of conventional biofiltration of diffuse methane emissions at long-term operation. *Environmental Technology* 37 (15), 1947-1958.
- González-Sánchez, A. and Revah, S.** (2007) The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 292-298.
- González-Sánchez, A., Revah, S., Deshusses, M.A.** (2008) Alkaline biofiltration of H₂S odors. *Environmental Science and Technology* 42 (19), 7398-7404.
- Gosselin, F., Madeira, L.M., Juhna, T., Block, J.C.** (2013) Drinking water and biofilm disinfection by Fenton-like reaction. *Water Research* 47 (15), 5631-5638.
- Griebler, C. y Slezak, D.** (2001) Microbial activity in aquatic environments measured by dimethyl sulfoxide reduction and intercomparison with commonly used methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1), 100-109.
- Guieysse, B., Hort, C., Platel, V., Muñoz, R., Ondarts, M., Revah, S.** (2008) Biological treatment of indoor air for VOC removal: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* 26, 398-410.
- Helm, J., Wendlandt, K.D., Jechorek, M., Stottmeister, U.** (2008) Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-β-hydroxybutyrate in

- a methane-utilizing mixed culture. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1054-1061.
- Hernández-Garduño**, E.P.-N., J.Paccagnella, A. M.Piña-García, M. A.Munguía-Castro, M.Catalán-Vázquez, M.Rojas-Ramos, M. (1997) Air pollution and respiratory health in Mexico City. *Journal of Occupational & Environmental Medicine* 39(4), 299-307.
- Hoefman**, S., van der Ha, D., Boon, N., Vandamme, P., De Vos, P., Heylen, K. (2014) Niche differentiation in nitrogen metabolism among methanotrophs within an operational taxonomic unit. *Bmc Microbiology* 14, 11.
- Host**, O., Lundbäck, H., Mattiasson B. (1985) Hydrogen peroxide as an oxygen source for immobilized *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22 (6), 383-388.
- Hu**, J., Wang, L., Zhang, S., Fu, X., Y., L. (2010) Optimization of electron donors to improve CO₂ fixation efficiency by a non-photosynthetic microbial community under aerobic condition using statistical experimental design. *Bioresource Technology* 101, 7062-7067.
- Iwase**, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K., Mizunoe, Y. (2013) A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Scientific Reports* 3:3081
- Jaber**, B., Couvert, M., Amrane, A., Rouxel, F., Le Cloirec, P. and Dumont, E. (2016) Biofiltration of high concentration of H₂S in waste air under extreme acidic conditions. *New Biotechnology* 33 (1), 136-143.
- Jin**, Y., Veiga, M.C., Kennes, C. (2005a) Autotrophic deodorization of hydrogen sulfide in a biotrickling filter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(9), 998-1004.
- Jin**, Y., Veiga, M.C., Kennes, C. (2007) Co-treatment of hydrogen sulfide and methanol in a single-stage biotrickling filter under acidic conditions. *Chemosphere* 68 (6), 1186-1193.
- Jin**, Y.M., Veiga, M.C., Kennes, C. (2005b) Effects of pH, CO₂, and flow pattern on the autotrophic degradation of hydrogen sulfide in a biotrickling filter. *Biotechnology and Bioengineering* 92 (4), 462-471.

- Jin**, Y.M., Veiga, M.C., Kennes, C. (2008) Removal of methanol from air in a low-pH trickling monolith bioreactor. *Process Biochemistry* 43 (9), 925-931.
- Johson**, D.B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 307-317
- Kantarci**, N., Borak, F., O., K., Ulgen, K.O. (2005) Review: Bubble column reactors. *Process Biochemistry* 40 (7), 2263-2283.
- Karuppiyah**, J., Reddy, E.L., Reddy, P.M.K., Ramaraju, B., Karvembu, R., Subrahmanyam, C. (2012) Abatement of mixture of volatile organic compounds (VOCs) in a catalytic non-thermal plasma reactor. *Journal of Hazardous Materials* 237, 283-289.
- Kennes**, C. y Thalasso, F. (1998) Waste gas biotreatment technology. *Journal Chemical Technology and Biotechnololy* 72, 303-319.
- Khadre**, M.A., Yousef, A.E., and Kim , J.-G. (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food on Sience* 66 (9), 1242-1252.
- Khan**, F.I. y Ghoshal, A.K. (2000) Removal of volatile organic compounds from polluted air. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries* 13 (6), 527-545.
- Khosravi-Darani**, K., Mokhtari, Z.B., Amai, T., Tanaka, K. (2013) Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C-1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (4), 1407-1424.
- Kim**, J.H., Rene, E.R. and Park, H.S. (2008) Biological oxidation of hydrogen sulfide under steady and transient state conditions in an immobilized cell biofilter. *Bioresource Technology* 99 (3), 583-588.
- Kim**, S. y Deshusses, M.A. (2005) Understanding the limits of H₂S degrading biotrickling filters using a differential biotrickling filter. *Chemical Engineering Journal* 113 (2-3), 119-126.
- Ko**, F.W. y Hui, D.S. (2012) Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 17, 395-401.
- Koneswaran**, G. y Nierenberg, D. (2008) Global farm animal production and global warming: Impacting and mitigating climate change. *Environmental Health Perspectives* 116 (5), 578-582.
- Kraakman**, N.J.R., Rocha-Rios, J., van Loosdrecht (2011) Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 873-886.

- Kumar, S., Kumar, R. A., Munshi, P., Khanna, A. (2012)** Gas hold-up in three phase co-current bubble columns. *Procedia Engineering* 42, 782-794
- Kunasundari, B., Arza, C.R., Maurer, F.H.J., Murugaiyah, V., Kaur, G., Sudesh, K. (2017)** Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. *Separation and Purification Technology* 172, 1-6.
- Kwon, J., Weisel, C.P., Morandi, M.T., Stock, T.H. (2016)** Source proximity and meteorological effects on residential outdoor VOCs in urban areas: Results from the Houston and Los Angeles RIOPA studies. *Science of the Total Environment* 573, 954-964.
- Lauderdale, C., Chadik, P., Kirisits, M.J., Brown, A.J. (2012)** Engineered biofiltration: Enhanced biofilter performance through nutrient and peroxide addition. *Journal - American Water Works Association* 104(5), E298-E309.
- Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J.M. and Muñoz, R. (2015)** Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: Exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *Journal of Environmental Management* 151, 124-131.
- Lee, E.Y., Cho, K.-S., Ryu, H.W. (2005)** Simultaneous removal of H₂S and NH₃ in biofilter inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* TAS. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (100), 611-615.
- Lee, E.Y., Lee, N.Y., Cho, K.-S., Ryu, H.W. (2006)** Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (4), 309-314.
- Lewis, R.J. and Copley, G.B. (2015)** Chronic low-level hydrogen sulfide exposure and potential effects on human health: A review of the epidemiological evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 45 (2), 93-123.
- Li, B., Xu, X., Zhu, L. (2010)** Catalytic ozonation-biological coupled processes for the treatment of industrial wastewater containing refractory chlorinated nitroaromatic compounds. *Journal of Zhejiang University Science B* 11 (3), 177-189.
- Lindner, A.S., Pacheco, A., Aldrich, H.C., Staniec, A.C., Uz, I., Hodson, D.J. (2007)** *Methylocystis hirsuta* sp nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1891-1900.

- López, J.C., Quijano, G., Perez, R. and Muñoz, R. (2014)** Assessing the influence of CH₄ concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure. *Journal of Environmental Management* 146, 116-123.
- López, J.C., Quijano, G., Souza, T.S.O., Estrada, J.M., Lebrero, R., Muñoz, R. (2013a)** Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (6), 2277-2303.
- Lopez, L.R., Dorado, A.D., Mora, M., Gamisans, X., Lafuente, J., Gabriel, D. (2016)** Modeling an aerobic biotrickling filter for biogas desulfurization through a multi-step oxidation mechanism. *Chemical Engineering Journal* 294, 447-457.
- López, M.E., Rene, E.R., Malhautier, L., Rocher, J., Bayle, S., Veiga, M.C., Kennes, C. (2013b)** One-stage biotrickling filter for the removal of a mixture of volatile pollutants from air: Performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology* 138, 245-252.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1), 265-275.
- Macalady, J.L., McMillan, A.M.S., Dickens, A.F., Tyler, S.C., Scow, K.M. (2002)** Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environmental Microbiology* 4 (3), 148-157.
- Mannucci, A., Munz, G., Mori, G., Lubello, C. (2012)** Biomass accumulation modelling in a highly loaded biotrickling filter for hydrogen sulphide removal. *Chemosphere* 88 (6), 712-717.
- Martínez, A., Rathibandla, S., Jones, K., Cabezas, J. (2008)** Biofiltration of wastewater lift station emissions: evaluation of VOC removal in the presence of H₂S. *Clean Technologies and Environmental Policy* 10 (1), 81-87.
- Masau, R.J.Y., Oh, J.K., Suzuki, I. (2001)** Mechanism of oxidation of inorganic sulfur compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology* 47 (4), 348-358.
- McMichael, A.J. (2003)** Global climate change and health: an old story writ large. *Climate change and human health: Risks and responses*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

- McMichael**, A.J. y Lingren, E. (2011) Climate change: present and future risks to health, and necessary responses. *Journal of Internal Medicine* 270 (5), 401-413.
- McMillan**, A. y Foley, G. (2014) *Air Quality Management: Canadian Perspectives on a Global Issue*. Taylor, E. and McMillan, A. (eds), pp. 19-42, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Mendoza**, J.A., Prado, O.J., Veiga, M.C., Kennes, C. (2004) Hydrodynamic behaviour and comparison of technologies for the removal of excess biomass in gas-phase biofilters. *Water Research* 38 (2), 404-413.
- Meng**, L., Xi, J.Y., Yeung, M. (2016) Degradation of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludge by low-concentration ozonation. *Chemosphere* 147, 248-255.
- Miller**, A.R. (1986) Oxidation of cell-wall polysaccharides by hydrogen-peroxide - a potential mechanism for cell-wall breakdown in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141 (1), 238-244.
- Mokhtari-Hosseini**, Z.B., Vasheghani-Farahani, E., Heidarzadeh-Vazifekhoran, A., Shojaosadati, S.A., Karimzadeh, R., Darani, K.K. (2009) Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. *Bioresource Technology* 100 (8), 2436-2443.
- Moussavi**, G. y Mohseni, M. (2007) Using UV pretreatment to enhance biofiltration of mixtures of aromatic VOCs. *Journal of Hazardous Materials* 144 (1-2), 59-66.
- Mudliar**, S., Giri, B., Padoley, K., Satpute, D., Dixit, R. (2010) Bioreactors for treatment of VOCs and odours – A review. *Journal of Environmental Management* 91, 1039-1054.
- Muñoz**, R., Malhautier, L., Fanlo, J.L., Quijano, G. (2015) Biological technologies for the treatment of atmospheric pollutants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95 (10), 950-967.
- Muñoz**, R., Villaverde, S., Guieysse, B., Revah, S. (2007) Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances* 25, 410-422.
- Muriel-García**, M., Cerón-Bretón, R.M., Cerón-Bretón, J.C. (2016) Air pollution in the Gulf of México. *Open Journal of Ecology* 6, 32-46.

- NACAA** (2013) Background and history of EPA regulation of greenhouse gas (GHG) emissions under the clean air act and national association of clean air agencies' comments on: EPA GHG regulatory and policy proposals. Agency, U.S.E.P. (ed), Washington DC.
- Nikiema, J., Bibeau, L., Lavoie, J., Brzezinski, R., Vigneux, J., Heitz, M.** (2005) Biofiltration of methane: an experimental study. *Chemical Engineering Journal* 113 (2-3), 111-117.
- Omri, I., Aouidi, F., Bouallagui, H., Godon, J.J., Hamdi, M.** (2013) Performance study of biofilter developed to treat H₂S from wastewater odour. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20 (2), 169-176.
- Pérez, R.C. y Matin, A.** (1982) Carbon dioxide assimilation by *Thiobacillus novellus* under nutrient-limited mixotrophic conditions. *Journal of Bacteriology* 150 (1), 46-51.
- Pieja, A.J., Sundstrom, E.R., Criddle, C.S.** (2012) Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community. *Bioresource Technology* 107, 385-392.
- Piumetti, M., Fino, D., Russo, N.** (2015) Mesoporous manganese oxides prepared by solution combustion synthesis as catalysts for the total oxidation of VOCs. *Applied Catalysis B: Environmental* 163, 277-287.
- Prenafeta-Boldú, F.X., Illa, J.V.G., J.W., Flotats, X.** (2008) Influence of synthetic packing materials on the gas dispersion and biodegradation kinetics in fungal air biofilters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 319-327.
- Pronk, J.T., Meulenber, R., Van Den Berg, D.J.C., Batenburg-Van Der Vegte, W., Bos, P. Kuenen, J. G.** (1990) Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus Acidophilus* on glucose and thiosulfate. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (11), 3395-3401.
- Rahnema, F., Vasheghani-Farahani, E., Yazdian, F., Shojaosadati, S.A.** (2012) PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 65, 51-56.
- Rakness, K., Gordon, G., Langlais, B., Masschelein, W., Matsumoto, N., Richard, Y., Robson, C.M., Somiya, I.** (1996) Guideline for measurement of ozone concentration

in the process gas from an ozone generator. *Ozone-Science and Engineering* 18 (3), 209-229.

- Rattanapan**, C. y Ounsaneha, W. (2012) Removal of hydrogen sulfide gas using biofiltration - a review. *Walailak Journal of Science and Technology* 9 (1), 9-18.
- Ravin**, N.V., Eldarov, M.A., Kadnikov, V.V., Beletsky, A.V., Schneider, J., Mardanova, E.S., Smekalova, E.M., Zvereva, M.I., Dontsova, O.A., Mardanov, A.V., Skryabin, K.G. (2013) Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14, 20.
- Reddy**, R.L., Reddy, V.S., Gupta, G. A. (2013) Study of Bio-plastics As Green & Sustainable Alternative to Plastics. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 3 (5) 82-89.
- Reij**, M.W., Keurentjes, J.T.F., Hartmans, s. (1998) Membrane bioreactors for waste gas treatment-Minireview. *Journal of Biotechnology* 59, 155-167.
- Rene**, E.R., Estefania López, M., Veiga, M.C., Kennes, C. (2010) Steady- and transient-state operation of a two-stage bioreactor for the treatment of a gaseous mixture of hydrogen sulphide, methanol and α -pinene. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85 (3), 336-348.
- Rene**, E.R., Jin, Y., Veiga, M.C., Kennes, C. (2009) Two-stage gas-phase bioreactor for the combined removal of hydrogen sulphide, methanol and α -pinene. *Environmental Technology* 30 (12), 1261-1272.
- Revah**, S. y Morgan-Sagastume, J.M. (2005) Biotechnology for odor and air pollution control. Shareefdeen , Z. and Singh , A. (eds), pp. 29-63.
- Rice**, R.G. (1999) Ozone in the United States of America - state-of-the-art. *Ozone: Science and Engineering* 21 (2), 99-118.
- Ritz**, B., Yu, F., Fruin, S., Chapa, G., Shaw, G.M., Harris, J.H. (2002) Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *American Journal of Epidemiology* 155 (1), 17-25.
- Rivera-Terceros**, P., Tito-Claros, E., Torrico, S., Carballo, S., Van-Thuoc, D., Quillaguaman, J. (2015) Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 22:8.

- Roncero**, M.B., Queral, M.A., Colom, J.F., Vidal, T. (2003) Why acid pH increases the selectivity of the ozone bleaching processes. *Ozone-Science and Engineering* 25 (6), 523-534.
- Roshani**, B., Torkian, A., Aslani, H., Dehghanzadeh, R. (2012) Bed mixing and leachate recycling strategies to overcome pressure drop buildup in the biofiltration of hydrogen sulfide. *Bioresource Technology* 109, 26-30.
- Ryu**, H.W., Cho, K.S. and Chung, D.J. (2010) Relationships between biomass, pressure drop, and performance in a polyurethane biofilter. *Bioresource Technology* 101 (6), 1745-1751.
- Sempere**, F., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Penya-roja, J.M., Álvarez-Hornos, J. (2008) Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere* 73 (9), 1533-1539.
- Sercu**, B., Nunez, D., Van Langenhove, H., Aroca, G., Verstraete, W. (2005) Operational and microbiological aspects of a bioaugmented two-stage biotrickling filter removing hydrogen sulfide and dimethyl sulfide. *Biotechnology and Bioengineering* 90 (2), 259-269.
- Shaikh** A., Al-Dahha, M. (2013) Scale-up of Bubble Column Reactors: A Review of Current State-of-the-Art. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 52, 8091–8108
- Silva**, J., Morales, M., Cáceres, M., Morales, P., Aroca, G. (2012) Modelling of the biofiltration of reduced sulphur compounds through biotrickling filters connected in series: Effect of H₂S. *Electronic Journal of Biotechnology* 15 (3), 15.
- Sologar**, V.S., Lu, Z., Allen, D.G. (2003) Biofiltration of concentrated mixtures of hydrogen sulfide and methanol. *Environmental Progress* 22 (2), 129-136.
- Son**, Y.-S. (2017) Decomposition of VOCs and odorous compounds by radiolysis: A critical review. *Chemical Engineering Journal* 316, 609-622.
- Strong**, P.J., Xie, S., Clarke, W.P. (2015) Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? *Environmental Science and Technology* 49 (7), 4001- 4018.
- Sun**, H.-q., Lu, X.-m., Gao, P.-j. (2011) The exploration of the antibacterial mechanism of Fe³⁺ against bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 410-414.

- Swaminathan, D.** y PeterAlan, G. (2012) Biofiltration for treating VOCs: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 11 (3), 231-241.
- Syed, M.,** Soreanu, G., Falletta, P., Béland, B. (2006) Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes-A review. *Canadian Biosystem Engineering* 48, 2.
- Tachikawa, M.** y Yamanaka, K. (2014) Synergistic disinfection and removal of biofilms by a sequential two-step treatment with ozone followed by hydrogen peroxide. *Water Research* 64 (0), 94-101.
- Tamboli, D.P.,** Kagalkar, A.N., Jadhav, M.U., Jadhav, J.P., Govindwar, S.P. (2010) Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium* sp. ATM generated after degradation of textile dye Direct Red 5B. *Bioresource Technology* 101 (7), 2421-2427.
- Tol, R.S.J.** (2012) On the uncertainty about the total economic impact of climate change. *Environmental and Resource Economics* 53 (1), 97-116.
- Toma, M.K.,** Ruklisha, M.P., Vanags, J.J., Zeltina, M.O., Leite, M.P., Galinina, N.I., Viesturs, U.E., Tengerdy, R.P. (1991) Inhibition of microbial-growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnology and Bioengineering* 38 (5), 552-556.
- Torkian, A.,** Dehganzadeh, R. Hakimjavadi M. (2003) Biodegradation of aromatic hydrocarbon in a compost biofilter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 98, 795-801.
- Tsang, Y.F.,** Wang, L., Chua, H. (2015) Simultaneous hydrogen sulphide and ammonia removal in a biotrickling filter: Crossed inhibitory effects among selected pollutants and microbial community change. *Chemical Engineering Journal* 281, 389-396.
- Tu, X.,** Li, J., Feng, R., Sun, G., Guo, J. (2016) Comparison of removal behavior of two biotrickling filters under transient condition and effect of pH on the bacterial communities. *PLOS ONE* 11 (5), e0155593.
- von Schneidmesser, E.** y Monks, P.S. (2013) Air quality and climate - synergies and trade-offs. *Environmental Science-Processes and Impacts* 15 (7), 1315-1325.
- Wang, C.,** Xi, J.-Y., Hu, H.-Y., Yao, Y. (2009) Stimulative effects of ozone on a biofilter treating gaseous chlorobenzene. *Environmental Science and Technology* 43 (24), 9407-9412.

- Wei, Z.S., Li, H.Q., He, J.C., Ye, Q.H., Huang, Q.R., Luo, Y.W.** (2013) Removal of dimethyl sulfide by the combination of non-thermal plasma and biological process. *Bioresource Technology* 146, 451-456.
- Xi, J.Y., Saingam, P., Gu, F., Hu, H.Y., Zhao, X.F.** (2016) Effect of continuous ozone injection on performance and biomass accumulation of biofilters treating gaseous toluene (vol 99, pg 33, 2015). *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (7), 3385-3385.
- Yang, C., Chen, H., Zeng, G., Yu, G., Luo, S.** (2010) Biomass accumulation and control strategies in gas biofiltration. *Biotechnology Advances* 28 (4), 531-540.
- Yeom, S.H. and Daugulis, A.J.** (1999) A new method for the determination of microbial activity and critical logP in the presence of organic solvents. *Biotechnology Techniques* 13, 549-553.
- Yeza, A., Fournier, D., Halasz, A., Hawari, J.** (2006) Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (1), 211-218.
- Zehraoui, A., Hassan, A.A., Sorial, G.A.** (2013) Biological treatment of n-hexane and methanol in trickle bed air biofilters under acidic conditions. *Biochemical Engineering Journal* 77 (0), 129-135.
- Zhang, M.M., Wu, H.Y., Chen, H.** (2014) Coupling of polyhydroxyalkanoate production with volatile fatty acid from food wastes and excess sludge. *Process Safety and Environmental Protection* 92 (2), 171-178.
- Zhang, Y., Liss, S.N., Allen, D.G.** (2006) The effects of methanol on the biofiltration of dimethyl sulfide in inorganic biofilters. *Biotechnology and Bioengineering* 95 (4), 734-743.
- Zhang, Y., Liss, S.N., Allen, D.G.** (2007) Effect of methanol on pH and stability of inorganic biofilters treating dimethyl sulfide. *Environmental Science and Technology* 41 (10), 3752-3757.
- Zhang, Y., Xin, J., Chen, L., Song, H., Xia, C.** (2008) Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *Journal of Natural Gas Chemistry* 17 (1), 103-109.

- Zhang**, Y.F., Peng, A.A., Yang, Y., Liu, J.S., Qiu, G.Z. (2013) Isolation, characterization of *Acidiphilium* sp. DX1-1 and ore bioleaching by this acidophilic mixotrophic organism. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 23 (6), 1774-1782.
- Zheng**, C., Shen, J., Zhang, Y., Huang, W., Zhu, X., Wu, X., Chen, L., Gao, X., Cen, K. (2017) Quantitative assessment of industrial VOC emissions in China: Historical trend, spatial distribution, uncertainties, and projection. Atmospheric Environment 150, 116-125.
- Zhou**, Q.W., Zhang, L.L., Chen, J.M., Xu, B.C., Chu, G.W. , Chen, J.F. (2016) Performance and microbial analysis of two different inocula for the removal of chlorobenzene in biotrickling filters. Chemical Engineering Journal 284, 174-181.
- Zhu**, X., Suidan, M., Pruden, A., Yang, Y., Alonso, C., Kim, B., Kim, B. (2004) Effect of Substrate Henry's Constant on Biofilter Performance. Journal of the Air & Waste Management Association 54, 409-418.
- Zúñiga**, C., Morales, M. and Revah, S. (2013) Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. Bioresource Technology 129, 686-689.
- Zúñiga**, C., Morales, M., Le Borgne, S., Revah, S. (2011) Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. Journal of Hazardous Materials 190 (1-3), 876-882.

7. ANEXOS

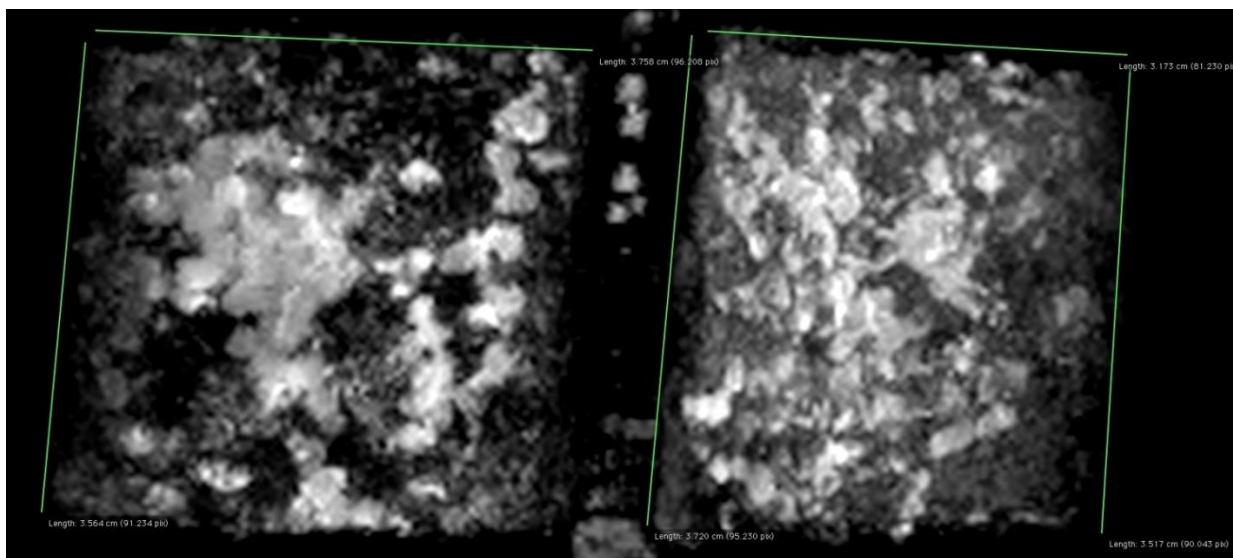


Figura A1. Imagen de RMI donde se muestra la reducción del material de empaque.

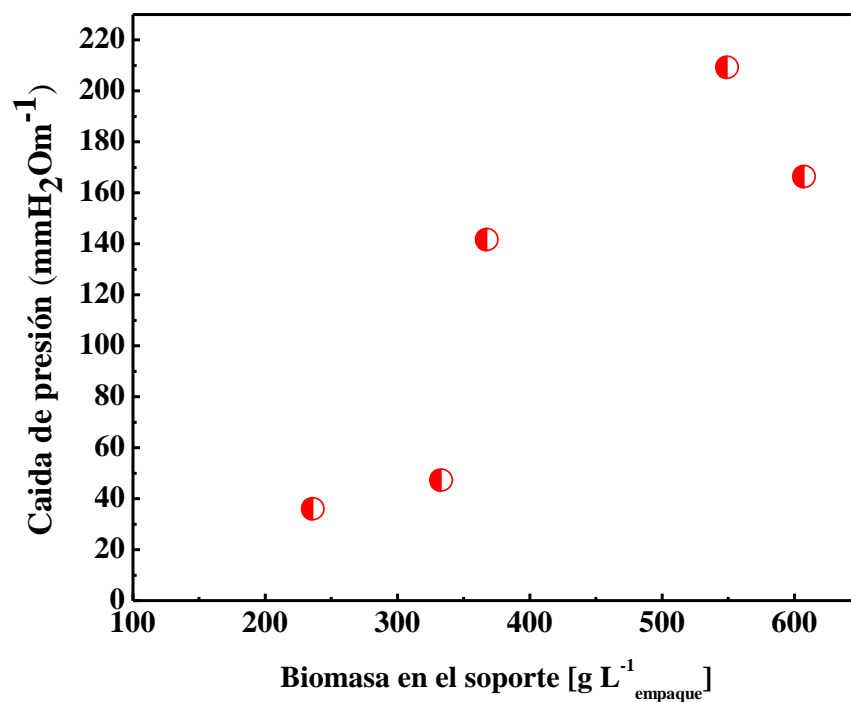


Figura A2. Promedio de los valores de caída de presión en cada etapa de medición de biomasa en el soporte.

Ozone and hydrogen peroxide as strategies to control biomass in a trickling filter to treat methanol and hydrogen sulfide under acidic conditions

Teresa García-Pérez¹ · Sylvie Le Borgne² · Sergio Revah² 

Received: 23 April 2016 / Revised: 1 September 2016 / Accepted: 15 September 2016 / Published online: 8 October 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The operation and performance of a biotrickling filter for methanol (MeOH) and hydrogen sulfide (H₂S) removal at acid pH was studied. Excess biomass in the filter bed, causing performance loss and high pressure drop, was controlled by intermittent addition, of ozone (O₃) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The results showed that after adaptation to acid pH, the maximum elimination capacity (EC) reached for MeOH was 565 g m⁻³ h⁻¹ (97 % RE). High MeOH loads resulted in increased biomass concentration within the support, triggering reductions in the removal efficiency (RE) for both compounds close to 50 %, and high pressure drop. At this stage, an inlet load of 150.2 ± 16.7 g m⁻³ h⁻¹ of O₃ was fed by 38 days favoring biomass detachment, and EC recovery and lower pressure dropped with a maximum elimination capacity of 587 g m⁻³ h⁻¹ (81 % RE) and 15.8 g m⁻³ h⁻¹ (97 % RE) for MeOH and H₂S, respectively. After O₃ addition, a rapid increase in biomass content and higher fluctuations in pressure drop were observed reducing the system performance. A second treatment with oxidants was implemented feeding a O₃ load of 4.8 ± 0.1 g m⁻³ h⁻¹ for 7 days, followed by H₂O₂

addition for 23 days, registering 607.5 g_{biomass} L⁻¹_{packing} before and 367.5 g_{biomass} L⁻¹_{packing} after the oxidant addition. PCR-DGGE analysis of different operating stages showed a clear change in the bacterial populations when O₃ was present while the fungal population was less affected.

Keywords pH · Pressure drop · Ozone · H₂O₂ · Biotrickling filter · Biomass

Introduction

Gaseous pollutants from various industrial activities are frequently released to the atmosphere, causing health and environmental problems. Increased concern has driven the quest to improve and find new alternatives to treat these industrial emissions. Gaseous pollutants can be removed by different technologies including physical and chemical methods, such as adsorption, absorption, condensation, and combustion, and by biological-based technologies (Revah and Morgan-Sagastume 2005; Mudliar et al. 2010). Biological methods are considered cost-effective and reliable technologies for the control of waste gases contaminated with different chemical compounds. They are environmentally friendly as they operate at normal conditions and do not require or generate toxic products. These systems include, among others, conventional biofilters (BF); biotrickling filters (BTFs), bioscrubbers, and hollow fiber and membrane bioreactors (Revah and Morgan-Sagastume 2005, Yang et al. 2010). These systems allow treating airstreams at various temperatures (Hu et al. 2015; Kong et al. 2013) and mixtures of pollutants with different chemical properties where diverse microbial populations (i.e., autotrophic and heterotrophic bacteria, yeast, and molds) can develop (Chung 2007; Ding et al. 2006; González-

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-016-7861-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sergio Revah
srevah@correo.cua.uam.mx

¹ Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Avenida Vasco de Quiroga 4871. Col. Santa Fé. Delegación Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348 Mexico City, Mexico

² Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Avenida Vasco de Quiroga 4871. Col. Santa Fé. Delegación Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348 Mexico City, Mexico

Sanchez et al. 2008; Mudliar et al. 2010; Prenafeta-Boldú et al. 2012).

Although biofiltration has many advantages, it also presents some problems affecting its long-term performance. Excessive biomass accumulation, causing fluid clogging and channeling, is considered among the major problems in BTF as it induces excessive head loss and low performance and increased the operational costs (Sempere et al. 2008; Yang et al. 2010). There are different alternatives for removing excess biomass to improve the performance in biofiltration systems including physical, chemical, and biological methods. Although they are generally effective, some of them could affect the system performance or present implementation problems in real systems (Xi et al. 2014; Yang et al. 2010; Zehraoui et al. 2013). In this sense, chemical compounds such as NaOH and NaClO have been effective to remove or control the excessive biomass; however, the use of chemical solutions often leads to considerable drops in biofilter performance, requiring a period of up to several days to reacclimatize.

Methods based on the use of oxidants, such as ozone, have shown to be effective in biofiltration systems (Moussavi and Mohseni 2007; Wang et al. 2009). Hydrogen peroxide has also been used to remove or prevent biofilm accumulation by removing exopolysaccharides (EPS) by the disruption of the polymeric backbone. Examples include the detachment and removal of biofilms in reactors with low (<0.1 mM H_2O_2) concentrations (Christensen et al. 1990) and the reduction of head loss in granular activated carbon/sand filters for drinking water (Lauderdale et al. 2012). Furthermore, the combination of both oxidants was studied for removal of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. The results suggest that the hydroxyl radicals ($\cdot OH$) generated in the biofilm by the sequential treatment (O_3 followed by H_2O_2) might react with biofilm constituents, such as EPS rather than with intracellular components (Tachikawa and Yamanaka 2014). The use of oxidants for biomass control has mainly been demonstrated in BF system treating of individual volatile organic compounds, such as toluene, xylene, and formaldehyde, at neutral pH. Nonetheless, clogging or excessive biomass accumulation can also be present with mixed pollutants in BTF operating at different pH conditions. The treatment of methanol and hydrogen sulfide released by the pulp and paper industry induces both a decrease in the pH of the system due to the oxidation of H_2S to sulfate and excessive growth of fungal biomass on MeOH causing clogging and operational problems (Jin et al. 2007; Rene et al. 2010; Sologar et al. 2003).

Increased knowledge on BF performance and associated microbial populations can be obtained by using molecular techniques to evidence the dynamics of microbial communities in response to changes in operating conditions such as the addition of a new substrate or changes in temperature or pH (Ding et al. 2006). Biochemical methods such as respirometry have also been used to evaluate the microbial activity in the

reactors under different conditions (Arellano-Garcia et al. 2010).

As further research is necessary to evaluate the use of oxidants in the biofiltration system, the main objective of this work was to investigate the use of O_3 and H_2O_2 to remove the excess of biomass in a BTF treating MeOH and H_2S under different loads and the impact of these oxidants on the performance of the system and structure and activity of the microbial community.

Materials and methods

Inoculum preparation and mineral medium composition

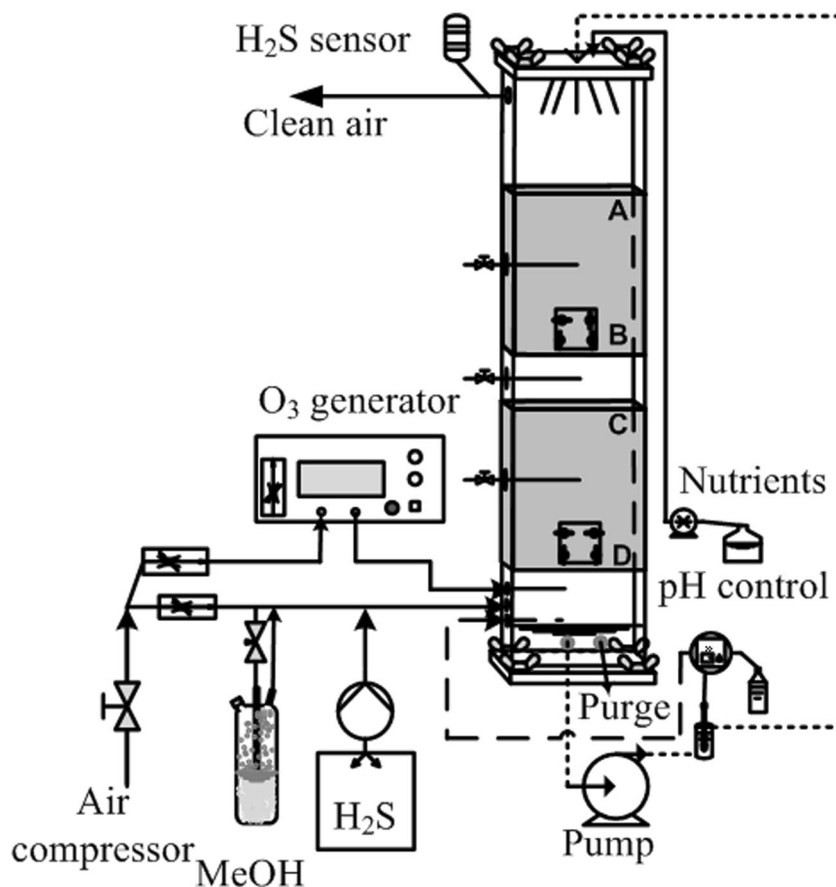
A mixture of aerobic and anaerobic sludges obtained from two different wastewater treatment plants located in the municipality of Iztapalapa in Mexico City and an acid mine drainage sludge from the state of San Luis Potosí, Mexico, were used as the inoculum source. The mixed culture was acclimatized for 3 months at acid pH (2.5–3) in the mineral medium (MM) described below supplemented with MeOH at 0.5 % (v/v) and 8 g L^{-1} of $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ as the source of sulfur. The MM used in the reactor was modified from Jin et al. (2007) and contained (g L^{-1}) KH_2PO_4 (4.0), K_2HPO_4 (4.0), NH_4Cl (0.8), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.4), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.02), adjusting the pH to 2.5 with a solution of HCl.

Experimental setup

The BTF system, shown in Fig. 1, comprises an acrylic rectangular reactor ($12 \times 12 \times 52$ cm) packed with polyurethane foam (PUF) cubes ($4 \times 4 \times 4$ cm, Fig. S1) similar to the one previously described by González-Sánchez et al. (2008). The reactor was divided into two sections with a total packing volume of 2.3 L and several ports for biomass sampling. An air stream was bubbled through a vessel containing MeOH and then mixed with a stream containing H_2S . The resulting waste gas was introduced through the bottom of the column for counter-current flow. The pH was maintained by feeding a solution of 0.5 M of NaOH with a metering pump (Bamant-HD-MA-Pump). The nutrient solution was renewed twice a week. Pressure drop measurements were made using a U-tube manometer and are expressed as millimeters of H_2O per meter of support. Experiments were conducted at room temperature. The operational conditions in the BTF are described in Table 1.

For the O_3 experiments, a corona discharge ozone generator (A2Z Ozone, Inc., USA: A2ZS-IGLAB) with a maximum production of 1000 mg h^{-1} was used. Ambient air was passed through the generator (800 mL min^{-1} for the first period and 200 mL min^{-1} for the second one) and then mixed with the regular air stream before feeding the biofilter. Table 1 shows the O_3 inlet loads. H_2O_2 was added in the mineral medium

Fig. 1 Diagram of the biotrickling filter. A–D Biomass sampling ports



during recirculation once a day and determined as reported by Tachikawa and Yamanaka (2014). H_2O_2 was fed at concentrations of 1 mg L^{-1} in two time intervals: 437–438 and 442–451 days and then at concentration of 5 mg L^{-1} from day 453 to day 459.

Biomass content and activity

The total biomass within the reactor was measured at different stages to evaluate the effect of oxidants. The liquid flow was stopped for 12 h to allow the retained liquid to trickle, and the packing was removed and weighed. The biomass content was calculated by subtracting the packing weight.

The microbial activity was studied by respirometry. A biomass sample was taken from the packing, centrifuged, and resuspended twice in fresh MM. To evaluate the oxygen uptake rate (OUR), 200 μL of biomass and different MeOH concentrations from 35 to $\sim 400 \text{ mM}$ were analyzed at 25°C in the respirometry chamber previously described by Arellano-García et al. (2010).

Biofilm analysis by magnetic resonance imaging

Analysis of MRI was made in one colonized cube of packing material removed from the reactor. The cube was extracted

from the filter bed after draining the retained liquid; then, it was analyzed in a magnetic scanner (Varian, VNMR 7 T, USA). Gradient echo multislice (GEMS) sequences were acquired in a 50 per 50 mm field with a 512×512 pixel matrix giving a resolution of $97.5 \mu\text{m}$. Sequences of 80 images were acquired from each cube taking a slice image every 0.5 mm registering the biofilm structure impregnated using gadolinium as contrast medium. The volume of the biofilm was calculated from 3D reconstructions made with the OsiriX imaging software (Arellano-García et al. 2015).

Microbial community analysis

Samples of biomass were taken from the BTF at different sections, before, during, and after O_3 addition. The biomass samples were washed threefold in a saline solution centrifuging at 4000 rpm for 10 min, and finally the pellets were stored frozen at -80°C until analysis. Total DNA was extracted with the PowerSoil® DNA Isolation Kit following the manufacturer's instructions. The GC-338F and 907R primers were used to amplify the V3-V5 region of the bacterial 16S ribosomal RNA (rRNA) gene. The PCR reactions were performed with 50 ng DNA (final volume 25 μL) using Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) as described by the manufacturer except that bovine serum albumin was added at a final concentration

Table 1 Operational conditions and results from different operating stages

Stage	Time Days	pH	MeOH			H ₂ S			Oxidants	
			IL g m ⁻³ h ⁻¹	EC g m ⁻³ h ⁻¹	RE (%)	IL g m ⁻³ h ⁻¹	EC g m ⁻³ h ⁻¹	RE (%)	O ₃ gm ⁻³ h ⁻¹	H ₂ O ₂ mg L ⁻¹
Ia	1–15	6.4–1.2	13.4 ± 1.6	0.1 ± 0.3	1.0 ± 2.3	4.6 ± 0.3	4.6 ± 0.3	100		
	16–27	0.8–4.3	21.9 ± 2.2	0.02 ± 0.07	0.15 ± 0.4	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	100		
I	28–43	4.3–2.9	20.4 ± 2.4	18.2 ± 1.0	90.6 ± 11.6	6.3 ± 1.2	6.3 ± 1.2	100		
	44–68	2.2–3	30.5 ± 1.2	24.6 ± 2.3	80.5 ± 6.4	8.8 ± 0.8	8.8 ± 0.8	100		
	69–95	2.5	47.2 ± 7.8	32.8 ± 4.0	70.3 ± 8.0	9.9 ± 1.0	9.9 ± 1.0	100		
	96–129	2.5	270.6 ± 83.8	192.5 ± 56.4	71.7 ± 13.1	11.0 ± 0.8	11.0 ± 0.8	100		
	130–241	2.5	331.3 ± 42.6	306.0 ± 36.0	92.7 ± 5.1	11.5 ± 0.5	11.0 ± 1.2	95.9 ± 9.9		
II	242–259	2.5	569.9 ± 45.2	406.8 ± 85.1	71.2 ± 15.2	12.8 ± 0.2	11.5 ± 1.5	89.5 ± 11.7		
	260–298	2.5	646.1 ± 41.5	476.2 ± 59.1	73.5 ± 6.0	13.2 ± 1.1	11.1 ± 2.4	83.8 ± 15.1	150.2 ± 16.7 ^a	
III	299–395	2.5	613.6 ± 17.6	388.8 ± 64.8	63.5 ± 11.0	13.4 ± 0.6	11.0 ± 2.1	82.4 ± 15.0		
	396–412	2.5	318.5 ± 14.3	198.8 ± 82.9	62 ± 25.1	13.7 ± 0.2	11.9 ± 1.7	86.4 ± 12.3		
IV	413–429	2.5	261.2 ± 3.0	132.8 ± 15.8	50.8 ± 6.0	13.6 ± 0.4	10.7 ± 2.1	78.4 ± 15.0		
	430–436	2.5	259.3 ± 5.3	79.7 ± 28.2	31.3 ± 11.3	13.7 ± 0.2	7.4 ± 2.1	54.1 ± 14.6	4.8 ± 0.1 ^a	
V	437–451	2.5	261.8 ± 3.3	134.3 ± 52	51.7 ± 19.8	13.7 ± 0.3	8.2 ± 3.0	59.7 ± 21.6		1 ^b
	452–460	2.5	264.6 ± 3.8	151.7 ± 8.5	57.1 ± 2.9	13.9 ± 0.4	9 ± 1.5	64.8 ± 12.2		5 ^b

IL inlet load, EC elimination capacity, RE removal efficiency

^aThe same doses in all the periods

^bIntermittent doses between the periods

of 400 µg/mL. The PCR program consisted of initial denaturation at 95 °C for 15 min, 10 touchdown cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C (–0.5 °C per cycle) for 30 s, and extension at 72 °C for 60 s, followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 51 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension step of 72 °C for 10 min. The V1–V2 region of the fungal 18S rRNA gene was amplified with the NS1 and GCFung primers. PCR reactions were performed with 25 ng DNA (final volume 25 µL) using Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) as described by the manufacturer except that bovine serum albumin was added at a final concentration of 400 µg/mL and MgCl₂ was used at a final concentration of 2.5 mM. The PCR program consisted of initial denaturation at 95 °C for 15 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 45 s, and 72 °C for 30 s, and a final extension step of 72 °C for 10 min. The acrylamide concentration in the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for bacteria was 6 % and the denaturing gradient was 40 and 60 %. An aliquot of 5 µL of the PCR product was run at 50 V for 16 h. For fungal DGGE gels, the acrylamide concentration was 6 % and the denaturing gradient was 30 and 60 %. An aliquot of 3 µL of the PCR product was run at 65 V for 19 h (DCode Bio-Rad equipment). The bands were visualized by staining the DGGE gels with silver nitrate. Selected bands were excised from the gel, reamplified, purified with the Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), and sequenced at the UAM-Iztapalapa Molecular Biology Laboratory (Mexico). The DNA sequences were analyzed using the biocomputing tools provided online by the

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The comparison was made using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The nucleotide sequences in this study have been deposited in GenBank, and the corresponding accession numbers are shown Table 2.

Analytical methods

Gaseous MeOH concentrations were measured with a gas chromatograph Agilent Technologies 6890 with a capillary column (Alltech AT-FAME, 30 m × 250 µm × 0.25 µm), equipped with a flame ionization detector (FID), and helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. H₂S was monitored with an OdaLog analyzer LL-H2S-1000. O₃ detection in gas phase was made by the iodometric method (Rakness et al. 1996). Proteins were measured by the Lowry method, and carbohydrates were measured according to Dubois et al. (1956). Volatile solids (VS) were quantified in triplicate using standard methods (APHA 1998).

Results

Biotrickling filter performance

The BTF operated for 460 days; Table 1 shows the main operational conditions (inlet loads, pH, and addition of

Table 2 Bands sequenced from DGGE-PCR analysis for fungi and bacteria

Band ^a	GenBank accession number	Closest match in GenBank and corresponding accession number	Similarity (%)	Affiliation
Fungi				
A _I 1	KX097001	<i>Ophiostoma</i> sp. LLC 18s ribosomal RNA gene. KM652632.	93	<i>Dikarya</i> ; <i>Ascomycota</i> ; <i>Pezizomycotina</i> ; <i>Sordariomycetes</i> ; <i>Sordariomycetidae</i> ; <i>Ophiostomatales</i> ; <i>Ophiostomataceae</i>
D _{III} 6	KX097002	Uncultured eukaryote gene for 18S rRNA, partial sequence clone: AOan_H_2012Dec_49 AB901584.	94	
A _{II} 10	KX097003	Uncultured fungus isolate DGGE gel band 15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence JQ007331.	97	
Bacteria				
A _I 2	KX097005	<i>Acidithiobacillus</i> sp. Dg-E11 LN864666.	98	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Acidithiobacillia</i> ; <i>Acidithiobacillales</i> ; <i>Acidithiobacillaceae</i>
A _{II} 5	KX097004	<i>Acidiphilium</i> sp. BER EU711075.	98	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodospirillales</i> ; <i>Acetobacteraceae</i>

^a The name of each band is related with the lanes of the gels shown in Fig. S7a, b of the supplementary material

oxidants) and the resulting performance. H₂S and MeOH were introduced simultaneously with initial inlet loads of 4.7 ± 0.2 and 13.4 ± 1.6 g m⁻³ h⁻¹, respectively. While H₂S was eliminated from the onset of the experiment, no detectable MeOH removal was observed during the first 26 days probably due to the low pH values (<1.0) induced by H₂S oxidation to SO₄²⁻. At day 24, the system was reinoculated and the pH was controlled in the 3.8–4.3 range. These conditions allowed increased MeOH uptake, and RE values close to 100 % were observed at day 29. The pH control was then gradually decreased to 2.5 and maintained thereof.

Biomass accumulation

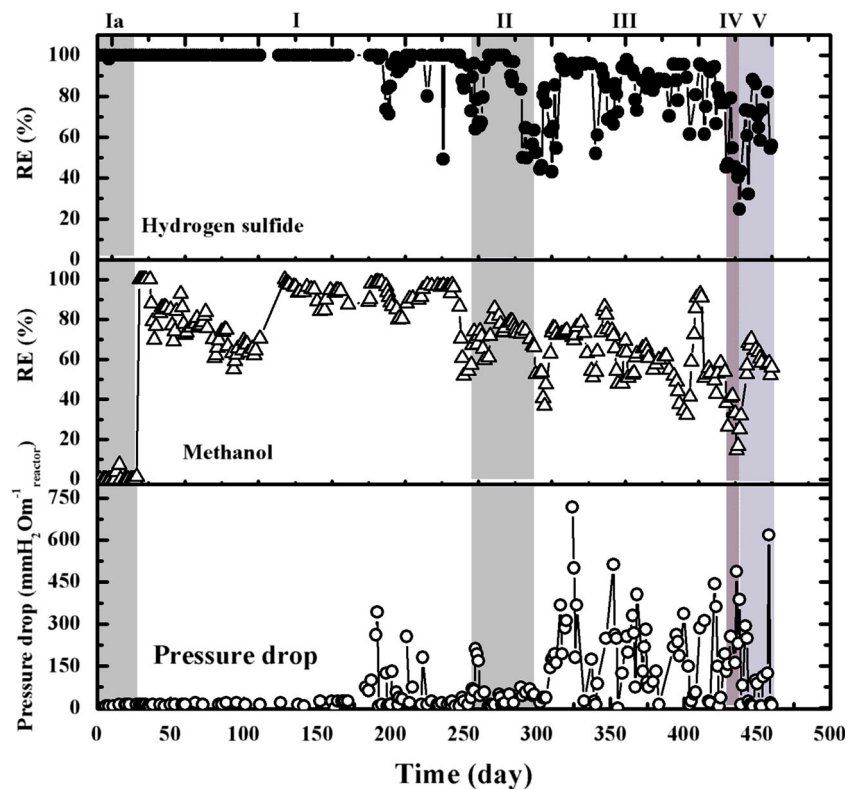
MeOH consumption fostered biomass accumulation, and consequently, pressure drop increased as shown in Fig. 2. For almost 180 days of operation, the pressure drop was below 25 mmH₂O m⁻¹ maintaining steady H₂S and MeOH removals. Accumulated biomass reduced mainly H₂S removal, reaching RE values down to 50 % on day 236 where the packing material was extracted showing a wet biomass content of 236 g_{biomass} L⁻¹_{packing} (Figs. 3 and S2). The colonized support cubes were reshuffled and packed again. Pressure drop values decreased down to 6.3 mmH₂O m⁻¹, and the system performance improved, but only for a few days, returning to the above conditions (Fig. 2, stage I). Increased growth and water accumulation was observed on some days over the filter bed by the presence of a biomass layer causing an obstruction in the system and fluctuations in the pressure drop (Fig. S5), and lower methanol removals followed down to 50 % RE on day 250.

Effect of the addition of oxidants on system performance

During the period of the first O₃ addition with loads of 150.2 ± 16.7 g m⁻³ h⁻¹ (Fig. 2, stage II), the pressure drop decreased and the performance recovered, obtaining the maximum EC found throughout this study of 587 g m⁻³ h⁻¹ (81 % RE) and 15.8 g m⁻³ h⁻¹ (97 % RE) for MeOH and H₂S, respectively. Biomass content in this period was 333 g_{biomass} L⁻¹_{packing} (Fig. 3). The stability in the RE for both pollutants was maintained for almost 30 days. A lower performance was observed thereafter, possibly by a negative effect of continuous O₃ feed over microbial activity. Therefore, oxidant delivery was suspended observing a recovery in the RE in the subsequent 10 days coupled to fast biomass growth and increased pressure drop. The system operated under these conditions for more 100 days showed a notable decrease on MeOH removal (Fig. 2, stage III) at around day 370. To evaluate possible MeOH toxicity, the inlet loads were decreased on day 396 improving the global performance and reaching a 92 % RE (EC of 293 g_{MeOH} m⁻³ h⁻¹) but continued diminishing thereafter. During stage III on days 373 and 423, the filter bed was removed, weighed, and reintroduced in the reactor; the biomass on these days was 549 and 607 g_{biomass} L⁻¹_{packing}, respectively (Fig. 3). MRI images of the support during this period (Fig. S3) showed a dense biofilm forming patches that almost completely obstructed sections of the packing, allowing only a small void volume for air and liquid distribution.

The pressure drop reached a maximum value of 344 mmH₂O m⁻¹ before O₃ addition, decreasing down to less than 7 mmH₂O m⁻¹ during O₃ treatment (MeOH inlet load was 622 ± 55.3 g m⁻³ h⁻¹). After suspending the O₃ feed, the pressure drop fluctuations increased up to a maximum value

Fig. 2 Pressure drop and removal efficiency (RE) of MeOH and H₂S. *Ia*: without pH control, *I* and *III* were operated without ozone, *II* and *IV* with ozone feed, and stage *V* was operated with H₂O₂ addition



of 718 mmH₂O m⁻¹ on day 324 with similar MeOH loads. The mat of biomass was observed again on top of the lower section of the filter bed (Fig. S6).

A second O₃ addition for 7 days from day 430 to 437 (pressure drop 156 and 231 mmH₂O m⁻¹, respectively) and with a lower load than the previous test ($4.8 \pm 0.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) was performed to reduce the impact on activity. The biofilter did not improve the performance, and the RE continued to decrease reaching a value of 14 % of RE for MeOH and 44 % of RE for H₂S. Hydrogen peroxide addition thereafter

allowed a rapid response, and 88 % of RE and 70 % of RE for H₂S and MeOH, respectively, were obtained in few days along with a reduction in the biomass content in the packing of around 40 % with a decrease of pressure drop of about 98 %, as shown in Fig. 3. A temporary spike in pressure drop was observed at around day 450 when 5 mg L⁻¹ H₂O₂ addition provoked excess biomass detachment and transient clogging (Fig. 2 stage V). Interestingly, H₂O₂ addition reduced the density of the detached biomass which floated, in contrast to O₃ addition where biomass debris settled, probably due to oxygen microbubbles formed from bacteria having catalase activity.

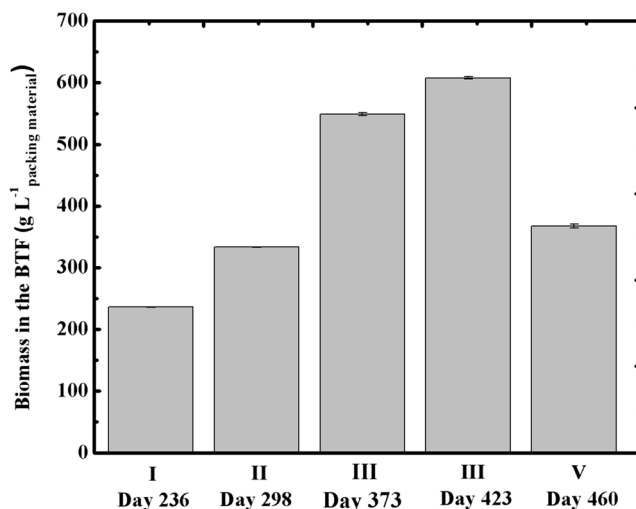
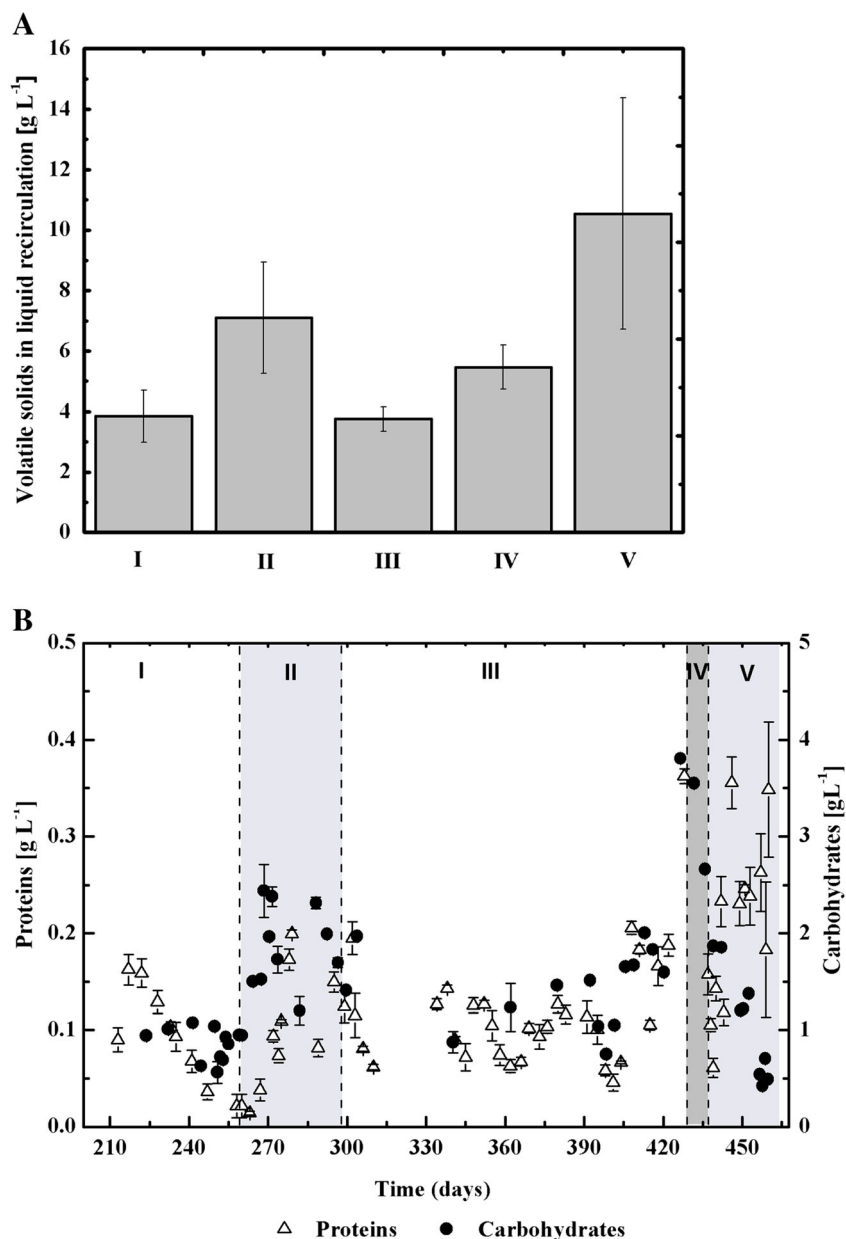


Fig. 3 Biomass content in biofilter packing material at different moments during the biofilter operation

Content of substances in the liquid phase

Volatile solids in the recirculation liquid related to biomass detachment from the support increased during the addition of oxidants as shown in Fig. 4a. The values were around 80 % increase for the first O₃ addition and 40 % for the second O₃ addition. Soluble solids increased further (170 % with respect to the concentration before O₃ addition) with the H₂O₂ treatment. Figure 4b presents the results of the protein and carbohydrate content in the recirculation liquid showing a global increase in the molecules when oxidants were added, which is consistent with biofilm detachment. Interestingly, the relative concentration varied with the oxidant use and higher protein values were found when the H₂O₂ treatment was applied.

Fig. 4 a Volatile solids and **b** carbohydrates and proteins contained in liquid recirculation at different stages



Effect of the O₃ on microbial activity

To evaluate the metabolic activity under O₃ addition, the endogenous respiration was initially assessed yielding values of 61 ± 8 and $35.8 \pm 2.4 \mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1}_{\text{protein}} \text{min}^{-1}$ for the biomass under normal operation and with O₃ addition, respectively. The values for the activity at different MeOH concentrations depicted in Fig. 5 and corrected for the endogenous respiration show that O₃ treatment reduced approximately by half the maximum OUR from 97 to 43 $\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1}_{\text{protein}} \text{min}^{-1}$. The K_s obtained by fitting a Monod-type model was 67 mmol L⁻¹ without O₃ exposure and was strongly reduced with O₃ addition. The endogenous respiration was also reduced by around 40 % when ozone was supplied reflecting the viability reduction of the cells.

Microbial dynamics

The profile along the column reactor showed a decrease in the number of bands in the lanes corresponding to the samples taken in the lower section of the BTF (D_{II} and D_{III}) after O₃ addition, which can be attributed to the effect of this oxidant on the microbial populations in this section for both bacteria and fungi (Fig. S7 and Table 2). The fungal population profiles showed some bands before O₃ addition in the lanes A_I, B_I, C_I, and D_I that could not be found in the other sections (Fig. S7b), i.e., bands A_{I1}, B_{I1}, C_{I1}, and D_{I1} clearly disappeared after supplying the oxidant. Band A_{I1} was identified as *Ophiostoma* sp. (Table 2) which did not seem to show resistance to O₃. In general, the number and/or intensity of

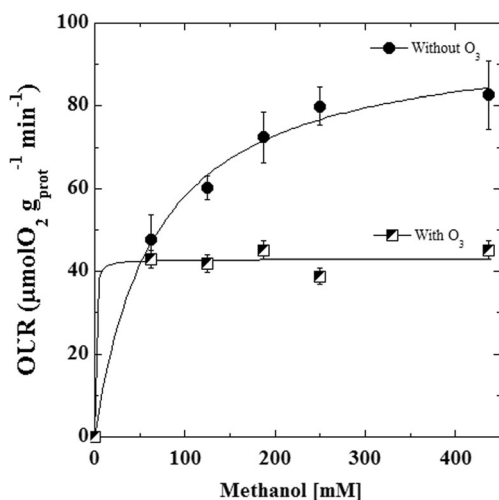


Fig. 5 Oxygen uptake rate of the biofilter population at different MeOH concentrations before and during ozone addition

bands decreased after O₃ treatment both for bacteria and fungi, which is consistent with the negative effect of O₃ microbial activity previously presented. Concerning bacteria, O₃ addition led to the appearance of new bands (Fig. S7a: A_{II}, B_{II}, C_{II}, and D_{II}) that disappeared later as O₃ addition was stopped (bands A_{II-5}, A_{II-6}, B_{II-2}, B_{II-3}, C_{II-2}, C_{II-3}, D_{II-2}, D_{II-3}, D_{II-4}, and D_{II-5}). One strong band (A_{II-5}, B_{II-2}, C_{II-2}, D_{II-2}), corresponding to *Acidiphilium* sp. was found only during O₃ treatment. After O₃ treatment, one band (A_{III-1}, B_{III-1}, C_{III-1}, D_{III-1}), initially present in the consortium (A_{I-2}, B_{I-2}, C_{I-2}, D_{I-2}), was enriched. It corresponded to *Acidithiobacillus* sp. Dg-E11; the other Blast matches indicated that this isolate was affiliated to the *A. thiooxidans* genus. Concerning fungi, after O₃ treatment, two bands were more intense (A_{III-7}, B_{III-8}, C_{III-6}, D_{III-6} and A_{III-10}, B_{III-11}, C_{III-9}, D_{III-8}). Band D_{III-6}, A_{II-10}, and A_{I-14} matched with uncultured fungi related to *Pezizomycotina* (See Table 2 and Fig. S7).

Discussion

Reactor startup showed that acidification due to H₂S oxidation to SO₄⁼ impeded initial MeOH removal which was detected only after pH was controlled and the system reinoculated (Fig. 2, stage I). The maximum ECs for MeOH and H₂S for this experimental period were 565 g m⁻³ h⁻¹ (97 % RE) and 13 g m⁻³ h⁻¹ (100 % RE), respectively. Microscopic observation showed an abundant yeast presence favored by the acidic conditions. These results are consistent with those reported in the literature where a higher eukaryote population was found in the presence of MeOH in a system without pH control (Barcón et al. 2012). Regarding the performance, the results are comparable with those at acid pH previously reporting EC_{max} of 236 g_{CH₃OH} m⁻³ h⁻¹ (inlet load of ~250 g m⁻³ h⁻¹)

and 6.4 g_{H₂S} m⁻³ h⁻¹ (RE = 100 %) to pH = 2.0 (Jin et al. 2007).

Biomass increased in the BTF was mainly due to heterotrophic growth on MeOH which allowed higher biomass yields for fungi (Egli and Fiechter 1981) compared to autotrophic bacteria (Alcántara et al. 2004). Excessive growth impaired H₂S and MeOH removals. Similar problems in the treatment of H₂S and MeOH were reported by Jin et al. (2007), where accumulation of biomass and elemental sulfur, from partial H₂S oxidation, caused a pressure drop increase and RE declined to 15 % compared with the value when only H₂S was treated. In our study, elemental sulfur accumulation was not observed in the filter bed and sulfate concentrations were close to the stoichiometric values (results not shown); these findings are consistent with those generally observed with low sulfide loads (Alcántara et al. 2004). Reshuffling the packing material on day 236 decreased pressure drop and allowed an increase in RE (Fig. 2, stage I). This step allowed reducing the macroscopic heterogeneity in the bed by limiting channeling and the zones where excess growth limited both air and liquid flow, thus recovering the microbial activity (Auria et al. 2000). Furthermore, channeling forms pockets of biomass that may be subject to drying with the concomitant activity reduction (Cercado et al. 2012). Several methods to remove excess biomass, and hence decrease the pressure drop, such as increasing the liquid flow and using alkaline chemical solutions, may not be sufficient as they affect biomass activity or may have short-term effectiveness (Flores-Valle et al. 2011; Wang et al. 2014) so other control strategies may be necessary.

Attached biomass content was controlled during the period of O₃ addition. This oxidant affects the biofilm structure by attacking the EPS, thus inducing biomass detachment, improving gas flow distribution, lowering the pressure drop, and improving performance. The oxidizing potential of O₃ increases at low pH (pH <4) reacting primarily with double bonds and aromatic groups and slightly with carbohydrates (Adams and Gorg 2002; Meng et al. 2016; Roncero et al. 2003), which may explain the sustained activity despite the high loads used. The results are consistent with previous studies (Xi et al. 2014) where the bed pressure drop remained below to 5.7 mmH₂O m⁻¹ (superficial velocity 17.7 m h⁻¹) throughout the operating period with O₃ inlet load in a range from 10.5 to 18.8 g m⁻³ h⁻¹ in a conventional biofilter. After O₃ addition was halted, the system operated for 100 days showing strong biomass growth (up to 607 g_{biomass} L⁻¹_{packing}) with high variations in the pressure drop and in the RE for MeOH and H₂S (Fig. 2, stage III). The strong fluctuations in pressure drop before and after the O₃ addition resulted from heterogeneous biomass growth which was visible by the formation of gelatinous pockets in the support and mats over the parts exposed to air. MRI showed a total volume compaction of around 20 %; this value

is higher than expected and was probably due to a reduction in the actual volume of the cubes caused by the weight from cubes positioned above and possibly to a decrease in the resilience of the PUF caused by O_3 . Numerical estimation of the occupied volume yields a value of 85 % (Fig. S3). The compaction was also observed in both sections of the BTF where the bed height reduced to almost 13 %.

The second O_3 addition reduced slightly the pressure drop but without improving the performance as compared with the first addition which may be attributed to the lower O_3 load used in this period. Furthermore, biomass growth was extensive and may have hindered O_3 distribution, biofilm diffusion, and oxidative activity. The subsequent H_2O_2 addition that, in contrast to O_3 , oxidizes some polysaccharides at low pH (Christensen et al. 1990; Miller 1986) allowed further cell detachment, lower pressure drop, and improved system performance. The effectiveness of H_2O_2 can be partly attributed to a synergistic effect with O_3 , (Tachikawa and Yamanaka 2014) and also to the H_2O_2 interaction with the Fe^{2+} present in the mineral medium producing $\cdot OH$ radicals that could react with the biofilm and favor biomass detachment (Gosselin et al. 2013).

Biofilm detachment by the action of the oxidants increased solids in the recirculation liquid which was consistent with those reported in the literature where the thickness of biofilm was reduced along to an increase of the microbial activity (García-Pérez et al. 2013; Wang et al. 2009). The action of the oxidants on the detached biofilms may as well favor depolymerization and uptake by the suspended and attached cells which may explain the variations in soluble and suspended protein and carbohydrates (Meng et al. 2016). The addition of O_3 also affected the microbial activity as shown by the change in endogenous respiration and the activity. This alteration in the metabolic activity reflects the structural changes of the population caused by the variable sensitivities of the different species (Wei et al. 2013). The negative effect of O_3 was also reported by Xi et al. (2014), where the deterioration of toluene removal was attributed to a decrease in activity by microorganisms susceptible to higher O_3 concentration.

An unexpected consequence of the addition of O_3 for an extended period was the damage observed in the packing material, particularly in the bottom section (Fig. 1), where there was a direct contact with the incoming feed. This corresponded to the reduction of the number of bands of the DGGE analyses described before. Small pieces of the material were also observed in the liquid phase, which explain the degradation shown in the Fig. S4. The double bonds present in the polyurethane chemical structure could be the main reason of its deterioration due to higher reactivity of O_3 toward unsaturated compounds (Adams and Gorg 2002). It has been reported that O_3 can change the chemical and physical properties of polyurethane foam increasing the porosity and reducing its hydrophobicity (Bertoldi et al. 2015).

The relevant effect of the addition of oxidants was evident as the changes on microbial populations were more noticeable through the different operating conditions implemented than throughout the different sections of the filter bed. The bands sequenced from fungal DGGE profiles were all related to the *Pezizomycotina*, a subphylum of the *Ascomycota*. Comparative phylogenetic analyses have shown that MeOH utilization genes are conserved in several *Pezizomycotina* lineages, indicating their potential capability to use MeOH as a carbon and energy source (Ravin et al. 2013). *Ophiostoma* sp. was apparently eliminated after O_3 addition; this fungus had already been reported in a BF used for the degradation of gas-phase mixtures of MeOH, α -pinene, and H_2S (López et al. 2013). The bands remaining after O_3 treatment corresponded to uncultured fungi. The higher number of bands in the fungal DGGE profiles compared to bacteria (Fig. S7b) could be explained as follows. Firstly, fungal biomass is more abundant in the BTF due to growth on MeOH, compared to bacteria which only grow autotrophically with H_2S which was fed in lower concentrations. Thus, MeOH consumption by fungi may promote the formation of a dense biofilm. In addition, the faster growth of MeOH consumers could limit the growth of autotrophic microorganisms, which would explain the lower number of bands for bacteria in all stages (Fig. S7a). Secondly, the resistance of fungi to adverse conditions such as O_3 presence and acidic pH exposure could help to preserve their abundance (Dong et al. 2015; Mara and Horan 2003; Prenafeta-Boldú et al. 2012). Furthermore, suspended and soluble material from the biofilm may also promote the development of heterotrophic microorganisms which are not necessarily H_2S consumers.

The bacterial band detected under O_3 treatment ($A_{II}5$: *Acidiphilium* sp.) suggests that the growth of this microorganism may be favored by high ozone tolerance (Wei et al. 2013) and possibly to the presence of some molecules enhanced by the ozone oxidation. It has been reported that some strains of this microorganism are capable to oxidize elemental sulfur to sulfate as a final metabolite and consume a high variety of organic substrates (Arellano-García et al. 2015; Zhang et al. 2013). In our study, *Acidithiobacillus* sp. could not have grown in high O_3 concentration, as indicated in the DGGE analyses; however, it remained viable, possibly protected by the dense biofilms, reappearing once the conditions were again favorable.

In conclusion, both O_3 and H_2O_2 were effective to remove excess biomass accumulation in trickle bed biofilters and offset the reduction in performance caused by excess biomass. From a practical point of view, it has been reported that continuous ozone addition may entail significant investment and operation costs (Xi et al. 2014), but the results found in the present study suggest that the use of H_2O_2 could be an interesting alternative. Oxidants altered the established population although this proved to be reversible when oxidant addition

was stopped. The continuous use of the oxidants may have a deleterious effect on the support which requires further study if this strategy is adopted for the biomass control.

Acknowledgments The authors thank Universidad Autónoma Metropolitana and CONACYT for the scholarship (372404), as well as the CI3M Center by conducting analyses of MRI. Special thanks to Dra. Angélica López Moreno for their help and collaboration in the analysis of molecular biology, as well as to Dra. Alejandra Serrato Díaz and to the Laboratory of Molecular Biology of the UAM-Iztapalapa.

Compliance with ethical standards This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adams CD, Gorg S (2002) Effect of pH and gas-phase ozone concentration on the decolorization of common textile dyes. *J Environ Eng* 128:293–298. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372-2002:128:3(293)
- Alcántara S, Velasco A, Revah S (2004) Sulfur formation by steady-state continuous cultures of a sulfoxidizing consortium and *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645. *Environm Technol* 25:1151–1157. doi:10.1080/09593330.2004.9619409
- APHA, Standards Methods for the Examination of Water of Wastewater (1998) 20th ed. American Public Health Association-American Water Works. Association-Water Pollution Control Federation (AWWA-WPCF), Washington, DC
- Arellano-García L, González-Sánchez A, Baquerizo G, Hernández-Jimenez S, Revah S (2010) Treatment of carbon disulfide and ethanethiol vapors in alkaline biotrickling filters using an alkaliphilic sulfo-oxidizing bacterial consortium. *J Chem Technol Biotechnol* 85:328–335. doi:10.1002/jctb.2328
- Arellano-García L, Dorado AD, Morales-Guadarrama A, Sacristan E, Gamisans X, Revah S (2015) Modelling the effects of biomass accumulation on the performance of a biotrickling filter packed with PUF support for the alkaline biotreatment of dimethyl disulfide vapors in air. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:97–107. doi:10.1007/s00253-014-5929-7
- 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. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<448::AID-BIT10>3.0.CO;2-2
- Barcón T, Alonso-Gutierrez J, Omil F (2012) Molecular and physiological approaches to understand the ecology of methanol degradation during the biofiltration of air streams. *Chemosphere* 87:1179–1185. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.039
- Bertoldi S, Farè S, Haugen HJ, Tanzi MC (2015) Exploiting novel sterilization techniques for porous polyurethane scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 26:182. doi:10.1007/s10856-015-5509-0
- Cercado B, Auria R, Cardenas B, Revah S (2012) Characterization of artificially dried biofilms for air biofiltration studies. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47:940–948. doi:10.1080/10934529.2012.667292
- Christensen BE, Naper T, Volland K, Smidsrod O, Bake R (1990) Biofilm removal by low concentration of hydrogen peroxide. *Biofouling* 2:165–175. doi:10.1080/08927019009378142
- Chung YC (2007) Evaluation of gas removal and bacterial community diversity in a biofilter developed to treat composting exhaust gases. *J Hazard Mater* 144:377–385. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.10.045
- Ding Y, Das KC, Whitman WB, Kastner JR (2006) Enhanced biofiltration of hydrogen sulfide in the presence of methanol and resultant bacterial diversity. *Trans ASABE* 49:2051–2059. doi:10.13031/2013.22266
- Dong T, Zhang Y, Islam MDS, Liu Y, El-Din MG (2015) The impact of various ozone pretreatment doses on the performance of endogenous microbial communities for the remediation of oil sands process-affected water. *Int Biodeter Biodegr* 100:17–28. doi:10.1016/j.ibiod.2015.01.014
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Egli T, Fiechter A (1981) Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *J Gen Microbiol* 123:365–369. doi:10.1099/00221287-123-2-365
- Flores-Valle SO, Ríos-Berny O, Chanona-Pérez J, Fregoso-Aguilar T, Morales-González JA, Prado-Rubianes OJ, Herrera-Bucio R, López-Albarán P, Morales-González A, Garibay-Feblés V, Domínguez EG, Kennes C, Veiga-Barbazán MC, Mendoza-Pérez JA (2011) A comparative study of physical and chemical processes for removal of biomass in biofilters. *Molecules* 16:6927–6949. doi:10.3390/molecules16086927
- García-Pérez T, Aizpuru A, Arriaga S (2013) By-passing acidification limitations during the biofiltration of high formaldehyde loads via the application of ozone pulses. *J Hazard Mater* 262:732–740. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.09.053
- González-Sánchez A, Revah S, Deshusses MA (2008) Alkaline biofiltration of H₂S odors. *Environ Sci Technol* 42:7398–7404. doi:10.1021/es800437f
- Gosselin F, Madeira LM, Juhna T, Block JC (2013) Drinking water and biofilm disinfection by Fenton-like reaction. *Water Res* 47:5631–5638. doi:10.1016/j.watres.2013.06.036
- Hu QY, Wang C, Huang KX (2015) Biofiltration performance and characteristics of high-temperature gaseous benzene, hexane and toluene. *Chem Eng J* 27:689–695. doi:10.1016/j.cej.2015.05.019
- Jin Y, Veiga MC, Kennes C (2007) Co-treatment of hydrogen sulfide and methanol in a single-stage biotrickling filter under acidic conditions. *Chemosphere* 68:1186–1193. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.069
- Kong X, Wang C, Ji M (2013) Analysis of microbial metabolic characteristics in mesophilic and thermophilic biofilters using Biolog plate technique. *Chem Eng J* 230:415–421. doi:10.1016/j.cej.2013.06.073
- Lauderdale C, Chadik P, Kirisits MJ, Brown AJ (2012) Engineered biofiltration: enhanced biofilter performance through nutrient and peroxide addition. *J Am Water Works ASS* 104:E298–E309. doi:10.5942/jawwa.2012.104.0073
- López ME, Rene ER, Malhautier L, Rocher J, Bayle S, Veiga MC, Kennes C (2013) One-stage biotrickling filter for the removal of a mixture of volatile pollutants from air: performance and microbial community analysis. *Bioresour Technol* 138:245–252. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.136
- Mara D, Horan NJ (2003) Handbook of water and wastewater microbiology. Academic press, 832. ISBN9780124701007
- Meng L, Xi J, Yeung M (2016) Degradation of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludge by low-concentration ozonation. *Chemosphere* 147:248–255. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.060
- Miller AR (1986) Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 141:238–244. doi:10.1016/S0006-291X(86)80359-X

- Moussavi G, Mohseni M (2007) Using UV pretreatment to enhance biofiltration of mixtures of aromatic VOCs. *J Hazard Mater* 144: 59–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.09.086
- Mudliar S, Giri B, Padoley K, Satpute D, Dixit R, Bhatt P, Pandey R, Juwarkar A, Vaidya A (2010) Bioreactors for treatment of VOCs and odours—a review. *J Environ Manag* 91:1039–1054. doi:10.1016/j.jenvman.2010.01.006
- Prenafeta-Boldú FX, Guivernau M, Gallastegui G, Viñas M, Sybren de Hoog G, Elías A (2012) Fungal/bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas biofilters operated under xerophilic conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 80:722–734. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01344.x
- Rakness K, Gordon G, Langlais B, Masschelein W, Matsumoto N, Richard Y, Michael RC, Somiya I (1996) Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator. *Ozone Sci Eng* 18:209–229. doi:10.1080/01919519608547327
- Ravin NV, Eldarov MA, Kadnikov VV, Beletsky AV, Schneider J, Mardanova ES, Elena M, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA, Mardanov AV, Skryabin KG (2013) Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14:837. doi:10.1186/1471-2164-14-837
- Rene ER, López ME, Veiga MC, Kennes C (2010) Steady- and transient-state operation of a two-stage bioreactor for the treatment of a gaseous mixture of hydrogen sulphide, methanol and α -pinene. *J Chem Technol Biotechnol* 85:336–348. doi:10.1002/jctb.2343
- Revah S, Morgan-Sagastume JM (2005) Methods of odor and VOC control. In: *Biotechnology for odor and air pollution control*. Springer Berlin Heidelberg, pp 29–63
- Roncero MB, Qeral MA, Colom JF, Vidal T (2003) Why acid pH increases the selectivity of the ozone bleaching processes. *Ozone-Sci Eng* 25:523–534. doi:10.1080/01919510390481838
- Sempere F, Gabaldón C, Martínez-Soria V, Marzal P, Peña-roja JM, Álvarez-Homos FJ (2008) Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere* 73:1533–1539. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.08.037
- Sologar VS, Lu Z, Allen DG (2003) Biofiltration of concentrated mixtures of hydrogen sulfide and methanol. *Environ Prog* 22:129–136. doi:10.1002/ep.670220215
- Tachikawa M, Yamanaka K (2014) Synergistic disinfection and removal of biofilms by a sequential two-step treatment with ozone followed by hydrogen peroxide. *Water Res* 64:94–101. doi:10.1016/j.watres.2014.06.047
- Wang C, Xi JY, Hu HY, Yao Y (2009) Stimulative effects of ozone on biofilter treating gaseous Chlorobenzene. *Environ Sci Technol* 43: 9407–9412. doi:10.1021/es9019035
- Wang L, Yang C, Cheng Y, Huang J, Yang H, Zeng G, Lu L, He S (2014) Enhanced removal of ethylbenzene from gas streams in biotrickling filters by Tween-20 and Zn (II). *J Environ Sci* 26:2500–2507. doi:10.1016/j.jes.2014.04.011
- Wei ZS, Li HQ, He JC, Ye HQ, Huang QR, Luo YW (2013) Removal of dimethyl sulfide by the combination of non-thermal plasma and biological process. *Bioresour Technol* 146:451–456. doi:10.1080/10934529709376619
- Xi J, Saingam P, Gu F, Hu YH, Zhao X (2014) Effect of continuous ozone injection on performance and biomass accumulation of biofilters treating gaseous toluene. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9437–9446. doi:10.1007/s00253-014-5888-z
- Yang C, Chen H, Zeng G, Yu G, Lou S (2010) Biomass accumulation and control strategies in gas biofiltration. *Biotechnol Adv* 28:531–540. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.002
- Zehraoui A, Hassan AA, Sorial GA (2013) Biological treatment of n-hexane and methanol in trickle bed air biofilters under acidic conditions. *Biochem Eng J* 77:129–135. doi:10.1016/j.bej.2013.06.001
- Zhang Y, Peng A, Yang Y, Liu J, Qiu G (2013) Isolation, characterization of *Acidiphilium* sp. DX1-1 and ore bioleaching by this acidophilic mixotrophic organism. *Trans Nonferrous Met Soc China* 23:1774–1782. doi:10.1016/S1003-6326(13)62660-6



Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor

Teresa García-Pérez^{a,b}, Juan C. López^a, Fabiana Passos^c, Raquel Lebrero^a, Sergio Revah^b, Raúl Muñoz^{a,*}

^a Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, School of Industrial Engineerings, University of Valladolid, Dr. Mergelina, s/n, 47011 Valladolid, Spain

^b Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Avenida Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fé Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, Mexico

^c Department of Sanitary and Environmental Engineering, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biological gas treatment
Greenhouse gas
Methanotroph
Polyhydroxyalkanoate
Suspended growth bioreactor

ABSTRACT

The limited gas–liquid mass transfer represents the main challenge in the operation of cost-effective bioreactors devoted to the treatment of poorly soluble gas pollutants such as methane (CH₄). This study evaluates the influence of internal gas-recycling strategies on the enhancement of CH₄ abatement in a bubble column bioreactor inoculated with the methanotroph *Methylocystis hirsuta*. Maximum CH₄ removal efficiencies of 72.9 ± 0.5% (corresponding to elimination capacities of 35.2 ± 0.4 g m⁻³ h⁻¹) were recorded under process operation at an empty bed residence time of 30 min and 0.50 m_{gas}³ m_{reactor}⁻³ min⁻¹ of internal gas-recycling rate. The accumulation of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in *M. hirsuta* was evaluated batchwise under limitations of potassium, manganese, nitrogen, and nitrogen with excess of iron. Nitrogen starvation resulted in the highest PHB content (28 ± 1%). Likewise, the implementation of sequential N starvation cycles in a continuous bubble column reactor operated at a gas residence time of 30 min and an internal gas-recycling rate of 0.50 m_{gas}³ m_{reactor}⁻³ min⁻¹ supported a PHB content of up to 34.6 ± 2.5%, with a volumetric PHB productivity of 1.4 ± 0.4 kg m⁻³ d⁻¹ and elimination capacities of 16.2 ± 9.5 g m⁻³ h⁻¹.

1. Introduction

Methane (CH₄) emissions account for 20–30% of the global warming effect worldwide based on the 25-times higher ability of this greenhouse gas (GHG) to absorb Earth's radiation compared to CO₂ [1,2]. This GHG is mainly released to the atmosphere from cattle farming, waste management and mining at low concentrations (< 20% v/v), which limits its potential energy valorization. In this context, the absence of specific regulations targeting CH₄ emissions, along with the lack of viable technical alternatives to produce energy from dilute CH₄ emissions, promote the uncontrolled release of CH₄ to the atmosphere without prior treatment. Therefore, the development of cost-efficient and environmentally-friendly technologies for the abatement of CH₄ is mandatory to achieve an effective climate change mitigation [3].

Biotechnologies, such as biofiltration, have consistently shown comparable removal efficiencies and robustness to those of physical–chemical technologies during the treatment of malodours and volatile organic pollutants [4]. Nonetheless, biofilters still present severe operational drawbacks limiting their long-term treatment performance

and consequently their widespread implementation for air pollution control. These limitations include the poor mass transfer of poorly water-soluble compounds from the gas phase to the biofilm, and the occurrence of packed bed clogging and channeling as a result of biomass overgrowth [5,6]. In this context, suspended growth bubble column bioreactors (BCBs) allow for an easy biomass control and harvesting, while they overcome mass transfer limitations due to the recent commercial availability of ultrafine bubble diffusers with micropores < 0.5 μm. In addition, the performance of BCBs can be further boosted via internal gas-recycling, which allows the decoupling of the actual gas residence time and turbulence in the microbial broth from the overall empty bed residence time (EBRT). However, the potential of internal gas-recycling in BCBs has been poorly explored for off-gas treatment [7–9].

Methanotrophs are microorganisms capable of metabolizing CH₄ as their sole carbon and energy source by using the enzyme methane monooxygenase (MMO) [10,11]. Methanotrophic bacteria are typically classified into two different types based on their metabolic and physiological differences: I (which belong to γ-Proteobacteria class) and II

* Corresponding author.

E-mail address: mutora@iq.uva.es (R. Muñoz).

(α -Proteobacteria class). Interestingly, type II methanotrophs (e.g. *Methylocystis*, *Methylosinus* and *Methylocella* genera) are able to co-produce polyhydroxyalkanoates (PHAs) under nutrient-limited conditions via the so-called serine pathway [12]. In this regard, CH₄ represents a low-cost substrate for the production of these high added-value products (market price of 4–20 € kg⁻¹), whose competitiveness is up to date jeopardized by the high cost of the carbon source employed. Commercial PHAs are nowadays produced through fermentation of glucose or agricultural sugar substrates, which account for 30–40% of the total production costs [13–15]. To date, CH₄-based biopolymer production has been focused on the synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB), which presents similar mechanical and thermal characteristics to those of conventional plastics and is biodegradable, thus enabling its rapid decomposition in the environment [16,17]. Recent attention has been paid to the optimization of PHB accumulation from a microbiological point of view by identifying the key limiting macro/micronutrients that boost PHB synthesis in methanotrophs. However, to the best of the authors' knowledge, the influence of micronutrients such as Mn, Fe, and K on methanotrophic PHB synthesis has been scarcely studied [18,19]. Moreover, few studies have evaluated the simultaneous abatement of dilute CH₄ emissions and co-production of PHB in gas-phase bioreactors under continuous operation [20].

This study aimed at optimizing the continuous abatement of diluted CH₄ emissions (4% v/v) coupled to PHB accumulation at high productivities in a novel internal gas-recycling BCB using *Methylocystis hirsuta* as a model type II methanotroph. The influence of the EBRT and internal gas-recycling rates on the CH₄ removal were first investigated in a lab-scale BCB. In addition, the role of different nutrient-limiting conditions (N, K, Mn, and N with excess of Fe) on PHB accumulation in *M. hirsuta* was also assessed. Finally, the potential of the internal gas-recycling BCB for simultaneous CH₄ abatement and PHB co-production was evaluated under the optimum EBRT, internal gas-recycling rate and nutrient-limiting conditions previously identified.

2. Material and methods

2.1. Mineral salt medium, chemicals and inoculum

The mineral salt medium (MSM) used for *M. hirsuta* cultivation was modified from Mokhtari-Hosseni et al. [21]. The MSM was composed of (g L⁻¹): 2.25 NaNO₃, 0.1 MgSO₄·7H₂O, 0.02 CaCl₂·2H₂O, 0.68 KH₂PO₄, 6.14 Na₂HPO₄·12H₂O, 1.3 × 10⁻³ FeSO₄·7H₂O, 3.5 × 10⁻³ MnCl₂·4H₂O, 1.5 × 10⁻³ ZnSO₄·7H₂O, 0.04 × 10⁻³ Na₂MoO₄·2H₂O, 0.04 × 10⁻³ CuSO₄·5H₂O, 0.32 × 10⁻³ CoCl₂, and 0.2 × 10⁻³ H₃BO₃. Unless otherwise specified, all reagents and chemicals were purchased from Panreac® (Barcelona, Spain) with a purity of at least 99%. CH₄ (≥99.5%) and O₂ (≥99%) were purchased from Abelló Linde S.A. (Barcelona, Spain). Poly [(R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid] (molar ratio 88/12, ≥99.99%) was obtained from Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

M. hirsuta (DSMZ 18500) inocula were initially prepared in sterile 120 mL gas-tight serum bottles containing 40 mL of sterile MSM inoculated at 1% (v/v). These cultures were incubated at 25 °C and 250 rpm for 48 h under a 33:67% (v/v) CH₄:O₂ headspace. The cultivation broths were finally transferred to sterile 1.25 L gas tight serum bottles made-up with sterile MSM to a final liquid volume of 200 mL, and incubated at 25 °C and 600 rpm to a final optical density of the cultures at 600 nm (OD₆₀₀) of 1.1 (corresponding to a total suspended solid concentration – TSS – of 295 ± 16 mg L⁻¹).

2.2. Influence of the EBRT and internal gas-recycling rate in the BCB on CH₄ biodegradation

A lab-scale PVC bubble column bioreactor (0.08 m internal diameter × 0.6 m height) with a working volume of 2.5 L was used in the present study (Fig. 1). The polluted air emission, which contained CH₄

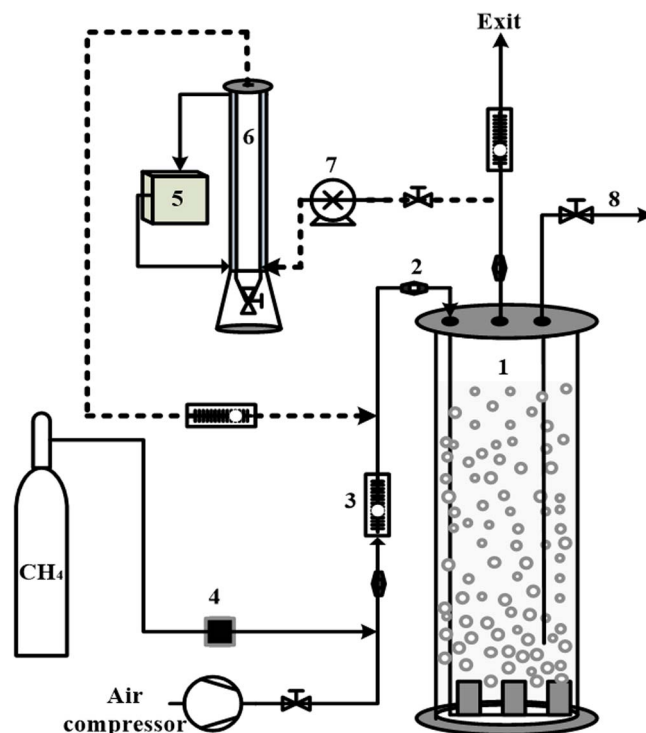


Fig. 1. Schematic of the experimental set up. (1) BCB, (2) sampling port, (3) rotameter, (4) mass flow controller, (5) cooling water, (6) condenser, (7) internal gas-recycling peristaltic pump and (8) liquid sampling port.

at 4% (v/v), was sparged at the bottom of the bioreactor using three 0.5 μm-pore stainless steel diffusers. This synthetic emission was composed of a pure CH₄ stream supplied via a mass flow controller (Aalborg™, USA) and pressurized air. A 1-L jacketed condenser cooled with water at 20 °C was implemented within the internal gas-recycling line. The temperature in the reactor was maintained at 25 °C. The reactor was inoculated at 194 ± 4 mg L⁻¹ and initially operated for 13 days (to reach steady-state) at 60 min of EBRT without internal gas-recycling during the start-up phase. The influence of the EBRT (120, 60, 30 and 15 min) and internal gas-recycling ratio ($Q_R/Q = 0, 2, 3, 6, 10$ and 15, where Q_R is the recycling gas flow rate and Q the gas flow rate fed to the overall system) was investigated in order to optimize the CH₄ abatement performance (Table 1). To ensure an optimum balance of nutrients and a stable pH (7.3 ± 0.2) within the bioreactor, 500 mL of cultivation broth were drawn every 48 h, centrifuged (10000 rpm, 7 min) and the biomass pellet (resuspended in fresh 500 mL MSM) was returned to the BCB.

The inlet and outlet CH₄, O₂ and CO₂ gas concentrations were daily monitored by GC-TCD. OD₆₀₀, pH, TSS and total nitrogen (TN) concentrations in the cultivation broth were determined every 48 h. The elimination capacity (EC), removal efficiency (RE), CO₂ production rate (PCO₂), PHB content, PHB productivity and the maximum rate of CH₄ consumption (fitting the data to the Gompertz model) were calculated according to Zuñiga et al. [2].

2.3. Influence of micro/macro nutrient limitation on PHB accumulation

The influence of N (at low and high Fe²⁺ concentrations), K and Mn limitations on PHB accumulation and CH₄ biodegradation in *M. hirsuta* cultures were evaluated batchwise. The batch assays involved a growth phase of 15 days in MSM followed by a PHB accumulation phase of 10 days under nutrient limiting conditions according to Table 2. The assays were carried out in duplicate in 2 L gas-tight serum bottles containing 400 mL of MSM inoculated with an initial biomass concentration of 128 ± 17 mg L⁻¹. The glass bottles were sealed with

Table 1Experimental conditions evaluated during the optimization of CH₄ abatement in the internal gas-recycling BCB.

Condition	EBRT (min)	Inlet load (g m ⁻³ h ⁻¹)	Q _R /Q	Recycling rate (m ³ _{gas} m ⁻³ _{reactor} min ⁻¹)	Virtual residence time (min)	Mineralization ratio (PCO ₂ /EC)
1	120	12	0	0.000	120	2.5 ± 0.2
2			2	0.017	40	2.1 ± 0.2
3			3	0.025	30	1.8 ± 0.4
4			6	0.050	17	1.7 ± 0.2
5			10	0.083	11	1.9 ± 0.3
6			15	0.125	8	2.0 ± 0.1
7	60	24	0	0.000	60	1.4 ± 0.2
8			2	0.033	20	1.7 ± 0.5
9			3	0.050	15	1.7 ± 0.2
10			6	0.100	9	1.6 ± 0.4
11			10	0.167	5	1.7 ± 0.1
12			15	0.250	4	1.7 ± 0.4
13	30	48	10	0.333	3	1.8 ± 0.2
14			15	0.500	2	1.9 ± 0.2
15	15	96	15	1.00	0.94	2.0 ± 0.1

Table 2Micro and macro-nutrients limiting conditions evaluated during batch cultivation of *M. hirsuta*.

Conditions	Nutrient limitation	Nutrient in excess	Fe Concentration (μM)
Control	–	–	4.6
1	K	–	4.6
2	Mn	–	4.6
3	N	–	4.6
4	N	Fe	60

butyl septa and aluminum crimp seals, and CH₄ was then added to the headspace both in the growth and accumulation stages at an initial concentration of 193 ± 7 g m⁻³ (32.5 ± 1.1% v/v) in a pure O₂ atmosphere. The biomass was centrifuged at the end of the growth phase and resuspended in the corresponding nutrient-limited MSM prior to the accumulation phase. Control tests with the original MSM were conducted as above described. The CH₄, O₂ and CO₂ composition of the headspace, and the biomass (measured through OD₆₆₀) in the cultivation broth were periodically monitored throughout the 25 days of experiment while PHB concentrations were monitored throughout the limitation tests.

2.4. Continuous CH₄ abatement and PHB co-production in the internal gas-recycling BCB under optimum operational conditions

The performance of the internal gas-recycling BCB was assessed under continuous mode using the optimum operational conditions identified in Sections 2.2 and 2.3 (EBRT = 30 min, internal gas-recycling rate = 0.50 m³_{gas} m⁻³_{reactor} min⁻¹ and nitrogen limitation as stress to induce PHB production) at an inlet load (IL) of 49.8 ± 11.8 g CH₄ m⁻³ h⁻¹. The BCB was inoculated with *M. hirsuta* at an initial biomass concentration of 152 ± 1 mg L⁻¹ and initially operated under nutrient-sufficient conditions and continuous CH₄ supply in order to reach a biomass concentration of 4.4 ± 0.6 g TSS L⁻¹. Then, nine sequential nitrogen feast-famine cycles (1 day in excess of nitrogen and 2 days under nitrogen limitation) were applied to evaluate the continuous co-production of PHB during CH₄ abatement. N-supplemented or N-free MSM were supplied at a dilution rate (D) of 0.1 d⁻¹ during the feast and famine periods, respectively. N concentration in the N-supplemented MSM was adjusted to 61 ± 8 mg N L⁻¹ during the feast periods to ensure a complete depletion within the following 24 h. The inlet and outlet CH₄, O₂ and CO₂ gas concentrations were daily monitored in the BCB. Likewise, 20 mL liquid samples were daily withdrawn to determine the OD₆₀₀, pH, TSS concentration and PHB content.

2.5. Analytical methods

CH₄, O₂, and CO₂ gas concentrations were measured in a Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, USA) equipped with a CP-Molsieve 5A column (15 m × 0.53 μm × 15 μm) and a CP-PoraBOND Q column (25 m × 0.53 μm × 10 μm). The oven, injector, and detector temperatures were maintained at 45 °C, 150 °C and 200 °C, respectively. Helium was used as the gas carrier at 13.7 mL min⁻¹. TSS concentration was determined according to standards methods [22]. Culture absorbance was measured at 600 nm using a Shimadzu UV-2550 UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). TN concentration was quantified following sample filtration (0.45 μm) in a TOC-VCSH analyzer (Shimadzu, Japan) coupled with a chemiluminescence detection TN module (TNM-1) (Shimadzu, Japan). PHB accumulation was quantified in a GC-MS (Agilent Technologies: GC System 7820A MSD 5977E, Santa Clara, USA) equipped with a DB-wax column (30 m × 250 μm × 0.25 μm) according to López et al. [20].

3. Results and discussion

3.1. Influence of the EBRT and internal gas-recycling rate in the BCB on CH₄ biodegradation

Process operation at an EBRT of 120 min in the absence of internal gas-recycling allowed elimination capacities of 4.7 ± 0.48 g m⁻³ h⁻¹, corresponding to REs of 38 ± 4%, while values ranging from 6.6 ± 0.3 to 9.8 ± 0.1 g m⁻³ h⁻¹ were obtained at Q_R/Q of 2, 3, 6, 10, 15 (corresponding to internal gas-recycling rates of 0.02, 0.03, 0.05, 0.08 and 0.13 m³ m⁻³ min⁻¹). Similarly, higher gas-recycling rates resulted in concomitant increases in EC, RE and PCO₂ (Fig. 2). Thus, the REs increased from 38 ± 4 to 54 ± 2, 60 ± 1, 69 ± 2, 73 ± 1, and 79 ± 1% at gas-recycling ratios of 2, 3, 6, 10 and 15, respectively. Likewise, process operation at an EBRT of 60 min in the absence of internal gas-recycling supported ECs of 8.5 ± 0.3 g m⁻³ h⁻¹, PCO₂ of 12 ± 0.9 g m⁻³ h⁻¹ and a RE of 35 ± 1%. The implementation of gas-recycling ratios of 2, 3, 6, 10, and 15 resulted in REs of 50 ± 2, 56 ± 2, 67 ± 1, 71 ± 1 and 75 ± 1%, respectively. Both EC and PCO₂ increased at increasing gas-recycling ratios, with a maximum EC of 18.7 ± 0.2 g m⁻³ h⁻¹ (corresponding to a RE = 75 ± 0.6%) at a Q_R/Q of 15. Similar removal efficiencies (70%) were reported in a biofilter treating CH₄ at an EBRT of 50 min [23]. This suggests that the turbulence (i.e. shear stress on the cells) induced by the Q_R/Q tested in the BCB did not significantly affect the microbial activity. Surprisingly, comparable CH₄ REs were obtained at EBRTs of 120 and 60 min regardless of the Q_R/Q ratio. The results here obtained were in accordance with those previously reported by Estrada et al. [24], who

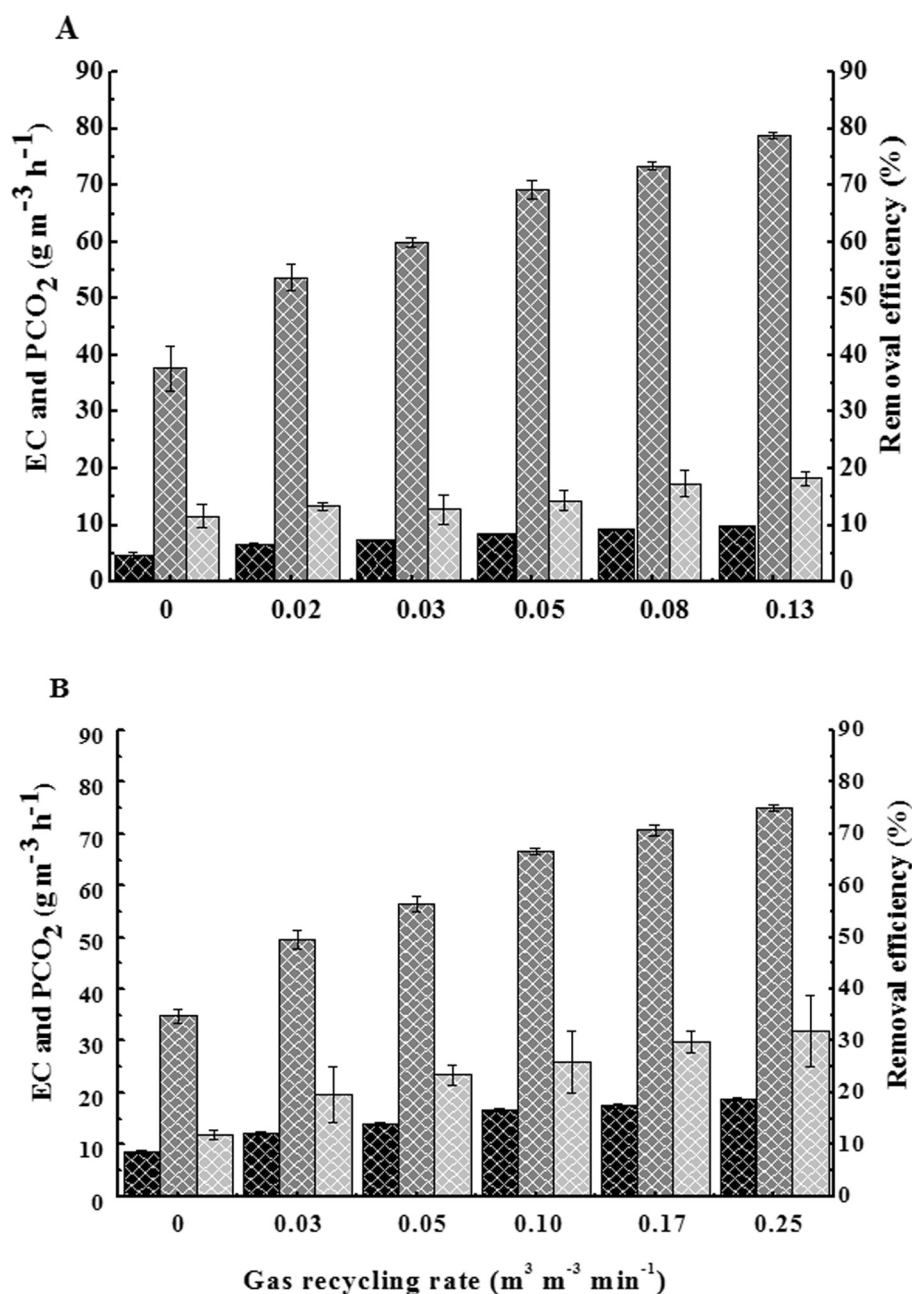


Fig. 2. Influence of the internal gas-recycling rate on the EC (■), RE (▨) and CO_2 production rate (▩) at EBRTs of 60 min (A) and 120 min (B) in the BCB.

recorded a 2.5 increase in CH_4 REs at a Q_R/Q ratio of 18 in a methanotrophic biotrickling filter compared to conventional operation without recycling rate.

However, despite the CH_4 abatement performance of the BCB at EBRTs of 120 and 60 min was significantly enhanced by the internal gas-recycling, the EBRTs here investigated were higher than those previously evaluated in biotrickling filters and would entail prohibitively large reactor volumes [24]. Therefore, process operation at an EBRT of 30 min was evaluated for Q_R/Q ratios of 10 and 15, and at an EBRT of 15 min for a $Q_R/Q = 15$. In this context, a decrease in the EBRT always promoted an increase in the EC and PCO_2 , at the expense of lower CH_4 REs (Fig. 3). Thus, maximum ECs of $35.2 \pm 0.4 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and REs of $72.9 \pm 0.5\%$ were achieved at an EBRT of 30 min, while process operation at an EBRT of 15 min resulted in ECs of $54.4 \pm 0.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and REs of $56.6 \pm 1.5\%$. Moreover, the decrease in the EBRT at a Q_R/Q of 15 did not entail a decrease in the mineralization ratio (PCO_2/EC), which remained constant at 2.0 ± 0.1 , 1.9 ± 0.2 , 1.7 ± 0.4 and 2.0 ± 0.1 for EBRTs of 15, 30,

60 and 120 min, respectively (Table 1).

Unfortunately, the high shear stress caused by the high turbulence in the cultivation medium prevailing during process operation at an EBRT of 15 min and a Q_R/Q ratio of 15 finally caused a deterioration in microbial activity, and therefore, a decrease in the EC to $21.1 \pm 5.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (corresponding to a REs = $23.3 \pm 4.7\%$). This high turbulence caused biomass aggregation and settling at the bottom of the BCB, thus reducing the concentration of active biomass in the effective volume of the reactor. This deterioration in microbial activity was also confirmed by the increase in the mineralization ratio (1.8 times higher than that recorded at the early stages of process operation at a Q_R/Q of 15 and EBRT of 15 min, where no biomass aggregation was observed) mediated by the increase in the endogenous cell respiration. Preliminary studies in the literature have consistently reported that high turbulence in the culture broth may induce cell membrane damage and impact on the off-gas treatment performance [25]. Indeed, Gram-negative bacteria such as *M. hirsuta* are especially sensitive to turbulence-mediated shear stress, which can ultimately limit the

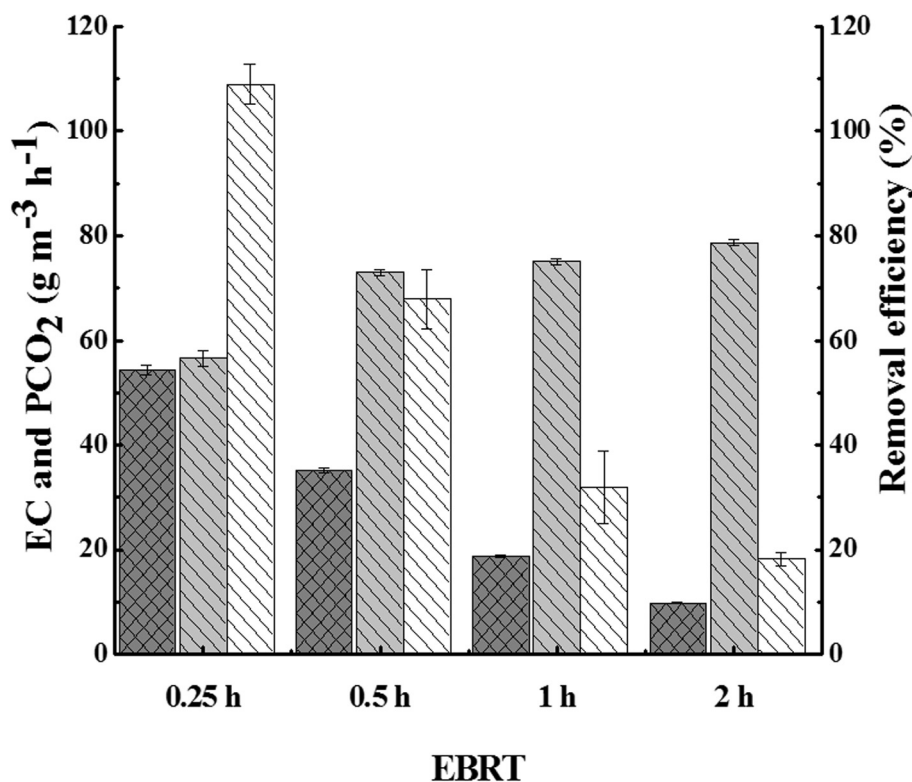


Fig. 3. Influence of the EBRT on the EC (■), RE (▨) and CO₂ production rate (▧) at a constant internal gas-recycling ratio of 15 in the BCB.

performance of bioreactors devoted to CH₄ treatment [26]. At this point, it should be also stressed that all tests were conducted under mass transfer-limiting conditions (CH₄ concentration in the liquid phase ~0 g m⁻³), which occurred at biomass concentrations > 1 g L⁻¹.

The MSM dilution rate here applied ($D = 0.1 \text{ d}^{-1}$) prevented the system from N depletion, which has been shown to limit the performance of methanotrophic gas-recycling bioreactors under long-term operation [24]. In fact, the lowest TN concentrations ($146 \pm 2 \text{ mg N L}^{-1}$) were recorded at the lowest EBRT and a Q_R/Q ratio of 15 as a result of an enhanced nitrogen assimilation by *M. hirsuta*.

3.2. Influence of micro/macro nutrient limitation on PHB accumulation

CH₄ was steadily degraded by *M. hirsuta* under nutrient-sufficient conditions, resulting in a biomass yield (Y_X) of $0.63 \pm 0.04 \text{ gX gCH}_4^{-1}$ and a PHB content of $7.8 \pm 1.0\%$ (w/w) by the end of the growth stage. A rapid accumulation of PHB and microbial growth concomitant with the biodegradation of CH₄ were observed following biomass resuspension in nutrient-limited MSM supplemented with CH₄ regardless of the nutrient limitation tested (Fig. S1). Mn limitation did not promote PHB synthesis by *M. hirsuta*, which exhibited a similar PHB content ($8.1 \pm 1.1\%$) and Y_X ($0.68 \pm 0.02 \text{ gX gCH}_4^{-1}$) to those of the control test. Interestingly, K limitation induced a slightly higher PHB content of $12.5 \pm 1.1\%$ and a Y_X of $0.38 \pm 0.02 \text{ gX gCH}_4^{-1}$ (Fig. 4A). This limitation did not affect the maximum CH₄ consumption rate, similar values being recorded for K limited, Mn limited and control tests (Fig. S2). The PHB contents here obtained were 2-times lower than those recorded in a type II *Methylocystis* sp. consortium under K limitation, likely due to the different MSM or methanotrophic species here used [27]. N limitation clearly induced the highest PHB accumulation ($28.0 \pm 1.2\%$) in *M. hirsuta* (Fig. 4A). In this context, N limitation has been consistently shown to support the highest PHB content in methanotrophic species belonging to the genera *Methylocystis* and *Methylosinus* [27–29]. Finally, the excess of Fe²⁺ under N limitation induced a PHB accumulation of up to $19.2 \pm 1.8\%$ at the expense of a reduced

CH₄ consumption, CO₂ production, biomass growth and specific CH₄ consumption rate (Figs. 4B and S3) compared to the test conducted exclusively under N limitation, where $82.5 \pm 2.3\%$ CH₄ was consumed in the same period of time (10 days), with a Y_X of $0.48 \pm 0.05 \text{ gX gCH}_4^{-1}$. These findings suggest the occurrence of a microbial inhibition in *M. hirsuta* at high Fe²⁺ concentrations. In this context, previous studies indicated that Fe²⁺ concentrations of 40–80 μM are required for an effective MMO activity, both Fe²⁺ and Cu²⁺ being important co-factors in the metabolism of methanotrophs [19]. However, the presence of high concentrations of Cu²⁺ could promote the formation of hydrogen peroxide, which can react with Fe²⁺ at these high concentrations and produce inhibitory free hydroxyl radicals [30].

3.3. Continuous CH₄ abatement and PHB co-production in the internal gas-recycling BCB under optimum operational conditions

BCB operation at an EBRT of 30 min and a Q_R/Q ratio of 15 under sequential N feast-famine cycles ($D = 0.1 \text{ d}^{-1}$) was identified as the optimum operational scenario to support a stable and efficient CH₄ abatement coupled to PHB production under continuous mode. The system rapidly achieved steady ECs of $\sim 27.9 \pm 2.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (corresponding to REs of $57.8 \pm 4.5\%$) from day 10 onwards, while biomass concentration steadily increased up to steady state values of $4.5 \pm 0.6 \text{ g L}^{-1}$ from day 20 onwards. These operational conditions supported a PCO₂ and biomass productivity of $79.9 \pm 8.4 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and $26.4 \pm 18.5 \text{ gX m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 5). These ECs and REs were slightly lower than those achieved in the mass transfer optimization tests under similar operational conditions, which was attributed to the gradual fouling of the fine bubble diffusers used in our study. The implementation of repeated N feast-famine cycles resulted in a gradual increase in the PHB content from $0.4 \pm 0.0\%$ to $25.7 \pm 0.1\%$ during the first N limitation (which lasted 3 days instead of 2 days) and up to $37.2 \pm 2.0\%$ from the fifth cycle onwards, reaching a maximum accumulation of 40% in the fifth and eighth cycles. N addition during the N feast-famine cycles significantly improved

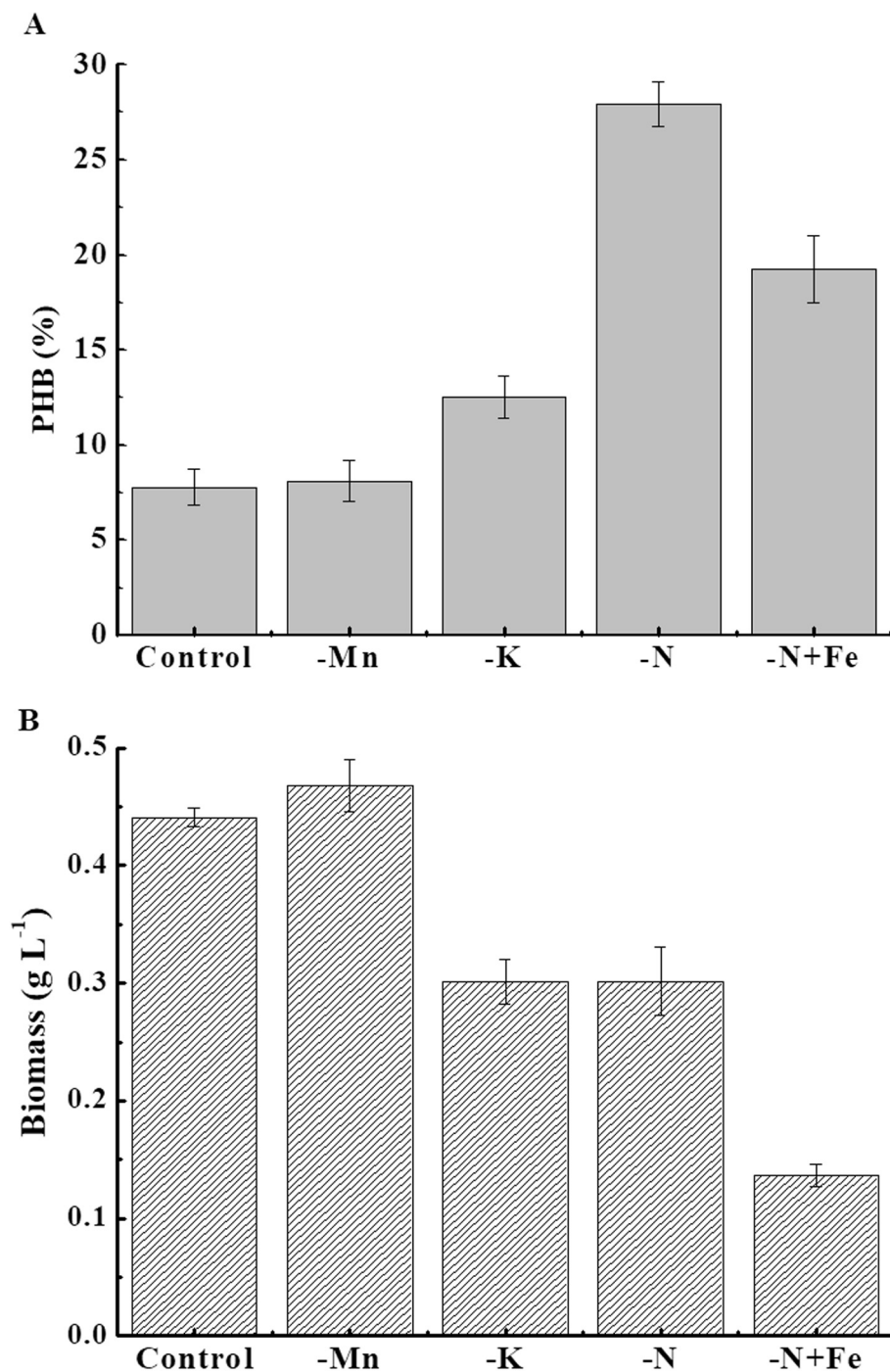


Fig. 4. Influence of nutrient limitation on PHB accumulation (A) and final biomass concentration (B) in the stationary phase of the batch assays.

the EC, which decreased in the absence of this macronutrient (Fig. 5). Similarly, PCO₂ concomitantly decreased with EC during the N starvation cycles, which can be attributed both to the reduced CH₄ uptake and the CO₂ requirements for PHB production within the serine pathway in type II methanotrophs [28]. Interestingly, a slight decrease in the PHB content ranging from 1.1% to 6.8% was consistently observed during growth cycles. This decrease in the PHB content can be explained by the fact that PHB is consumed as a readily available carbon source by type II methanotrophs following N supply to the cultivation broth [31]. PHB accumulations up to 51.6% (w/w) were previously reported for *Methylocystis* species under nitrogen limitation in a forced-liquid vertical tubular loop bioreactor under a 50:50% (v/v) CH₄:air feeding, though the production of this added-value product was neither maintained under continuous operation for more than 8 h nor

carried out at comparable productivities [28,8,32]. In our particular study, PHB productivities remained roughly constant during operation under N feast-famine cycles at 1.82–2.23 kg m⁻³ d⁻¹ (which corresponded to specific PHB productivities ranging from 15.9 to 21.6 mg PHB gX⁻¹ h⁻¹). These productivities ranked among the highest reported in methanotrophic cultures in continuous CH₄ abatement bioreactors, which typically remained at ~0.03 kg m⁻³ d⁻¹ [15]. Further research should focus on the evaluation of shorter N-limitation periods or alternative nutrient starvation strategies aiming at co-producing PHB along with a sustained abatement of dilute CH₄ emissions.

4. Conclusions

The implementation of internal gas-recycling strategies in a BCB

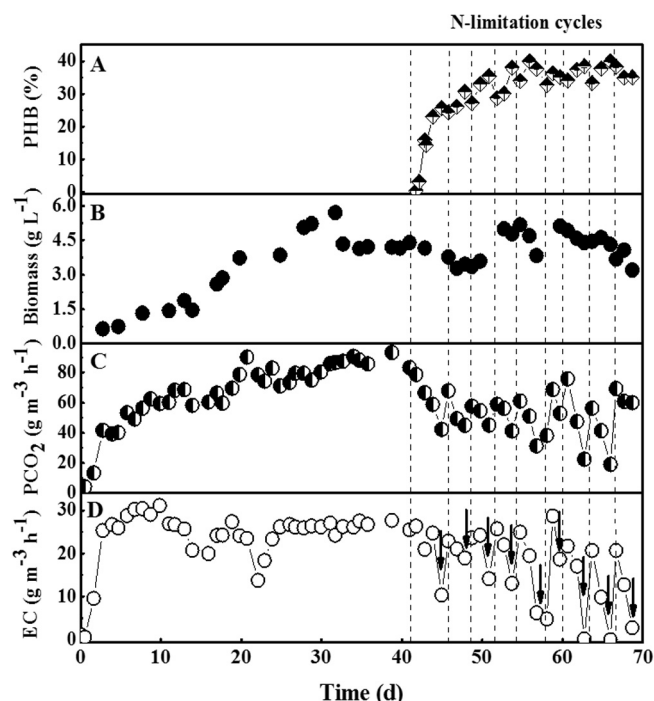


Fig. 5. Time course of the PHB cell content (A), biomass concentration (B), CO₂ production rate (C) and eliminations capacities (D) in the BCB during the continuous abatement of CH₄ coupled to PHB production. Vertical arrows indicate nitrogen addition during each N feast-famine cycle. Dashed lines indicate the start of limitation cycles.

resulted in a superior CH₄ abatement performance under continuous operation as a result of decoupling the EBRT and the gas-liquid turbulence governing CH₄ mass transport. The increase in the gas-recycling rate during the treatment of diluted CH₄ emissions entailed a concomitant increase in both EC and PCO₂ (regardless of the EBRT tested), while the decrease in EBRT from 120 min to 30 min increased the EC without a significant deterioration in the RE. N limitation was identified as the most effective nutrient starvation to induce PHB synthesis in *M. hirsuta* (compared to K, Mn and N limitations in excess of Fe). Process operation under optimum mass transfer conditions and repeated N feast-famine cycles resulted in ECs of $16.2 \pm 9.5 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, PHB contents of $34.6 \pm 2.5\%$ and PHB productivities of $1.4 \pm 0.4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Therefore, this study demonstrated for the first time the potential of internal gas-recycling BCBs for the continuous bioconversion of diluted CH₄ emissions into PHB at high productivities and under long-term operation.

Acknowledgements

The authors thank Universidad Autónoma Metropolitana and CONACYT for the scholarship (372404) and mobility grant to conduct this research stay at University of Valladolid (Spain). This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Union through the FEDER Funding Program (CTM2015-70442-R and Red Novedar). The financial support from the regional government of Castilla y León is also gratefully acknowledged (UIC71).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.106>.

References

- [1] G. Koneswaran, D. Nierenberg, Global farm animal production and global warming: impacting and mitigating climate change, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 578–582.

- [2] C. Zúñiga, M. Morales, S. Le Borgne, S. Revah, Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor, *J. Hazard. Mater.* (2011) 876–882.
- [3] R. Lebrero, L. Hernandez, R. Perez, J.M. Estrada, R. Muñoz, Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: exploring the potential of hydrophobic methanotrophs, *J. Environ. Manage.* 151 (2015) 124–131.
- [4] J.M. Estrada, N.J.R. Kraakman, R. Lebrero, R. Muñoz, A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1354–1363.
- [5] T. García-Pérez, S. Le Borgne, S. Revah, Ozone and hydrogen peroxide as strategies to control biomass in a trickling filter to treat methanol and hydrogen sulfide under acidic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 10637–10647.
- [6] C. Yang, H. Chen, G. Zeng, G. Yu, S. Luo, Biomass accumulation and control strategies in gas biofiltration, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 531–540.
- [7] N. Kantarci, F. Borak, K.O. Ulgen, Review bubble column reactors, *Process Biochem.* 40 (2005) 2263–2283.
- [8] F. Rahnama, E. Vasheghani-Farahani, F. Yazdian, S.A. Shojaosadati, PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 65 (2012) 51–56.
- [9] P. Rivera-Terceros, E. Tito-Claros, S. Torrico, S. Carballo, D. Van-Thuoc, J. Quillaguamán, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor, *J. Biol. Res.* 22 (2015) 8.
- [10] S. Hoefman, D. van der Ha, N. Boon, P. Vandamme, P. De Vos, K. Heylen, Niche differentiation in nitrogen metabolism among methanotrophs within an operational taxonomic unit, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 83.
- [11] J.C. López, G. Quijano, T.S. Souza, J.M. Estrada, R. Lebrero, R. Muñoz, Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 2277–2303.
- [12] A.J. Pieja, K.H. Rostkowski, C.S. Criddle, Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria, *Microb. Ecol.* 62 (2011) 564–573.
- [13] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez, Main characteristics, properties, improvements, and market data of polyhydroxyalkanoates, in: V.K. Thakur, M.K. Thakur (Eds.), *Handbook of sustainable polymers processing and applications*, chapter 24, Pan Stanford, 2015, pp. 899–927.
- [14] S. Chanprateep, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *J. Biosci. Bioeng.* 110 (2010) 621–632.
- [15] K. Khosravi-Darani, Z.B. Mokhtari, T. Amari, K. Tanaka, Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C-1 carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1407–1424.
- [16] B. Kunasundari, C.R. Arza, F.H.J. Maurer, V. Murugaiyah, G. Kaur, K. Sudesh, Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16, *Sep. Purif. Technol.* 172 (2017) 1–6.
- [17] D.P. Tamboli, A.N. Kagalkar, M.U. Jadhav, J.P. Jadhav, S.P. Govindwar, Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium* sp. ATM generated after degradation of textile dye Direct Red 5B, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2421–2427.
- [18] K. Chidambarampadmavathy, O. Karthik, K. Heimann, Role of copper and iron in methane oxidation and bacterial biopolymer accumulation, *Eng. Life Sci.* 15 (2015) 387–399.
- [19] O.P. Karthikeyan, K. Chidambarampadmavathy, S. Cires, K. Heimann, Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 (2015) 1579–1610.
- [20] J.C. López, G. Quijano, R. Pérez, R. Muñoz, Assessing the influence of CH₄ concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure, *J. Environ. Manage.* 146 (2014) 116–123.
- [21] Z.B. Mokhtari-Hosseini, E. Vasheghani-Farahani, A. Heidarzadeh-Vazifekhoran, A. Shojaosadati, R. Karimzadeh, K.K. Darani, Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 2436–2443.
- [22] APHA, Standards Methods for the Examination of Water of Wastewater, twentyfirst ed., American Public Health Association-American Water Works Association-Water Pollution Control Federation (AWWA-WPCF), Washington, DC, 2005.
- [23] C.A. du Plessis, J.M. Strauss, E.M.T. Seballo, K.H.J. Riedel, Empirical model for methane oxidation using a composted pine bark biofilter, *Fuel* 82 (2003) 1359–1365.
- [24] J.M. Estrada, R. Lebrero, G. Quijano, R. Pérez, I. Figueroa-González, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations, *Chem. Eng. J.* 253 (2014) 385–393.
- [25] M.K. Toma, M.P. Ruklisha, J.J. Vanags, M.O. Zeltina, M.P. Leite, N.I. Galinina, U.E. Viesturs, R.P. Tengerdy, Inhibition of microbial-growth and metabolism by excess turbulence, *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 552–556.
- [26] A.S. Lindner, A. Pacheco, H.C. Aldrich, A. Costello Staniec, I. Uz, D.J. Hodson, *Methylocystis hirsuta* sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 1891–1900.
- [27] J. Helm, K.D. Wendlandt, M. Jechorek, U. Stottmeister, Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-β-hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture, *J. Appl. Microbiol.* 105 (2008) 1054–1061.
- [28] A.J. Pieja, E.R. Sundstrom, C.S. Criddle, Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 385–392.
- [29] Y. Zhang, J. Xin, L. Chen, H. Song, C. Xia, Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol, *J. Nat. Gas Chem.* 17 (2008) 103–109.
- [30] H. Sun, X. Lu, P. Gao, The exploration of the antibacterial mechanism of Fe³⁺ against bacteria, *Braz. J. Microbiol.* 42 (2011) 410–414.
- [31] A.J. Pieja, E.R. Sundstrom, C.S. Criddle, Poly-3-Hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 6012–6019.
- [32] D. van der Ha, L. Nachtergaele, F.M. Kerckhof, D. Rameiyanti, P. Bossier, W. Verstraete, N. Boon, Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 13425–13431.