

Abril
2015

Aplicación de técnicas de biología molecular para la caracterización de la población microbiana en la degradación de compuestos orgánicos volátiles (COV) mediante biofiltros y biofiltros percoladores

M.C. Pérez

María del Carmen Pérez Gil
Tesis doctoral

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV) MEDIANTE BIOFILTROS Y BIOFILTROS PERCOLADORES

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

() Escola Tècnica Superior d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química



APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV) MEDIANTE BIOFILTROS Y BIOFILTROS PERCOLADORES

Memoria para optar al Título de Doctora por la Universitat de València,
presentada por **MARÍA DEL CARMEN PÉREZ GIL**.

Valencia, Abril de 2015

Dra. Carmen Gabaldón García, Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València, y

Dr. Francisco Javier Álvarez Hornos, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València.

CERTIFICAN: Que D^a. María del Carmen Pérez Gil, con título de Máster Universitario en Ingeniería Ambiental, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título de: “APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV) MEDIANTE BIOFILTROS Y BIOFILTROS PERCOLADORES” presenta en esta memoria y que constituye su Tesis para optar al título de Doctora por la Universitat de València en el Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos.

Y para que conste en los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Valencia a ____ de _____ de 2015.

Firmado: Dra. Carmen Gabaldón García Firmado: Dr. Fco. Javier Álvarez Hornos

AGRADECIMIENTOS

No puedo empezar de otra manera que agradeciendo a Carmen Gabaldón, mi directora de tesis, la oportunidad que me dio para la realización de esta tesis doctoral en el grupo de investigación GI²AM. Me gustaría por supuesto agradecerle la supervisión que ha llevado a cabo sobre mi trabajo durante estos años y todo lo que he aprendido gracias a ella.

También quería agradecerle a Javier Álvarez, mi otro director de tesis, todo la ayuda que me ha prestado, el tiempo que me ha dedicado y todo lo que me ha enseñado.

Me gustaría extender los agradecimientos al resto de profesores del grupo de investigación a Josep Penya-Roja, Vicente Martínez, Paula Marzal y Marta Izquierdo y a todos mis compañeros, especialmente a Pau, Jordi, Carlos, María y Feliu y a todas las personas que han pasado durante estos años por el grupo de investigación.

Quería agradecerle al profesor Karl Engesser de la Universidad de Stuttgart y a todo su grupo de investigación, especialmente a Daniel y Diego, el haberme tratado tan bien durante los meses de mi estancia allí.

También me gustaría agradecer al profesor Francisco Espinós, director del Centro de Investigación ACUMA-UPV, la oportunidad que me ha brindado a nivel profesional.

Por supuesto, a todos mis amigos, los de Valencia, los de Castellnovo y a los de más allá, por vuestro apoyo incondicional, por estar siempre ahí.

A todas las personas que han pasado por mi vida...también, gracias.

A ti, David, porque contigo estoy aprendiendo que las cosas no son como son, sino como uno quiere que sean y por hacerme pensar siempre, que ante todo, sí se puede.

Y por último, a mi familia, a mis padres y mi hermano, porque mis éxitos son vuestros éxitos. Gracias por todo, sin vosotros, hoy no estaría escribiendo estas líneas.

Gracias a todos los que creen en mí.

RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son unos de los principales contaminantes atmosféricos presentes en las emisiones gaseosas de una gran variedad de industrias. El conocimiento de los efectos nocivos que presentan estas sustancias sobre el medio ambiente y la salud humana ha tenido como consecuencia el desarrollo de normativas ambientales en la Unión Europea en relación al control de las emisiones industriales de COV. Esto ha originado, a su vez, el interés por el desarrollo de nuevas tecnologías de depuración para la reducción de estos contaminantes. En este sentido, los sistemas biológicos como los biofiltros y los biofiltros percoladores se presentan como una alternativa de tratamiento eficaz, económica y respetuosa con el medio ambiente. En la actualidad existen numerosos estudios de laboratorio realizados bajo condiciones de operación controladas cuyo fin principal es determinar la eficacia del biotratamiento. Sin embargo, la información a nivel microbiológico del proceso es todavía escasa. El desarrollo de nuevas aplicaciones de las técnicas de biología molecular para la identificación microbiana en ecología ambiental proporciona nuevas posibilidades para profundizar en el papel que la comunidad microbiana tiene en el proceso de biofiltración, siendo ésta una de las líneas emergentes en este campo.

El presente trabajo de tesis doctoral se centra en la identificación y el seguimiento de las comunidades microbianas en biofiltros y biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV, así como en la relación de las mismas con el funcionamiento de estos sistemas. El análisis de las comunidades bacterianas se ha llevado a cabo mediante la puesta a punto y la aplicación de las siguientes técnicas de biología molecular: hibridación fluorescente in situ (FISH), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación del gen 16S ARNr.

En una primera parte, las técnicas de biología molecular se han aplicado en experimentos de laboratorio bajo condiciones de funcionamiento controladas en los que se utilizaron tanto biofiltros como biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas que contenían un único contaminante. Se realizaron tres estudios experimentales cada uno de ellos con uno de los siguientes compuestos:

isopropanol, estireno y 2-butoxietanol; todos ellos constituyentes habituales de las emisiones gaseosas de numerosos sectores industriales. En una segunda parte, se procedió a la transferencia del proceso de biofiltro percolador para su aplicación industrial al tratamiento de las emisiones de COV procedentes del sector de recubrimientos. Se realizaron dos estudios experimentales centrados en la caracterización microbiana, uno a nivel de planta piloto y otro utilizando el proceso de biofiltro percolador como solución final de depuración de las emisiones de una instalación industrial.

El primer estudio que se presenta en esta tesis doctoral consistió en el análisis de la evolución de las comunidades bacterianas desarrolladas en dos biofiltros percoladores que se emplearon para el tratamiento de aire contaminado con isopropanol, contaminante típico presente en las emisiones industriales del sector flexográfico. En este experimento se evaluó la influencia de los parámetros de operación: carga másica volumétrica (CV) y tiempo de residencia a volumen vacío (TRVV); y del material de relleno sobre la comunidad bacteriana desarrollada en cada biorreactor durante 300 días de ensayo. Cada reactor se llenó con un material diferente: relleno plástico estructurado o anillos de polipropileno con un diámetro nominal de 16 mm. Después de la inoculación con un fango activado procedente de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), los biofiltros percoladores se operaron usando CV comprendidas entre 20 y 65 g C m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 14 y 160 segundos. Se obtuvieron eficacias de eliminación (EE) superiores a 80% trabajando con CV superiores a 35 g C m⁻³ h⁻¹ y TRVV tan bajos como 24 s. Los resultados obtenidos mediante las técnicas FISH y DGGE mostraron diferencias en la composición de las comunidades bacterianas desarrolladas en cada uno de los dos sistemas a pesar de utilizar idénticas condiciones de operación, lo que se relacionó con el uso de un material de relleno diferente en cada biorreactor. A su vez, se observó una variación temporal en las comunidades bacterianas identificadas en ambos biorreactores debido a los cambios aplicados en los parámetros de operación a lo largo del periodo experimental. En particular, el grupo bacteriano *Gammaproteobacteria*, identificado habitualmente en los sistemas de biotratamiento de aire contaminado con COV, presentó en ambos biorreactores un incremento importante de su abundancia relativa alcanzando valores superiores al 20% al final

del experimento. El análisis de los patrones de bandas obtenidos con la técnica DGGE mostró que *Pseudomonas putida*, especie bacteriana perteneciente al grupo *Gammaproteobacteria*, estuvo presente en ambos biorreactores desde el día 60 hasta el final de la operación.

En el siguiente estudio se investigó la eliminación de estireno mediante los procesos de biofiltro y de biofiltro percolador. El estireno es un contaminante común de las emisiones industriales del sector del procesamiento y de la síntesis de polímeros. En este experimento se llevó a cabo un estudio comparativo de la influencia que el tipo de bioproceso y el tipo de inóculo presentan sobre las comunidades bacterianas y la eficacia del proceso. Se operaron durante 6 meses dos biofiltros y un biofiltro percolador. En los biofiltros se emplearon dos materiales de relleno orgánicos diferentes: turba y fibra de coco; y el biofiltro percolador se relleno con anillos de polipropileno con un diámetro nominal de 25 mm. Se emplearon dos tipos de inóculos diferentes: un cultivo enriquecido de la cepa *Pseudomonas putida* CECT 324 para los biofiltros y un fango activado procedente de una EDAR para el biofiltro percolador. Durante el funcionamiento de los sistemas se efectuaron variaciones de la CV y del TRVV con valores comprendidos entre 10 y 45 $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$ y entre 30 y 120 segundos. Los resultados obtenidos indicaron que ambos tipos de biorreactores alcanzaron una CE similar, alrededor de 40 $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$, para una CV de 75 $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$ y un TRVV de 60 segundos. Los resultados de la aplicación de las técnicas FISH y DGGE mostraron una composición de las comunidades bacterianas diferente según el tipo de inóculo utilizado. El grupo bacteriano *Gammaproteobacteria* presentó abundancias elevadas, superiores al 15%, tanto en los biofiltros como en el biofiltro percolador durante todo el periodo experimental. Al final de la operación, este grupo bacteriano fue predominante con abundancias superiores al 25%. En el caso concreto del biofiltro percolador inoculado con fango activado se detectó un elevado incremento de la especie *Pseudomonas putida*. Esta especie se identificó inicialmente en el fango activado con una abundancia relativa del 1%, sin embargo, después de 165 días de operación, su abundancia alcanzó valores del 15%.

En el último estudio que se realizó en el laboratorio se analizó la eliminación de 2-butoxietanol mediante el proceso de biofiltro percolador. El 2-butoxietanol es un compuesto habitual de las emisiones industriales del sector de recubrimiento de superficies. Al igual que en el experimento anterior, se llevó a cabo un estudio comparativo de la influencia que el tipo de inóculo presenta sobre la comunidad bacteriana y la eficacia del proceso. En este caso, dos biofiltros percoladores rellenos de espuma de poliuretano PPI 10 se operaron durante 100 días. Cada biorreactor se inoculó con un tipo de inóculo diferente: un cultivo puro de la cepa *Pseudomonas* sp. BOE200 y un fango activado procedente de una EDAR. El experimento se llevó a cabo utilizando dos CV con valores de 130 y 195 g m⁻³ h⁻¹ y un TRVV constante de 12.5 segundos. Los resultados mostraron que ambos sistemas alcanzaron un valor similar de CE, alrededor de 100 g m⁻³ h⁻¹, para la CV de 195 g m⁻³ h⁻¹. Las comunidades bacterianas se estudiaron mediante DGGE y posterior secuenciación del ADN procedente de las bandas predominantes. Además, se utilizaron métodos de cultivo en placa en los que se aislaron bacterias presentes en los biorreactores y se analizó la capacidad de éstas para usar el 2-butoxietanol como fuente de carbono. Los resultados indicaron que existió proliferación de diversas especies en ambos sistemas a lo largo del periodo experimental. De las especies identificadas al final del experimento en el biorreactor que se inoculó con el cultivo puro, *Pseudomonas* fue la única especie con capacidad de usar el 2-butoxietanol como fuente de carbono. En el biorreactor que se inoculó con fango activado se detectó la aparición de nuevas especies, sólo algunas de ellas con capacidad para degradar el 2-butoxietanol como fueron *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La siguiente fase de experimentación corresponde al estudio del proceso de biofiltro percolador durante el tratamiento de emisiones industriales. En este caso, las corrientes gaseosas a depurar se caracterizaron por patrones irregulares de concentración y de composición.

Un biofiltro percolador a escala de planta piloto con un volumen efectivo de 0.75 m³ se ubicó en una empresa dedicada a la fabricación de productos automovilísticos que incluía actividades de recubrimiento de plásticos en las que se

aplicaban imprimaciones, pinturas y barnices en base disolvente. Las emisiones gaseosas resultantes de esta actividad industrial presentaron una concentración variable de COV comprendida entre 100 y 450 mg C Nm⁻³. A lo largo del experimento, de un año de duración, se produjeron cambios en la composición de las emisiones gaseosas con variaciones de la proporción de sustancias de distinta naturaleza química como n-butil acetato, xileno, cumeno o naftaleno, entre otros. El principal objetivo de este estudio fue determinar el mínimo TRVV necesario para que la concentración de COV en el efluente gaseoso cumpliera los límites legales exigidos para esta actividad industrial (75 mg C Nm⁻³). A su vez, se analizó la influencia que la composición de las emisiones gaseosas presenta sobre el rendimiento del biorreactor y sobre la evolución de las poblaciones bacterianas. El biorreactor se llenó con anillos de polipropileno con un diámetro nominal de 50 mm y se inoculó mediante el procedimiento más sencillo empleando fango activado procedente de una EDAR. Los resultados experimentales indicaron que existía una relación entre el rendimiento del biorreactor y la composición de las emisiones a depurar. De modo que para el tratamiento de emisiones compuestas principalmente por sustancias biodegradables (>70%) como n-butil acetato, se cumplieron los límites legales establecidos con TRVV comprendidos entre 30 y 40 segundos. Sin embargo, para el tratamiento de emisiones que contenían una elevada proporción (~60%) de compuestos aromáticos como xileno y compuestos recalcitrantes como cumeno y naftaleno, fue necesario incrementar el TRVV a 80 segundos para el cumplimiento de los límites legales. La aplicación de la técnica FISH mostró que las comunidades bacterianas desarrolladas en el sistema también se vieron afectadas por la variación en la composición de las emisiones gaseosas a lo largo del periodo experimental, dando lugar al desarrollo de comunidades bacterianas diferentes a las identificadas en el inóculo. Por ejemplo, *Gammaproteobacteria* se detectó con elevada abundancia (17%) en el tercer mes de operación, coincidiendo con el tratamiento de emisiones compuestas mayoritariamente por sustancias fácilmente biodegradables. Sin embargo, en el quinto mes de operación la abundancia de este grupo disminuyó hasta el 7%, coincidiendo, en este caso, con el tratamiento de emisiones que contenían compuestos aromáticos y recalcitrantes. Tras un año de operación, con una composición de las emisiones basadas de nuevo en sustancias fácilmente

biodegradables, la abundancia de *Gammaproteobacteria* se incrementó de nuevo hasta el 20%.

Finalmente, se presenta un estudio que completa la transferencia de tecnología del proceso de biofiltro percolador desde la escala de laboratorio hasta la escala industrial. En este caso, se utilizó un biofiltro percolador con un volumen efectivo de 60 m³ instalado como solución final de depuración de las emisiones procedentes de una empresa de fabricación de muebles con diversas actividades de pintado en las que se aplican productos en base disolvente. En este estudio se analizó la influencia que la composición de las emisiones gaseosas presenta sobre la dinámica de la comunidad bacteriana. Las emisiones gaseosas resultantes de esta actividad industrial presentaron una concentración de COV comprendida entre 120 y 600 mg C Nm⁻³. Estas emisiones se caracterizaron por patrones irregulares y oscilantes, con picos de concentración relativamente elevados (hasta 500 y 600 mg C Nm⁻³) y de duración normalmente inferior a 60 segundos. Por este motivo, y a fin de amortiguar la variación de la concentración de COV en las emisiones de entrada al biofiltro percolador, se instaló un prefiltro de carbón activado. El biofiltro percolador se rellenó con anillos de polipropileno y se inoculó con fango activado procedente de una EDAR. El sistema se operó durante 17 meses con TRVV comprendidos entre 20 y 100 segundos. Los resultados de la aplicación de la técnica FISH mostraron una variación temporal de la composición de las comunidades bacterianas que se relacionó con los cambios en la composición de las emisiones gaseosas a lo largo del periodo experimental. Al igual que en los experimentos anteriores, se desarrollaron comunidades bacterianas diferentes a las que se identificaron en el inóculo. En el caso particular del grupo bacteriano *Gammaproteobacteria*, éste incrementó su abundancia desde un 10% en el cuarto mes de operación hasta un 44% en el décimo mes. Este elevado incremento coincidió con la reducción de compuestos aromáticos (0-5%) en las emisiones gaseosas a depurar.

SUMMARY

Volatile organic compounds (VOCs) are one of the main air pollutants which are present in gaseous emissions from a wide range of industrial activities. The knowledge of the adverse effects on human health and environment caused by these substances has led to the development of environmental regulations in Europe related to the control of industrial VOC emissions. Thus, these regulations have generated interest on the development of new treatment technologies in order to reduce these pollutants. Therefore, biological processes, such as biofilters and biotrickling filters, provide a successful treatment, which is a cost-effective and environmentally friendly alternative. Nowadays, there are many studies being carried out at laboratory-scale under controlled operational conditions with the aim of determining the biotreatment efficiency. However, information about the process from a microbiological point of view is still scarce. The development of novel applications of molecular biology tools for microbial identification on the field of environmental ecology provides new possibilities to deepen the role that the microbial community plays in the biofiltration process, with this being one of the emergent research subjects in this field.

This doctoral thesis focuses on the identification and monitoring of microbial communities in biofilters and biotrickling filters for the removal of VOCs from gaseous emissions, as well as their relationship with the system performance. The analysis of bacterial communities has been carried out by the development and application of the following molecular biological tools: fluorescent in situ hybridisation (FISH), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing of the 16S rRNA gene.

Firstly, the molecular biology tools have been applied in laboratory experiments under controlled operating conditions, in which biofilters and biotrickling filters were used for the treatment of gaseous emissions containing a single contaminant. Three experimental studies were performed, each of them with one of the following compounds: isopropanol, styrene and 2-butoxyethanol. All of these are the usual components of gaseous emissions of many industrial activities. Secondly, the process of biotrickling filter was scaled-up to industrial scale to be applied for the treatment of VOC emissions from the coating sector. Two experimental studies focused on the microbial characterization were carried out, one at pilot-scale and the other using a full-

scale biotrickling filter as the final solution for the treatment of the waste gas emissions in an industrial facility.

The first study included in this doctoral thesis consisted of analysing the evolution of the microbial community developed in two biotrickling filters treating waste air contaminated with isopropanol, a typical pollutant contained in the flexographic sector emissions. In this experiment, the influence of the operational parameters inlet load (IL) and empty bed residence time (EBRT) and the packing material on the bacterial community in each bioreactor was evaluated during the 300 day experiment. Each reactor was packed with a different packing material: plastic cross-flow-structured material or polypropylene rings with a nominal diameter of 16 mm. After inoculation with activated sludge from a wastewater treatment plant (WWTP), the biotrickling filters were operated using ILs from 20 to 65 g C m⁻³ h⁻¹ and EBRTs from 14 to 160 s. Removal efficiencies (REs) higher than 80% were obtained with ILs up to 35 g C m⁻³ h⁻¹ working at EBRTs as low as 24 s. Results from DGGE and FISH techniques showed differences in the composition of the established bacterial communities in each of the two bioreactors despite using identical operational conditions; this was related to the use of different packing materials in each bioreactor. In addition, a dynamic of the identified bacterial community was observed in both bioreactors due to changes in the operational conditions throughout the experimental period. Specifically, the bacterial group *Gammaproteobacteria*, often identified in biotreatment systems used to remove VOCs from gaseous emissions, showed an important increase of relative abundance in the two bioreactors, reaching values greater than 20% at the end of the experiment. The analysis of the DGGE banding patterns revealed that *Pseudomonas putida*, a species belonging to the *Gammaproteobacteria* group, was found in both bioreactors from day 60 until the end of the operation.

In the next study, the abatement of styrene waste gas emissions by biofilter and biotrickling filter was investigated. Styrene is a common pollutant of the emissions from industries that process and synthesize polymers. In this experiment, a comparative study was carried out to analyse the influence of the kind of bioprocess and the type of inoculum source on the bacterial communities and on the process efficiency. During 6 months, two biofilters and one biotrickling filter were operated. In the biofilters, two

different organic packing materials were used: peat and coconut fibre; and the biotrickling filter was packed with polypropylene rings with a nominal diameter of 25 mm. Two different inoculum sources were used: an enriched culture of the strain *Pseudomonas putida* CECT 324 in the biofilters and an activated sludge from a WWTP in the biotrickling filter. During the operation of the systems, the IL and EBRT were changed with values between 10 and 45 g C m⁻³ h⁻¹ and between 30 and 120 s, respectively. Results indicated that both kinds of bioreactor reached a similar value of elimination capacity (EC) ~40 g m⁻³ h⁻¹ with an IL of 75 g m⁻³ h⁻¹ and an EBRT of 60 s. Results of FISH and DGGE techniques showed a different composition of the bacterial communities with the source of used inoculum. The bacterial group *Gammaproteobacteria* showed high abundances, greater than 15%, in both the biofilters and the biotrickling filter during the entire experimental period. At the end of the experiment, this bacterial group was predominant, with abundances greater than 25%. In the case of the biotrickling filter inoculated with activated sludge, a high increase of the species *Pseudomonas putida* was detected. This species was previously identified in the activated sludge with a relative abundance of 1%; however, after 165 days of operation, its abundance achieved values of 15%.

In the last study carried out in the laboratory, the removal of 2-butoxyethanol was conducted using biotrickling filtration. 2-Butoxyethanol is a common compound of the industrial emissions from the surface coating sector. As in the previous experiment, a comparative study of the influence of the kind of the inoculum on the bacterial community and on the process efficiency was carried out. In this case, two biotrickling filters packed with polyurethane foam PPI 10 were operated during 100 days. Each bioreactor was inoculated with a different kind of inoculum source: a pure culture of the strain *Pseudomonas* sp. BOE200 and an activated sludge from a WWTP. The experiment was performed at two ILs with values of 130 and 195 g m⁻³ h⁻¹, and at a constant EBRT of 12.5 s. The results showed that both bioreactors achieved a similar value of EC ~100 g m⁻³ h⁻¹ with an IL of 195 g m⁻³ h⁻¹. The bacterial communities were studied by DGGE and subsequent sequencing of the DNA contained within the predominant bands. In addition, plating methods were used where bacteria from the bioreactors were isolated and the ability of such bacteria to use 2-butoxyethanol as carbon source was analysed. The results indicated that an emergence of species

occurred in both bioreactors during the experimental period. From the identified species at the end of the experiment, *Pseudomonas* sp. was the only species with the ability to use 2-butoxyethanol as carbon source. In the bioreactor inoculated with activated sludge, the appearance of new species was detected; only some of them, such as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, were able to degrade 2-butoxyethanol.

The next experimental phase corresponds to the study of the biotrickling filter process for the treatment of industrial emissions. In this case, the waste gas emissions were characterised by uneven patterns of concentration and composition.

A biotrickling filter at pilot scale with an effective volume of 0.75 m³ was located in a company dedicated to manufacturing products which included plastic coating activities in which solvent-based primers, paints and varnishes were applied. The gaseous emissions from this industrial activity comprised variable VOC concentrations ranging between 100 and 450 mg C Nm⁻³. During the experiment, with a duration of 1 year, changes in the composition of gaseous emissions with variations of the proportion of substances of different chemical nature such as n-butyl acetate, xylene, cumene or naphthalene, among others, were produced. The main objective of this study was to determine the minimum value of EBRT so that the VOC concentration of the waste gas satisfies the legal limits of this industrial activity (75 mg C Nm⁻³). In addition, the influence of the composition of the waste gases on the bioreactor efficiency and on evolution of the bacterial community was analysed. The bioreactor was packed with polypropylene rings with a nominal diameter of 50 mm and it was inoculated with the easiest procedure using activated sludge coming from a WWTP. The experimental results pointed out a relationship between the bioreactor performance and the composition of the waste gas emissions. Thus, for the treatment of emissions containing mainly biodegradable substances (>70%), such as n-butyl acetate, the legal limits were satisfied with the EBRT range between 30 and 40 s. However, for the treatment of emissions containing a greater proportion (~60%) of aromatic compounds, such as xylene, and recalcitrant compounds, such as cumene and naphthalene, it was necessary to increase the EBRT to 80 s to meet the legal limits. The application of the FISH technique showed that the bacterial communities

developed in the system were also influenced by changes in the composition of the gaseous emissions during the experimental period, resulting in the development of different bacterial communities from those identified in the inoculum. For example, *Gammaproteobacteria* was detected with high abundance (17%) in the third month of operation when the treated gas emissions were mainly composed of easily biodegradable substances. However, in the fifth month of operation, the abundance of this bacterial group decreased by up to 7% during the treatment of emissions containing aromatic and recalcitrant compounds. After a year of operation, the abundance of *Gammaproteobacteria* increased by up to 20% with industrial emissions again composed of biodegradable substances.

Finally, a study that completes the scale-up of the biotrickling filter process from laboratory to the industrial scale is presented. In this case, a full-scale biotrickling filter with an effective volume of 60 m³ was used as the final solution for the treatment of gaseous emissions from a furniture facility with diverse paint activities in which solvent-based products were applied. In this study, the influence of the composition of the gaseous emissions on the dynamic of the microbial community was analysed. The gaseous emissions from this industrial activity presented VOC concentrations between 120 and 600 mg C Nm⁻³. These emissions were characterised by uneven and oscillating patterns, with peaks of relatively high concentration (up to 500 and 600 mg C Nm⁻³) and a duration of usually lower than 60 s. In fact, in order to smooth the variation of the VOC concentration of the inlet emissions to the biotrickling filter, an activated carbon pre-filter was installed. The biotrickling filter was packed with polypropylene rings and was inoculated with activated sludge from a WWTP. The system was run for 17 months at TRVV between 20 and 100 seconds. FISH results showed a temporal variation in composition of the bacterial communities which was associated with changes in the composition of the gaseous emissions during the experimental period. As in previous experiments, different bacterial communities from those identified in the inoculum were developed. Specifically, the group *Gammaproteobacteria* increased its abundance from 10% in the fourth month of operation up to 44% in the tenth month. This high increase matched with the decrease of aromatic compounds (0-5%) in the waste gas emissions requiring treatment.

Índice

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Justificación de la tesis	3
1.2 Objetivos	3
1.3 Estructura de la tesis y contribución a los artículos de la tesis	5
2. BIOFILTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES	9
2.1 Compuestos orgánicos volátiles	11
2.2 Tecnologías de tratamiento de emisiones gaseosas	13
2.2.1 Sistemas físico-químicos	14
2.2.2 Sistemas biológicos	17
2.3 Biofiltros	22
2.4 Biofiltros percoladores	29
2.5 Bibliografía	36
3. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR AL ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS	45
3.1 Clonaje y secuenciación de los genes 16S ARNr	47
3.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)	51
3.3 Hibridación fluorescente in situ (FISH)	55
3.4 Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP)	58
3.5 Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)	60
3.6 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)	61
3.7 Análisis de los espaciadores intergénicos ribosomales (RISA)	62
3.8 Pirosecuenciación	63
3.9 Bibliografía	65
4. MATERIALES Y MÉTODOS	71
4.1 Sistemas de biofiltración	73
4.1.1 Biofiltros de laboratorio	73
4.1.2 Biofiltros percoladores de laboratorio	75
4.1.3 Planta piloto de biofiltro percolador	79
4.1.4 Unidad industrial de biofiltro percolador	82
4.2 Materiales	84
4.2.1 Materiales de relleno	84
4.2.2 Compuestos	85
4.2.3 Disoluciones de nutrientes	87
4.2.4 Inóculos	91

4.3 Técnicas analíticas para el control y el seguimiento de los biorreactores	93
4.3.1 Concentración de COV	93
4.3.2 Pérdida de carga	94
4.3.3 Dióxido de carbono (CO ₂)	94
4.3.4 pH, conductividad y temperatura	94
4.3.5 Nutrientes	95
4.3.6 Demanda química de oxígeno (DQO)	95
4.3.7 Carbono orgánico total y carbono inorgánico	95
4.3.8 Sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles	95
4.3.9 Contenido de humedad de los rellenos orgánicos	96
4.4 Técnicas de biología molecular para la caracterización y el seguimiento de la comunidad bacteriana	96
4.4.1 Hibridación fluorescente in situ (FISH)	96
4.4.2 Extracción de ADN	101
4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	102
4.4.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE)	104
4.4.5 Secuenciación del gen 16S ARNr	105
4.5 Técnicas de cultivo en placa	106
4.6 Bibliografía	106
5. Microbial community analysis in biotrickling filters treating isopropanol air emissions	109
5.1 Introduction	111
5.2 Materials and methods	112
5.3 Results and discussion	115
5.4 Conclusions	118
5.5 References	119
6. Abatement of styrene waste gas emission by biofilter and biotrickling filter: comparison of packing materials and inoculation procedures	121
6.1 Introduction	123
6.2 Materials and methods	124
6.3 Results	127
6.4 Discussion	132
6.5 References	135

7. Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam	137
7.1 Introduction	140
7.2 Material and methods	142
7.3 Results and discussion	146
7.4 Conclusions	154
7.5 References	155
8. Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector	157
8.1 Introduction	159
8.2 Material and methods	160
8.3 Results and discussion	161
8.4 Conclusions	166
8.5 References	166
9. Evolution of bacterial community in a full-scale biotrickling filter by fluorescence in situ hybridization (FISH)	167
9.1 Introduction	169
9.2 Material and methods	170
9.3 Results and discussion	171
9.4 Conclusions	173
9.5 References	174
10. CONCLUSIONES GENERALES	175
11. GENERAL CONCLUSIONS	185

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Justificación de la tesis

Hasta la fecha el estudio del proceso de biofiltración para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV se ha centrado básicamente en la evaluación del funcionamiento de los biorreactores a escala de laboratorio. Sin embargo, la comunidad microbiana que se desarrolla en estos sistemas y que, a su vez, es la responsable de la degradación de los contaminantes se ha estudiado en menor medida. Así, la realización de esta tesis doctoral queda justificada por la necesidad de ampliar el conocimiento sobre los aspectos microbiológicos del proceso de biofiltración de emisiones gaseosas tanto en laboratorio, bajo condiciones de operación controladas, como en emplazamientos industriales, bajo patrones de emisión irregulares.

La presente tesis doctoral proporciona información acerca de la caracterización y el seguimiento de las comunidades bacterianas desarrolladas en biofiltros y biofiltros percoladores y su relación con las condiciones de funcionamiento de estos sistemas como resultado de la aplicación de técnicas de biología molecular. En este sentido, se estudia la influencia que el tipo de bioproceso y el tipo de inóculo presentan sobre la microbiología y la eficacia del proceso. Este trabajo se ha orientado al estudio de la eliminación de compuestos que habitualmente son constituyentes de los efluentes gaseosos de numerosos sectores industriales. A su vez, esta tesis doctoral supone una aportación novedosa para la aplicación industrial del proceso de biofiltro percolador en el tratamiento de emisiones de COV.

1.2. Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en el análisis de las comunidades bacterianas desarrolladas en biofiltros y biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV, y en el estudio de su relación con las condiciones de funcionamiento del proceso. El desarrollo de este objetivo general se ha llevado a cabo utilizando biorreactores a escala de laboratorio en los que se trataron emisiones gaseosas contaminadas con un único contaminante (isopropanol, estireno y 2-butoxietanol) y sistemas a escala industrial en los que se trataron

emisiones caracterizadas por patrones irregulares de concentración y de composición. El objetivo general de esta tesis doctoral se desglosa en los siguientes objetivos parciales:

1. Puesta a punto y aplicación de las siguientes técnicas de biología molecular: hibridación fluorescente in situ (FISH), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación del gen 16S ARNr.
2. Análisis de la dinámica de las comunidades bacterianas desarrolladas en el proceso de biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con isopropanol. Estudio de la influencia que presenta el tipo de material de relleno sobre las comunidades bacterianas.
3. Estudio de la biofiltración de emisiones gaseosas de estireno mediante el proceso de biofiltro y biofiltro percolador. Estudio comparativo de la influencia que el tipo de bioproceso y el tipo de inóculo presentan sobre la dinámica de la comunidad bacteriana y sobre la eficacia del proceso.
4. Estudio de la biofiltración de emisiones gaseosas de 2-butoxietanol mediante el proceso de biofiltro percolador. Estudio comparativo de la influencia que el tipo de inóculo presenta sobre las comunidades bacterianas desarrolladas y la eficacia del proceso. Identificación de especies degradadoras de 2-butoxietanol.
5. Estudio de la biofiltración de emisiones industriales mediante el proceso de biofiltro percolador. Análisis de la dinámica de las comunidades bacterianas ante variaciones en la composición y en la concentración de las emisiones a depurar.

1.3. Estructura de la tesis y contribución a los artículos pertenecientes a la tesis

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de 5 artículos científicos dispuestos en 5 capítulos (capítulo 5-9) de acuerdo con los objetivos expuestos anteriormente. La tesis doctoral incluye dos capítulos introductorios en los que se describen la aplicación de la biofiltración al tratamiento de emisiones gaseosas de COV (capítulo 2) y la aplicación de las técnicas de biología molecular para la caracterización de las comunidades microbianas de estos sistemas (capítulo 3). A fin de proporcionar una visión integrada de las principales técnicas experimentales utilizadas, en el capítulo 4 se incluye una breve descripción de las mismas. Las referencias completas de los artículos científicos son las siguientes:

Artículo I (capítulo 5): Pérez MC, Álvarez-Hornos FJ, San Valero P, Marzal P, Gabaldón C. 2013. Microbial community analysis in biotrickling filters treating isopropanol air emissions. *Environmental Technology*. 34: 2789-2798.

Artículo II (capítulo 6): Pérez MC, Álvarez-Hornos FJ, Portune K, Gabaldón C. 2015. Abatement of styrene waste gas emission by biofilter and biotrickling filter: comparison of packing materials and inoculation procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99: 19-32.

Artículo III (capítulo 7): Pérez MC, Álvarez-Hornos FJ, Engesser K-H, Dobsław D, Gabaldón C. 2015. Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam. *New Biotechnology*. En revisión.

Artículo IV (capítulo 8): Álvarez-Hornos FJ, Lafita C, Martínez-Soria V, Peña-Roja JM, Pérez MC, Gabaldón C. 2011. Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector. *Biochemical Engineering Journal*. 58-59:154-161.

Artículo V (capítulo 9): Pérez MC, Álvarez-Hornos FJ, San Valero P, Gabaldón C, Martínez-Soria V. 2012. Evolution of bacterial community in a full-scale biotrickling filter by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). *Procedia Engineering*. 42: 666-671.

En el capítulo 5 se analiza la dinámica de las comunidades bacterianas desarrolladas en dos biofiltros percoladores empleados para el tratamiento de emisiones contaminadas con isopropanol. Se realizó un experimento con una duración de 300 días utilizando dos biofiltros percoladores cada uno de ellos con un material plástico diferente: relleno estructurado y anillos de polipropileno con diámetro nominal de 16 mm. Los biorreactores se inocularon con fango activado procedente de una EDAR y se operaron con CV comprendidas entre 20 y 65 g C m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 14 y 160 segundos. En lo que respecta a mi contribución en el trabajo que se presenta en este capítulo, he desarrollado la parte experimental relacionada con la puesta a punto de las técnicas de biología molecular, así como la subsiguiente aplicación de las técnicas FISH y DGGE con el objeto de llevar a cabo la caracterización y el seguimiento de la comunidad bacteriana. Además, he trabajado en la evaluación de los resultados, la obtención de las conclusiones y la escritura del artículo científico bajo la supervisión de mis directores de tesis, la Dra. Carmen Gabaldón y el Dr. Fco. Javier Álvarez-Hornos.

El capítulo 6 incluye un estudio sobre la eliminación de estireno en emisiones gaseosas mediante biofiltro y biofiltro percolador. Para este experimento se utilizaron un biofiltro de turba, un biofiltro de fibra de coco y un biofiltro percolador relleno con anillos de polipropileno de diámetro nominal de 25 mm. Se utilizaron dos tipos de inóculos: un cultivo enriquecido de la cepa *Pseudomonas putida* CECT 324 para los biofiltros y fango activado procedente de una EDAR para el biofiltro percolador. Los biorreactores se operaron durante 6 meses con CV comprendidas entre 10 y 45 g C m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 30 y 120 segundos. Acerca de mi aportación en el trabajo detallado en este capítulo, he llevado a cabo toda la parte experimental, desde la puesta en marcha y la operación de los biorreactores hasta el análisis de la comunidad bacteriana mediante las técnicas de biología molecular FISH y DGGE. Además, he trabajado en la evaluación de los resultados, la obtención de las conclusiones y la escritura del artículo científico bajo la supervisión de mis directores de tesis.

El capítulo 7 se centra en la depuración de emisiones gaseosas contaminadas con 2-butoxietanol mediante biofiltro percolador. Se emplearon dos reactores rellenos con espuma de poliuretano PPI 10 y se utilizó un tipo de inóculo diferente para cada uno de ellos: cultivo puro de la cepa *Pseudomonas* sp. BOE200 y fango activado procedente de una EDAR. El experimento de 100 días de duración se llevó a cabo utilizando dos CV con valores de 130 y 195 g m⁻³ h⁻¹ y un TRVV constante de 12.5 segundos. En relación a mi contribución en este trabajo, he desarrollado el experimento completo desde la puesta en marcha y la operación de los biorreactores hasta el análisis de la comunidad bacteriana mediante las técnicas de biología molecular: DGGE y secuenciación del gen 16S ARNr y técnicas de cultivo en placa. Además he trabajado en la evaluación de los resultados, la obtención de las conclusiones y la escritura del artículo bajo la supervisión de mis directores de tesis. Este capítulo incluye resultados obtenidos en la Universidad de Stuttgart donde realicé una estancia de investigación de tres meses de duración, requisito indispensable para la obtención de la Mención Internacional en el título de Doctor, y que fue supervisada por el Dr. Karl Engesser.

En el capítulo 8 se incluye un estudio sobre la aplicación del proceso de biofiltro percolador a escala piloto para el tratamiento de emisiones industriales. El biorreactor, de 0.75 m³ de volumen efectivo, se ubicó en una empresa dedicada a la fabricación de productos automovilísticos que incluía actividades de recubrimiento de plásticos en las que se aplicaban imprimaciones, pinturas y barnices en base disolvente. Las emisiones gaseosas resultantes de esta actividad industrial presentaron una concentración variable de COV comprendida entre 100 y 450 mg C Nm⁻³. El biofiltro percolador se rellenoó con anillos de polipropileno de 50 mm y se inoculó con fango activado procedente de una EDAR. Acerca de mi participación en este estudio, desarrollé los experimentos sobre la caracterización microbiológica del sistema mediante la técnica FISH. Además, participé en la operación y en el control de la planta piloto junto al estudiante de doctorado Carlos Lafita. Por último, trabajé en la evaluación de los resultados, la obtención de las conclusiones y la escritura del artículo junto con mis directores de tesis. Este artículo científico únicamente ha sido incluido en esta tesis doctoral y se utiliza exclusivamente para la defensa de mi título de doctor.

En el capítulo 9 se presentan los resultados de la caracterización y el seguimiento de la comunidad bacteriana en un biofiltro percolador industrial. El biorreactor, de 60 m³ de volumen efectivo, se instaló como solución final de depuración de las emisiones procedentes de una empresa de fabricación de muebles con actividades de pintado y de barnizado en las que se aplican productos en base disolvente. Las emisiones gaseosas resultantes de esta actividad industrial presentaron una concentración de COV comprendida entre 120 y 600 mg C Nm⁻³. El biofiltro percolador se rellenó con anillos de polipropileno, se inoculó con fango activado procedente de una EDAR, y se realizó su seguimiento a lo largo de 17 meses de experimentación. Mi principal aportación a nivel experimental estuvo relacionada con la aplicación de la técnica FISH para el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas. Además, llevé a cabo la evaluación de resultados, la obtención de las conclusiones y la escritura del artículo bajo la supervisión del Dr. Vicente Martínez-Soria y de mis directores de tesis.

2. BIOFILTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

2.1. Compuestos orgánicos volátiles

La contaminación atmosférica causa efectos perjudiciales tanto en la salud humana como en el medio ambiente, lo que a su vez deriva en importantes pérdidas económicas. La Agencia Europea de Medio Ambiente (*European Environment Agency*, EEA) ha determinado un aumento de la incidencia de una amplia gama de enfermedades e incluso fallecimientos como consecuencia de la mala calidad del aire, además de las pérdidas que se generan en la agricultura y en la biodiversidad de los ecosistemas. Por ejemplo, en España, durante el año 2011 se atribuyeron 25,000 fallecimientos a la acumulación de ozono troposférico en concentraciones excesivas. Los daños derivados de la contaminación atmosférica han supuesto a España costes económicos superiores a 20,000 millones de euros en el periodo comprendido entre 2008 y 2012 (EEA, Informes 5/2014 y 20/2014). Por todo ello, en las últimas décadas se ha reforzado la política ambiental europea en esta materia, sin embargo, los problemas de contaminación del aire persisten, especialmente en zonas urbanas donde se rebasan ocasionalmente los valores límite de los contaminantes en el aire. Uno de los principales grupos de contaminantes atmosféricos son los compuestos orgánicos volátiles (COV).

Los COV se definen como todo aquel compuesto orgánico, así como la fracción de creosota, que tenga a 293.15 K una presión de vapor mayor o igual de 0.01 kPa, o que tenga una volatilidad equivalente en las condiciones particulares de uso (Artículo 3 de la Directiva 2010/75/UE de 24 de noviembre de 2010).

A pesar de que existen fuentes naturales de emisión de COV como microorganismos y plantas, las principales fuentes de emisión son de origen antropogénico. La emisión de estos compuestos está fuertemente influenciada por las actividades industriales, tal y como se puede apreciar en la Figura 2.1, en la que se presenta el porcentaje de emisiones de COV no metánicos de distintas actividades industriales en España durante el año 2012. Las actividades que presentan mayores emisiones son las instalaciones de combustión (26%), refinerías de petróleo y gas (25%) y el tratamiento de superficies con disolventes orgánicos (17%).

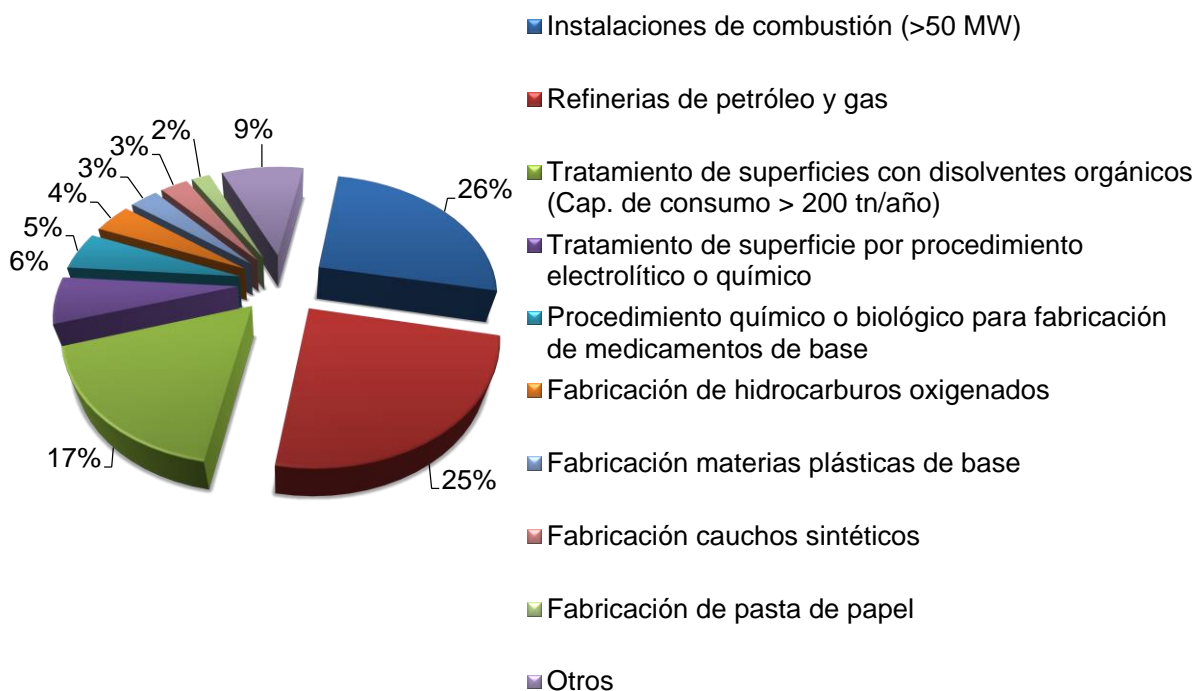


Figura 2.1. Distribución de emisiones de COV distintos del metano en España durante el año 2012 (PRTR-España 2012).

El principal impacto ambiental de estos compuestos se produce cuando se mezclan con otros contaminantes atmosféricos, como los óxidos de nitrógeno (NO_x), y reaccionan con la luz solar, formando ozono troposférico que contribuye al problema del smog fotoquímico. En cuanto a sus consecuencias sobre la salud humana, los efectos de los COV dependen de la naturaleza de cada compuesto y del nivel y del tiempo de exposición al mismo. En general, la exposición a corto plazo puede causar irritación de los ojos y de las vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, fatiga, pérdida de coordinación, reacciones alérgicas de la piel, náusea y trastornos de la memoria. La exposición a largo plazo puede causar lesiones del hígado, de los riñones y del sistema nervioso central e incluso cáncer (Kjaergaard y col., 1991).

A consecuencia del aumento de las actividades industriales emisoras de COV por el uso de disolventes orgánicos y del avance en el conocimiento de los efectos nocivos que estos compuestos presentan sobre la salud humana y el medio ambiente, se ha establecido legislación europea específica que regula la emisión de estos contaminantes. En este contexto, el Consejo de la Unión Europea aprobó el 11

de marzo de 1999 la Directiva 1999/13/CE relativa a la limitación de las emisiones de COV debidas al uso de disolventes orgánicos en determinadas actividades e instalaciones. Esta directiva se transpuso al ordenamiento español mediante el Real Decreto 117/2003. El 21 de abril de 2004 se aprobó la Directiva 2004/42/CE relativa a la limitación de las emisiones de COV debidas al uso de disolventes orgánicos en determinadas pinturas y barnices y en los productos de renovación del acabado de vehículos, por la que se completa la Directiva 1999/13/CE. La transposición de esta directiva al derecho español se realizó mediante el Real Decreto 227/2006. Finalmente, se aprobó la Directiva 2010/75/UE, de 24 de noviembre, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación) con el objetivo de lograr un alto nivel de protección del medio ambiente y simplificar el marco jurídico existente en esta materia. La transposición de esta nueva Directiva, actualmente vigente, se llevó a cabo mediante la Ley 5/2013 y el Real Decreto 815/2013.

2.2. Tecnologías de tratamiento de emisiones gaseosas

Las tecnologías disponibles para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV se agrupan en dos tipologías, los sistemas físico-químicos y los sistemas biológicos. Tradicionalmente, los sistemas de tratamiento físico-químicos como la adsorción, la absorción, la condensación y la incineración han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, en la actualidad, los sistemas de tratamiento biológicos como la biofiltración se han consolidado como alternativas competitivas, eficientes, económicas y respetuosas con el medio ambiente (Delhoménie y Heitz, 2005).

La selección de la técnica óptima para una aplicación concreta depende de diversos factores, entre los que destacan la naturaleza del compuesto a degradar, la concentración de contaminante, el caudal de aire, los niveles de eliminación requeridos y el coste global del proceso de depuración. Existen recomendaciones para la selección de alternativas de tratamiento en función de la concentración de COV en la corriente gaseosa a depurar y del caudal de aire (Figura 2.2). Cada técnica posee un campo de aplicación definido por un intervalo óptimo de caudal y

de concentración de contaminante. En ocasiones se pueden solapar dos técnicas, en tal caso, la decisión dependerá de factores tanto económicos como técnicos.

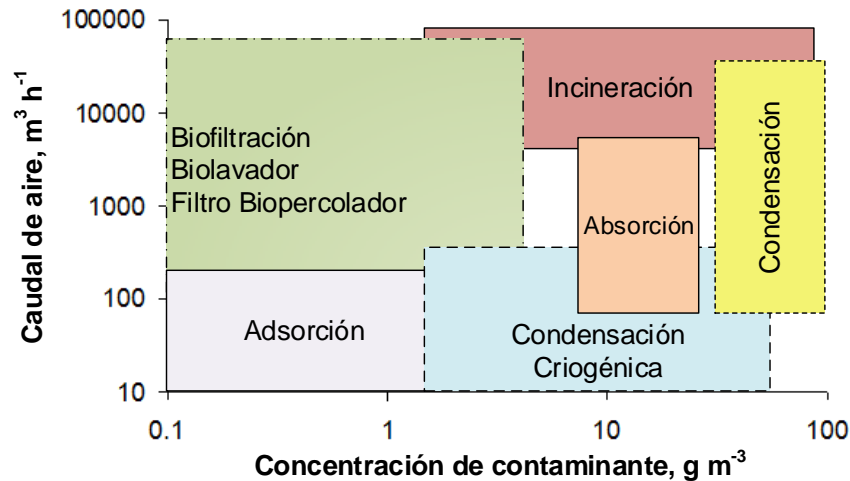


Figura 2.2. Intervalos de concentración y caudal para la selección de tecnologías de tratamiento de emisiones de COV. Adaptada de Shareefdeen y Singh (2005).

2.2.1. Sistemas físico-químicos

Los sistemas de tratamiento físico-químicos se han utilizado ampliamente para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV. Dentro de estas tecnologías existen técnicas que permiten la recuperación de contaminantes como la condensación, la adsorción, la absorción y los procesos de separación por membranas, y técnicas de destrucción total o parcial del contaminante como la incineración térmica o catalítica (Ruddy y Carroll, 1993; Khan y Ghoshal, 2000).

La condensación es un proceso que permite la recuperación de vapores de disolventes de una corriente de gas residual reduciendo su temperatura por debajo del punto de rocío (Dunn y El-Halwagi, 1994a y 1994b). Existen tres tipos de condensadores: convencionales, criogénicos y de refrigeración. Esta técnica se utiliza frecuentemente cuando el contaminante puede ser reutilizado en el proceso, evitando así el coste de materiales nuevos. Se trata de una tecnología que permite altas eficacias de recuperación y está indicada para la depuración de corrientes gaseosas con elevada concentración de COV (5000 ppm_v).

La adsorción consiste en la retención de las moléculas de gas sobre una superficie sólida llamada adsorbente que presenta mayor afinidad por determinados compuestos, eliminándolos así de la corriente de aire. Cuando el adsorbente alcanza la capacidad máxima de retención de contaminantes se necesita su regeneración (Ruthven, 1984), por ello, se suelen instalar dos líneas de adsorción en paralelo para mantener siempre una de ellas en estado operativo mientras la otra línea se encuentra en proceso de regeneración. El carbón activado es uno de los adsorbentes más empleados debido a su elevada área específica (Foster y col., 1992; Das y col., 2004; Yi y col., 2009). También gel de sílice, zeolita, alúmina y polímeros pueden ser utilizados como adsorbentes (Takeuchi y col., 1995; Kosuge y col., 2007). Los tratamientos basados en este proceso se aplican a corrientes de aire que presentan una humedad inferior al 70% y concentraciones de COV comprendidas entre 20 y 2000 ppm_v.

La absorción es un proceso en el que se separan los contaminantes de la corriente gaseosa poniendo en contacto el aire contaminado con un disolvente líquido (agua, aminas, sosa cáustica, hidrocarburos con alto punto de ebullición). Los compuestos solubles se disuelven en la fase líquida depurándose así la corriente de aire (Geisthardt y col., 1989; Stockeley, 1994). El contacto gas-líquido se realiza en torres de relleno en las que se atomiza el líquido. En general esta técnica se aconseja para corrientes con alto contenido en humedad y concentraciones de COV comprendidas entre 500 y 5000 ppm_v.

La tecnología de separación por membranas utiliza una estructura basada en compuestos poliméricos semipermeables para separar los compuestos orgánicos del aire. La fuerza impulsora para el flujo de aire es el gradiente de presión a través de la membrana que se consigue con ayuda de un sistema de compresión (Paul y col., 1988). Las membranas pueden ser laminares, tubulares, capilares o de fibras huecas y también pueden disponerse en módulos. Los módulos capilares y de fibras huecas presentan altos coeficientes globales de transferencia de materia debido a su elevada área superficial. Esta técnica presenta elevadas eficacias de recuperación y se suele aplicar al tratamiento de efluentes con concentraciones variables de COV entre 1000 y 10000 ppm_v (Majumdar y col., 2001; Everaert y col., 2003).

La incineración térmica es un proceso de oxidación de los compuestos combustibles para situaciones de alta carga de contaminantes. La corriente gaseosa se calienta a una temperatura comprendida entre 200 y 400 °C por encima de su punto de inflamación y se mezcla en un horno con aire u oxígeno hasta la completa combustión manteniendo temperaturas elevadas comprendidas entre 700 y 1100 °C (O'Reilly, 1997 y 1998). Esta técnica presenta elevadas eficacias, pero es necesario aportar un combustible adicional si las concentraciones de contaminantes en el aire a depurar están por debajo del punto de autoignición y en cualquier caso, para la puesta en marcha y para mantener la estabilidad de la llama. En los casos de combustión incompleta se pueden producir emisiones de CO y NO_x, además en el caso de compuestos clorados existe riesgo de formación de dioxinas. Los incineradores recuperativos y regenerativos mejoran la eficiencia energética recuperando parte de la energía calorífica de la corriente de gas de salida. Los incineradores recuperativos utilizan intercambiadores de calor y están indicados para tratar emisiones gaseosas con una concentración de COV inferior a 2000 ppmv. Los incineradores regenerativos utilizan intercambiadores de calor de contacto directo contruidos de material cerámico que puede alcanzar temperaturas elevadas. Los incineradores regenerativos se recomiendan para corrientes de aire con concentraciones de COV inferiores a 1000 ppmv (EPA, 2002).

Los sistemas de incineración catalítica oxidan directamente los COV de forma similar a los sistemas de incineración térmica. La principal diferencia es que en la incineración catalítica se opera a temperaturas inferiores (500-700 °C) debido a la utilización de catalizadores que reducen las necesidades térmicas (Spivey, 1987). Las eficacias de eliminación son ligeramente menores que en el caso de la incineración térmica, pero los requisitos de combustible auxiliar son inferiores. Las emisiones de CO se reducen aunque existe el riesgo de producción de dioxinas. Uno de los principales costes de este tipo de tecnología es la sustitución del catalizador que presenta una vida útil de entre 3 y 5 años (Everaert y Baeyens, 2004).

2.2.2. Sistemas biológicos

El tratamiento de aire contaminado con COV mediante procesos biológicos resulta una alternativa eficaz y versátil que se basa en la capacidad de ciertos microorganismos de transformar los contaminantes orgánicos e inorgánicos del aire en compuestos menos tóxicos y menos olorosos. El proceso de eliminación de los contaminantes del aire en sistemas biológicos está compuesto de varias etapas tal y como se esquematiza en la Figura 2.3. En primer lugar, el contaminante y el oxígeno se deben transferir desde el aire a la fase acuosa para, posteriormente, difundirse desde ésta a la biopelícula donde se produce la biodegradación de los COV. La biopelícula consiste en una asociación compleja de microorganismos que se encuentran embebidos sobre la matriz extracelular polimérica, resultado de la segregación por parte de los microorganismos de estructuras adhesivas polisacáridas. Las biopelículas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes y capacidad de comunicación intercelular que los convierte en consorcios microbianos complejos con elevada resistencia (Characklis y Marshall, 1990). Los microorganismos degradan los contaminantes presentes en la corriente gaseosa utilizándolos como fuente de energía y de sustrato, en presencia de oxígeno y nutrientes, transformándolos en energía, biomasa y subproductos orgánicos e inorgánicos principalmente agua y CO_2 (Deshusses y col., 1995).

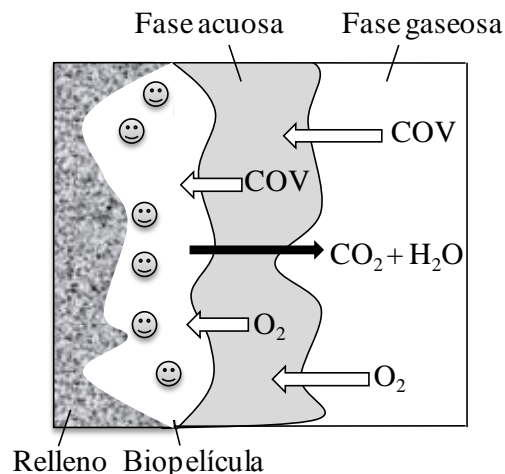


Figura 2.3. Eliminación biológica de COV.

En el caso de biorreactores empleados para la eliminación de COV de emisiones gaseosas se ha detectado una gran diversidad de microorganismos, lo que depende de factores tales como el tipo de inóculo, el contaminante a degradar, las condiciones de operación (flujo de aire y concentración de contaminantes), los nutrientes, el pH, la temperatura, la humedad o el oxígeno (Shareefdeen y Singh, 2005). Las comunidades microbianas están compuestas tanto por microorganismos degradadores primarios que utilizan como fuente de carbono los COV presentes en la corriente gaseosa, como por otros microorganismos que consumen productos derivados de la lisis celular o sustancias poliméricas extracelulares que forman parte de la biopelícula (Stoffels y col., 1998). Esta coexistencia de microorganismos produce una alta diversidad que parece necesaria para la formación del consorcio bacteriano responsable de la degradación de COV del aire. En este sentido, se han identificado principalmente bacterias heterótrofas aunque también se han detectado otros microorganismos como actinomicetos, hongos, levaduras, algas y protozoos (Singh y col., 2005). Los grupos filogenéticos de bacterias identificados con mayor asiduidad son: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Especialmente destacan géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Xanthobacter* o *Clostridium* (Ottengraf, 1986; Friedrich y col., 2003; Kristiansen y col., 2011). También es importante resaltar el papel de los hongos ya que se ha determinado la capacidad de algunos de ellos para degradar compuestos orgánicos como es el caso de los siguientes géneros: *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Cladosporium* o *Exophiala* (García-Peña y col., 2001; Spigno y col., 2003; Moe y col., 2004).

Aunque la base de todos los procesos biológicos es la misma, éstos se pueden implementar mediante diferentes configuraciones de biorreactor, siempre intentando maximizar la transferencia de los contaminantes hacia la fase acuosa y proporcionar condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos. Las diferentes técnicas de biotratamiento de emisiones gaseosas se diferencian en el método de retención de la biomasa en el reactor y en las condiciones de flujo de la fase líquida. Los principales biorreactores utilizados para el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con COV son biofiltros, biofiltros percoladores y biolavadores. Además, existen otros sistemas tales como biorreactores de

membrana, sistemas multifásicos o reactores de tiro o corriente de aire (reactores *airlift*), entre otros.

Los biofiltros son reactores en los que la corriente de gas contaminada se hace pasar a través de un relleno orgánico (suelo, compost, turba, etc.) sobre el que crecen los microorganismos responsables de la degradación de los contaminantes (Ottengraf, 1987). En la Figura 2.4a se establece una representación esquemática de un biofiltro. En estos sistemas es necesario una pre-humidificación del aire de entrada y la adición de nutrientes requeridos para el metabolismo microbiano. Se trata de una biotecnología efectiva y económica que se suele aplicar al tratamiento de emisiones de media-baja carga de contaminantes (Leson y Winer, 1991). Un problema en la operación de este tipo de biorreactor está asociado con el control de la humedad del material de relleno.

Los biofiltros percoladores se consideran una modificación de los biofiltros (Figura 2.4b). Las principales diferencias se encuentran en el material de relleno, en este caso suelen emplearse materiales inertes, y en la utilización de una fase líquida (solución de recirculación) que se introduce periódicamente en el biorreactor permitiendo mayor control de parámetros de operación tales como el pH y los nutrientes (Cox y Deshusses, 2001). Algunos de los materiales de relleno utilizados en los biofiltros percoladores son: espuma de poliuretano, perlita, material cerámico o anillos de polipropileno (Kennes y Veiga, 2002). Uno de los problemas que se puede producir en estos sistemas después de un tiempo prolongado de operación es el aumento de las pérdidas de presión por el crecimiento excesivo de la biomasa (*clogging*).

Los biolavadores son biorreactores en los que la biomasa se encuentra suspendida en una fase acuosa móvil. En estos sistemas, el gas es transferido a la fase acuosa en una torre de absorción que puede contener un soporte inerte (Figura 2.4c). El agua con el contaminante disuelto se trata posteriormente en un biorreactor de fangos activados (Edwards y Nirmalakhandan, 1996). Los biolavadores permiten el control de las condiciones de operación ya que se pueden agregar nutrientes y soluciones amortiguadoras de pH, además el líquido puede regenerarse para descargar subproductos indeseables. Sin embargo, debido a que su área de

intercambio gas/líquido es baja, este reactor está restringido a compuestos altamente solubles. Además, se genera un exceso de fango y se necesita un suministro extra de aire para mejorar la eficacia de eliminación (Granstöm y col., 2002).

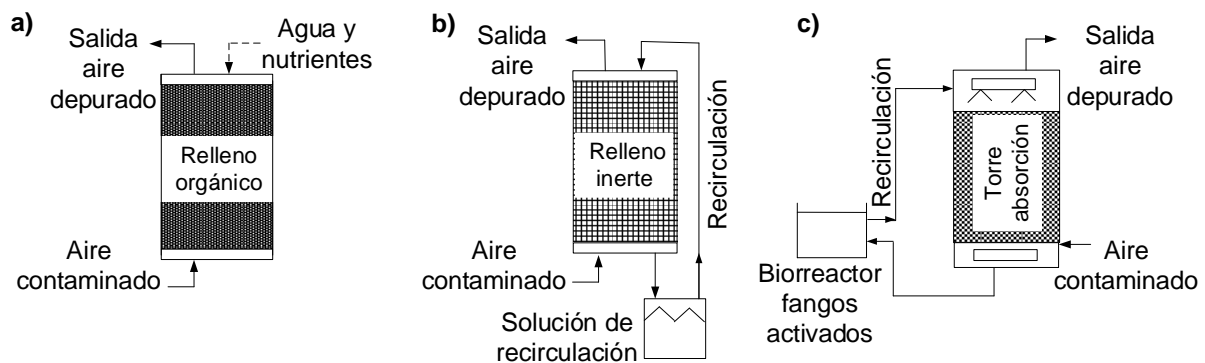


Figura 2.4. Representación esquemática de biorreactores: a) Biofiltro, b) Biofiltro percolador, c) Biolavador.

Los biorreactores de membrana consisten en el paso del aire contaminado a través de membranas hidrofóbicas transfiriéndose los contaminantes a la biopelícula. Las membranas sirven como soporte para la población microbiana y proporcionan elevada área superficial y transferencia de oxígeno (Parvatiyar y col., 1996). Existe una variedad de membranas fabricadas a partir de diferentes materiales como el teflón, el látex, el polipropileno o la poliacrilamida. Además, se pueden encontrar diferentes configuraciones como las membranas laminares, capilares, tubulares o en espiral (Kumar y col., 2008). Estos sistemas han sido probados con bajas concentraciones de contaminantes debido a que en el caso contrario se han observado problemas de obturación de los poros de la membrana por un excesivo crecimiento de la biomasa (Attaway y col., 2002).

Los sistemas multifásicos, también conocidos como biorreactores de partición de dos fases, son reactores empleados para la eliminación de COV hidrofóbicos. Estos biorreactores se basan en la adición de una fase no acuosa conocida como NAP (*non-aqueous phase*), ya sea un disolvente líquido o un polímero sólido (Daugulis, 1997). La adición de esta fase se lleva a cabo principalmente para favorecer la llegada de los contaminantes a la comunidad microbiana responsable de la degradación (Cesario, 1997). Algunos NAP que se han utilizado son: alcanos, perfluorocarbonos, aceites de silicona y polímeros sólidos. Esta biotecnología favorece la transferencia de contaminantes hacia la biopelícula, especialmente en el

caso de COV hidrofóbicos tales como tolueno, hexano o α -pineno (Arriaga y col., 2006; Muñoz y col., 2012).

Los reactores de tiro o corriente de aire (reactores *airlift*) se caracterizan por poseer la biomasa dispersa y adherida a un soporte que también se encuentra disperso en un medio líquido (Zuber y col., 1997). En la Figura 2.5 se establece una representación esquemática de este tipo de reactor. Estos biorreactores presentan dos zonas: una de aireación de flujo ascendente y una zona descendente o sin aireación. La inyección de aire contaminado en la zona de aireación mediante tubos de aspiración produce una diferencia de densidades que induce a la circulación del líquido a velocidades elevadas. Una tercera zona se encuentra en la parte superior del biorreactor cuyo objetivo es lograr la separación de las fases y la salida del efluente gaseoso. Este proceso de tratamiento requiere de un suministro constante de aire al sistema y puede presentar elevadas pérdidas de presión (Wen y col., 2005; Littlejohns y Daugulis, 2009).

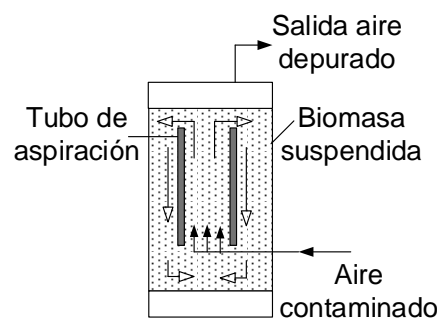


Figura 2.5. Representación esquemática de un reactor de tiro o corriente de aire (reactor *airlift*).

Las biotecnologías de biofiltro y de biofiltro percolador se describen con mayor detalle en los apartados siguientes al tratarse de los biorreactores estudiados a lo largo del desarrollo experimental de la presente tesis doctoral. Los principales parámetros que se utilizan para definir la eficacia del proceso de biofiltración son los siguientes:

Tiempo de residencia a volumen vacío (TRVV), *Empty bed residence time* (EBRT),

$$TRVV = \frac{V_R}{Q}$$

Carga másica volumétrica de contaminante (CV), *Inlet load* (IL),

$$CV = \frac{Q * C_e}{V_R}$$

Eficacia de eliminación (EE), *Removal efficiency* (RE),

$$EE = \frac{(C_e - C_s)}{C_e} \cdot 100$$

Capacidad de eliminación (CE), *Elimination capacity* (EC),

$$CE = \frac{Q * (C_e - C_s)}{V_R}$$

Donde, Q es el caudal de aire ($\text{m}^3 \text{h}^{-1}$), V_R es el volumen del material de relleno (m^3) y C_e and C_s son la concentración de contaminante en el gas de entrada y de salida respectivamente (g m^{-3}).

2.3. Biofiltros

Los biofiltros son biorreactores en los que una corriente de aire contaminado se hace pasar a través de un lecho de relleno orgánico poroso como puede ser el compost, la turba o el suelo. Sobre este relleno se desarrollan los microorganismos responsables de la degradación de los contaminantes de la fase gaseosa formando una biopelícula. Por tanto, el material de relleno ha de favorecer el contacto de los microorganismos con la fase gas para que exista una adecuada transferencia de los contaminantes y del oxígeno. Las características más importantes que deben poseer los materiales de relleno son (Shareefdeen y Singh, 2005):

- Elevada área superficial y porosidad para favorecer la absorción de contaminantes en la biopelícula, la distribución del gas y para evitar elevadas pérdidas de presión.
- Adecuada capacidad de retención de humedad.
- Capacidad de amortiguación del pH.
- Contenido elevado de nutrientes.
- Presencia de una abundante y diversa microflora.
- Estabilidad a largo plazo para evitar la degradación del material.
- Baja densidad para facilitar la construcción y reducir costes.

La utilización de un material de relleno orgánico en los biofiltros implica la existencia inherente de microorganismos de modo que no es necesaria una etapa de inoculación, aunque ésta suele llevarse a cabo para mejorar la puesta en marcha y el funcionamiento de los biorreactores (Leson y Winer, 1991). Previamente a la entrada del aire contaminado en el biorreactor la corriente gaseosa se debe humidificar para garantizar un contenido mínimo de humedad en el lecho entre el 30 y el 60% (Ottengraff, 1986). Puntualmente se realiza un riego del sistema en el que se aporta agua y nutrientes para favorecer la actividad microbológica, ya que junto con el carbono y el oxígeno presentes en la corriente gaseosa a depurar, los microorganismos necesitan otros nutrientes como el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, oligoelementos (Fe, Mg etc.) y vitaminas. Además, se suele utilizar una solución de riego tamponada para mantener el pH del proceso en un intervalo adecuado para el metabolismo microbiano (5 - 9). La optimización del riego en los biofiltros es uno de los factores más importantes en la operación de estos sistemas, debido a que un déficit de humedad puede provocar el secado del material de relleno afectando al metabolismo microbiano y reduciendo la eficacia de eliminación. Por el contrario, un aporte excesivo de agua al sistema puede conducir a la compactación del material de relleno conllevando la aparición de zonas anaerobias, altas pérdidas de presión y reducción de la eliminación del contaminante. Otros parámetros importantes a tener en cuenta en la biofiltración son la pérdida de presión del sistema, la temperatura y la concentración de oxígeno. La pérdida de presión del sistema está relacionada con el tipo de material de relleno, la velocidad del gas, la concentración de biomasa en el reactor y el contenido de humedad del lecho (Yang y

Allen, 1994; Morgan-Sagastume y col., 2001). Este parámetro está ligado a los costes de operación, de modo que a mayor pérdida de presión las necesidades energéticas se incrementan. Por otra parte, la actividad microbiana está relacionada directamente con la temperatura, por lo que un cambio en este parámetro afecta al funcionamiento del proceso. Las especies microbianas que predominan en los sistemas de biofiltración suelen ser mesófilas por lo que el rango de temperatura suele estar comprendido entre 15 y 40 °C (Bohn, 1992). Además los microorganismos involucrados en los procesos biológicos son principalmente aerobios, de modo que es necesaria una concentración de oxígeno suficiente para el correcto funcionamiento de estos procesos. El oxígeno se obtiene de la corriente de aire a depurar pero en ocasiones se detectan limitaciones de oxígeno atribuidas principalmente a elevadas cargas de contaminante, el elevado crecimiento de biomasa o la aparición de zonas anaerobias por un elevado contenido de humedad.

La utilización de biofiltros para la depuración de emisiones gaseosas de COV se ha descrito ampliamente en la bibliografía. Las primeras aplicaciones consistieron en biofiltros abiertos utilizando suelo como material de relleno y cuya función era la eliminación de olores de estaciones depuradoras de aguas residuales (Pomeroy, 1957; Carlson y col., 1966). En el periodo comprendido entre 1960 y 1990 el interés hacia estas técnicas aumentó y se establecieron las primeras aplicaciones industriales (Ottengraf, 1986). Además, surgieron biofiltros de diseño cerrado mejorando así la operación y la eficacia de estos sistemas que se aplicaron tanto para el control de olores como para el tratamiento de emisiones gaseosas de COV (Van Langenhove y col., 1986). Actualmente existen numerosos estudios de laboratorio sobre la aplicación de biofiltros para la eliminación de COV, analizando una amplia variedad de condiciones experimentales, materiales de relleno y utilizando contaminantes de muy diversa naturaleza. Se han alcanzado eficacias de eliminación elevadas demostrando la efectividad de esta biotecnología. La Tabla 2.1 presenta ejemplos de ello. Se han incluido estudios sobre eliminación de los compuestos en los que esta tesis doctoral se ha centrado o sobre compuestos de naturaleza química similar.

Tabla 2.1. Ejemplos de aplicación de biofiltros para la eliminación de COV de emisiones gaseosas.

COV	Material de relleno	Inóculo	CV, $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$	TRVV, s	EE, %	CE _{max} , $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$	Referencia
Estireno	Turba	Fango activado	2-50	81	70-98	30	Arnold y col., 1997
Estireno	Perlita	No inoculado	25-550	6.5-26	>90	140	Paca y col., 2001
Estireno	Cerámica	<i>Pseudomonas putida</i>	<120	17	75	90	Okamoto y col., 2003
Estireno	Turba, cerámica	<i>Pseudomonas sp.</i>	1-200	-	60-100	170	Jang y col., 2004
Estireno	Perlita	<i>Rhodococcus sp.</i>	0-400	120	74-94	279	Jung y col., 2005
Estireno	Compost	Fango activado	<12-60	30-120	43-99	45	Dehghanzadeh y col., 2005
Tolueno	Compost	Fango activado	3-278	25-147	40-95	128	Rene y col., 2005
Tolueno	Turba	Fango activado	65-195	30-90	30-80	360	Álvarez-Hornos y col., 2008
Tolueno, xileno	Turba	Cultivo mixto	25-300	78-102	20-90	115	Jorio y col., 1998
Clorobenceno	Compost	No inoculado	20-210	20-120	20-100	70	Delhmonéie y Heitz, 2003
TEX	Turba	Fango activado	0-120*	82-330	60-100	118*	Gabaldón y col., 2006
BTEX	Maíz	<i>Bacillus sphaericus</i>	23-63	69-184	60-96	61	Rahul y col., 2013
Isopropanol	Compost, carbón	Fango activado	342	94	40-100	276	Krailas y col., 2004
MTBE	Compost	No inoculado	20-650	15-60	90-100	-	Moussavi y col., 2009
Acetato de etilo	Turba	Fango activado	65-190	22-90	30-100	400	Álvarez-Hornos y col., 2007
Acetato de etilo	Cáscaras nuez	<i>Pseudomonas putida</i>	0-700	60-75	80-100	421	Zare y col., 2012
Mezcla COV	Turba y carbón	Fango activado	110	36	50-100	110	Aizpuru y col., 2003
Mezcla COV	Poliuretano	<i>Cladosporium sp.</i>	7-60	15-120	-	92	Qi y col., 2005
Mezcla COV	Poliuretano	Cultivo enriquecido	80	59	20-100	80	Moe y col., 2005

CV: carga másica volumétrica de contaminante; TRVV: tiempo de residencia a volumen vacío; EE: eficacia de eliminación; CE_{max}: Capacidad de eliminación máxima; BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno; TEX: tolueno, etilbenceno y xileno; MTBE: metil ter-butyl éter; * $\text{g Cm}^{-3}\text{h}^{-1}$.

Se han realizado estudios sobre la biofiltración de emisiones gaseosas con compuestos aromáticos como el estireno, contaminante mayoritario de las emisiones de la industria del procesamiento y de la síntesis de polímeros. La biofiltración de este contaminante ha sido objeto de estudio de la presente tesis doctoral (capítulo 6). En la Tabla 2.1 se resumen varios trabajos sobre la biofiltración de estireno bajo un amplio intervalo de condiciones, con CV comprendidas entre 0 y 550 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 6 y 120 s. A modo de ejemplo, Arnold y col. (1997) operaron un biofiltro de turba evaluando la influencia de la temperatura (12-34 °C) sobre la eliminación de estireno. La mayor CE de 30 g m⁻³ h⁻¹ se alcanzó a una temperatura de 23 °C con una concentración de entrada de contaminante de 0.45 g m⁻³ y una EE del 92%. Paca y col. (2001) estudiaron la eliminación de estireno en un biofiltro de perlita para CV comprendidas entre 25 y 550 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 6 y 26 s obteniendo una CE máxima de 140 g m⁻³ h⁻¹ con una EE del 90%. Jung y col. (2005) determinaron una CE de estireno de 279 g m⁻³ h⁻¹ para una CV de 345 g m⁻³ h⁻¹ y un TRVV de 120 segundos mediante un biofiltro de perlita.

También se han estudiado otros compuestos aromáticos, tales como tolueno o xileno, que son sustancias utilizadas como disolventes en numerosas aplicaciones industriales y además son constituyentes de combustibles. Rene y col. (2005) analizaron el tratamiento de tolueno mediante un biofiltro de turba en el que se alcanzaron EE superiores al 90% para un TRVV de 147 s y concentraciones de entrada de contaminante inferiores a 0.5 g m⁻³. La CE máxima fue de 128 g m⁻³ h⁻¹ para una CV de 263 g m⁻³ h⁻¹. Álvarez-Hornos y col. (2008) estudiaron la biofiltración de tolueno en dos biofiltros de turba rubia alcanzando EE del 80% para un TRVV de 57 s y una CV de 116 g m⁻³ h⁻¹. La CE máxima fue de 360 g m⁻³ h⁻¹ para una CV de 745 g m⁻³ h⁻¹. Este material orgánico ha sido uno de los seleccionados durante la experimentación que se presenta en este trabajo de tesis doctoral. Jorio y col. (1998) operaron un biofiltro de turba a escala de planta piloto durante 8 meses para estudiar la eliminación de una mezcla de tolueno y xileno. La CE máxima para el tolueno fue de 165 g m⁻³ h⁻¹ (CV: 230 g m⁻³ h⁻¹; TRVV: 75 s), mientras que para el xileno se alcanzó una CE máxima de 66 g m⁻³ h⁻¹ (CV: 200 g m⁻³ h⁻¹; TRVV: 102 s). También se ha evaluado la eliminación de compuestos que presentan una elevada dificultad de biodegradación. Así, por ejemplo, Delhoménie y Heitz (2003) analizaron el

tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con clorobenceno mediante un biofiltro de compost, evaluando la influencia de tres parámetros: TRVV (20-120 s), CV (20-210 g m⁻³ h⁻¹) y adición de nutrientes (0 - 0.7 g N h⁻¹). En este estudio se obtuvo una CE máxima de 70 g m⁻³ h⁻¹ trabajando a CV de 80 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV de 60 s. La dosis de nitrógeno más adecuada se estableció en valores comprendidos entre 0.3 y 0.4 g N h⁻¹.

Por otra parte, se ha evaluado el tratamiento de emisiones contaminadas con compuestos oxigenados, que suelen presentar mayor facilidad de degradación y en general son más solubles en agua que los compuestos aromáticos. Estas sustancias son ampliamente utilizadas en la industria como es el caso del isopropanol, contaminante habitual en las emisiones procedentes del sector flexográfico, o el acetato de etilo, compuesto habitual de las emisiones de las industrias de fabricación de pinturas y de tratamiento, limpieza y recubrimientos de superficies. Krailas y col. (2004) analizaron la depuración de emisiones contaminadas con isopropanol en un biofiltro donde se utilizó una mezcla de compost y carbón activado como material de relleno. En este trabajo se evaluó el incremento de la concentración de entrada del contaminante desde 1 a 8 g m⁻³ utilizando un caudal de aire constante de 3 L min⁻¹ (TRVV: 94 s). La CE máxima fue de 276 g m⁻³ h⁻¹ para una CV de 342 g m⁻³ h⁻¹. Álvarez-Hornos y col. (2007) analizaron la eliminación de acetato de etilo para CV entre 65 y 190 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV entre 22 y 90 s mediante un biofiltro de turba rubia. Se alcanzaron EE próximas al 100% para CV de 300 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV de 15 s. Zare y col. (2012) analizaron la eliminación de acetato de etilo variando la CV en valores comprendidos entre 0 y 700 g m⁻³ h⁻¹ y el TRVV en valores comprendidos entre 60 y 75 s mediante un biofiltro con cáscaras de nuez como material de relleno. La CE máxima fue de 421 g m⁻³ h⁻¹ para CV comprendidas entre 500 y 700 g m⁻³ h⁻¹. En el caso de otros disolventes, como el 2-butoxietanol, compuesto objeto de estudio en esta tesis doctoral, no se han encontrado estudios previos en la bibliografía.

Asimismo, se ha analizado la biofiltración de emisiones gaseosas contaminadas con mezclas de COV. Gabaldón y col. (2006) estudiaron el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con tolueno, etilbenceno y xileno (TEX) utilizando dos biofiltros de turba rubia. La CE máxima fue de 85 g C m⁻³ h⁻¹ para una

CV de $118 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Rahul y col. (2013) analizaron la eliminación de una mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) mediante un biofiltro con maíz como material de relleno. Se determinó una CE máxima de $60.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y una EE elevada del 96%. Aizpuru y col. (2003) investigaron el tratamiento de una mezcla con 11 COV, incluyendo compuestos aromáticos, oxigenados y clorados mediante dos biofiltros, utilizando en cada uno de ellos un material de relleno diferente: turba y carbón activado. La CV de operación se fijó en un valor de $110 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y se obtuvieron EE globales del 90% y del 80% para el biofiltro de turba y el biofiltro de carbón activado, respectivamente. Moe y col. (2005) operaron dos biofiltros con poliuretano como material de relleno para el tratamiento de emisiones contaminadas con acetona, metil etil cetona, tolueno, etilbenceno y p-xileno. Las eficacias de eliminación fueron mayores al 99% para una CV de $80 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

En el proceso de inoculación de los biofiltros se han empleado diversos tipos de cultivos microbianos. En la Tabla 2.1 a modo de ejemplo se presentan algunos trabajos en los que se estudia la eliminación de estireno utilizando diferentes tipos de inóculos tales como fango activado (Arnold y col., 1997; Dehganzadeh y col., 2005) o cultivos puros de especies como *Pseudomonas sp.* o *Rhodococcus sp.* (Okamoto, 2003; Jang y col., 2004; Jung y col., 2005). En todos los estudios se alcanzaron EE elevadas. Se ha demostrado la capacidad de algunas especies bacterianas para eliminar ciertos contaminantes como es el caso de la especie *Pseudomonas* para degradar estireno, lo que ha conducido a los investigadores a utilizar esta especie en la inoculación de los biofiltros con el fin de obtener un mejor funcionamiento del proceso. Jang y col. (2004) reportaron EE de estireno elevadas con valores comprendidos entre 74 y 94% y una CE máxima de $170 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en un biofiltro inoculado con *Pseudomonas sp.* SR-5; de igual modo, Okamoto y col. (2003) determinaron una CE máxima de $90 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (CV: $120 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) trabajando a un TRVV inferior a 17 segundos en un biofiltro inoculado con la especie *Pseudomonas putida*. Además, se han desarrollado estudios en los que se ha aprovechado los microorganismos existentes en el propio material de relleno y, por lo tanto, no se ha realizado una inoculación previa para la puesta en marcha de los biofiltros. Así, Paca y col. (2001) estudiaron el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con estireno en un biofiltro de perlita y obtuvieron una CE de $140 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (CV: 155 g m^{-3}

h^{-1}) o Moussavi y col. (2009) analizaron la biofiltración de metil ter-butil éter (MTBE) en condiciones termofílicas a $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un biofiltro de compost obteniendo EE superiores al 90% incluso con una CV de $650\text{ g m}^{-3}\text{ h}^{-1}$. También se pueden encontrar en la bibliografía estudios utilizando cultivos de hongos para la inoculación de biofiltros ya que son organismos con capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, presentan un intervalo amplio de tolerancia al pH y pueden desarrollarse en ambientes con baja humedad. Por ejemplo Qi y col. (2005) estudiaron la eliminación de una mezcla de COV en un biofiltro relleno de poliuretano e inoculado con el hongo *Cladosporium sphaerospermum*, alcanzando una CE de $92\text{ g m}^{-3}\text{ h}^{-1}$ para una CV de $94\text{ g m}^{-3}\text{ h}^{-1}$ y un TRVV de 15 s.

2.4. Biofiltros percoladores

Los biofiltros percoladores son biorreactores en los que se utiliza un material de relleno inerte y una fase líquida (solución de recirculación) que se recircula continuamente a través del material de relleno. El aire contaminado puede ser introducido en contracorriente o en el mismo sentido de recirculación de la fase líquida (Diks y Ottengraf, 1991a y 1991b). La solución de recirculación permite un mejor control de los parámetros de operación tales como el pH y la adición de nutrientes. Los biofiltros percoladores pueden diseñarse con mayores alturas que los biofiltros, por tanto requieren menor superficie para su construcción. Estos sistemas se recomiendan para el tratamiento de emisiones contaminadas con compuestos solubles en agua que presenten constantes de Henry inferiores a 0.1 (Kennes y Veiga, 2013). Algunos de los materiales de relleno empleados en los biofiltros percoladores son espuma de poliuretano, material plástico estructurado y anillos de polipropileno (Devinny y col., 1999). Las propiedades más importantes para la selección del material de relleno son las siguientes: bajo coste económico, elevada porosidad, elevada estabilidad química y estructural, bajo peso y elevada área específica para favorecer el desarrollo de la biopelícula (Shareefdeen y Singh, 2005). La utilización de un material de relleno inerte implica la necesidad de llevar a cabo una etapa previa de inoculación para la puesta en marcha de los biofiltros percoladores ya que no existen poblaciones microbianas inherentes.

De igual modo que en los biofiltros, los parámetros que afectan al funcionamiento del proceso son los siguientes: nutrientes, pH, temperatura, pérdida de carga, humedad y concentración de oxígeno. Los microorganismos necesitan nutrientes para su desarrollo, éstos se suministran en la solución de recirculación mediante un sistema de dosificación. El coeficiente másico carbono y nitrógeno (C:N) utilizado varía entre 13 y 70 (Kennes y Veiga, 2002). El intervalo óptimo de pH para el crecimiento microbiano suele estar comprendido entre 5 y 9. El pH puede controlarse durante la operación del biofiltro percolador utilizando una solución de nutrientes amortiguadora o adicionando una base o un ácido a la solución de recirculación. La temperatura recomendada en los sistemas de biofiltración suele estar comprendida entre 15 y 40 °C. El crecimiento de la biomasa en el material de relleno disminuye la sección de paso de los fluidos y, por tanto, ocasiona resistencia a la circulación del agua y del gas. Tras largos periodos de operación de un biofiltro percolador puede aparecer acumulación de biomasa a causa de elevadas cargas de alimentación de contaminantes y elevadas concentraciones de nutrientes. Este fenómeno se conoce como *clogging* e implica un aumento de la pérdida de presión y de la aparición de zonas anaerobias, así como la formación de caminos preferenciales, traduciéndose todo ello en un mayor coste operacional y una pérdida de eficacia del proceso (Cox y Deshusses, 1999; Okkerse y col., 1999). El suministro de la solución de recirculación puede ser continuo o discontinuo. Se ha visto que la frecuencia en el suministro de la solución de recirculación afecta al funcionamiento del proceso en el caso de compuestos hidrofílicos (Sempere y col., 2008), ya que éstos se acumulan en la solución de recirculación y durante el riego se desorben produciendo picos de elevada concentración. Por ello, si se disminuye la frecuencia entre riegos se reduce la concentración media de contaminante en las emisiones de salida. Por otra parte, la velocidad superficial de la solución de recirculación puede afectar a la eliminación de contaminantes hidrofóbicos, ya que si la capa de líquido que atraviesa el reactor es demasiado grande se dificulta la transferencia de los contaminantes desde la fase gas (Cox y Deshusses, 2001). Por último, la concentración de oxígeno en las emisiones gaseosas, en general, es superior a la concentración de contaminante. No obstante, a causa de la baja solubilidad del oxígeno en el agua, el funcionamiento del biofiltro percolador puede verse afectado

por la limitación de la transferencia del oxígeno en la biopelícula (Kircher y col., 1992; Kim y Deshusses, 2008a y 2008b). La limitación de oxígeno ocurre cuando el contaminante se difunde en mayor medida que el oxígeno en la biopelícula, lo que normalmente se acentúa a mayor espesor del biofilm y con elevadas concentraciones de contaminantes hidrofílicos.

El proceso de biofiltro percolador para la eliminación de COV de efluentes gaseosos ha sido descrito en la bibliografía desde la década de los 90 cuando se publicaron los primeros trabajos (Togna y Singh, 1994; Cox y Deshusses, 1998). Tal y como se observa en la Tabla 2.2, existen aplicaciones satisfactorias para la eliminación de COV de diferente naturaleza, utilizando diferentes materiales de relleno, inóculos y condiciones de operación.

En el primer trabajo que se presenta en esta tesis doctoral (capítulo 5) se ha utilizado el proceso de biofiltro percolador para el tratamiento de isopropanol, compuesto oxigenado típico de las emisiones gaseosas del sector flexográfico. En este sentido, el grupo de investigación GI²AM en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral cuenta con diversos trabajos previos sobre la depuración de emisiones contaminadas con compuestos oxigenados. Sempere y col. (2008) analizaron la eliminación de etanol, acetato de etilo y metil etil cetona mediante el proceso de biofiltro percolador. En este estudio se seleccionaron condiciones de operación típicas del sector flexográfico donde habitualmente se emiten dichos compuestos. Para ello, estudiaron patrones de alimentación de contaminante discontinuo con concentraciones variables de COV, así como, diferentes patrones de riego. Las concentraciones de contaminante en las emisiones de salida fueron inferiores a 100 mg C m⁻³ para CV superiores a 100 g C m⁻³ h⁻¹ y TRVV de 15 s. En otro de los trabajos se estudió el tratamiento de emisiones gaseosas con etanol y acetato de etilo en un biofiltro percolador (Sempere y col., 2009). La CE máxima fue de 48.5 g C m⁻³ h⁻¹ (EE: 69%) para un TRVV de 40 s. En este experimento la instalación de un prefiltro de carbón activado supuso una mejora del funcionamiento del sistema ya que la CE máxima se incrementó hasta 60 g C m⁻³ h⁻¹ (EE: 92%) para un TRVV de 40 s. Los protocolos de operación desarrollados en laboratorio junto con el estudio del proceso a nivel de planta piloto (Martínez-Soria y col., 2009) se

utilizaron para la aplicación de esta tecnología a escala industrial. Sempere y col. (2012) evaluaron el funcionamiento de un biofiltro percolador instalado como la solución final de depuración de las emisiones gaseosas de una industria del sector flexográfico donde los contaminantes principales fueron compuestos oxigenados (etanol, acetato de etilo, n-propanol, metoxipropanol y acetato de n-propilo). La CE máxima fue de $122 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (EE: 89%) para una CV de $138 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Esta aplicación representa uno de los pocos ejemplos en Europa en los que se utiliza el biofiltro percolador como tratamiento de depuración de emisiones gaseosas de compuestos orgánicos volátiles.

Tabla 2.2. Ejemplos de aplicación de biofiltros percoladores para la eliminación de COV de emisiones gaseosas

COV	Material de relleno	Inóculo	CV, $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$	TRVV, s	EE, %	CE _{max} , $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$	Referencia
Isopropanol y acetona	Carbón	Fango activado	12-159	20-90	82-100	130	Chang y Lu, 2003
Acetona	Plexiglas/fibra coco	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.	33-120	75-114	20-100	96	Pielech-Przybylska y col., 2006
Etanol	Cilindros plexiglas	Lixiviado de compost	25-130	66	10-90	46	Morotti y col., 2011
Etanol, acetato de etilo y MEK	Anillos PP	Fango activado	25-140*	15-60	58-95	96*	Sempere y col., 2008
Etanol, acetato de etilo	Anillos PP	Cultivo mixto	50-90*	25-60	40-100	60*	Sempere y col., 2009
Estireno	Espuma PU	<i>Brevibacillus</i> sp.	7-312	20-120	29-100	125	Hwang y col., 2008
Estireno	Anillos PP	Cultivo mixto	5-33	13-53	20-100	12	Novak y col., 2008
Estireno	Espuma PU	<i>Pseudomonas putida</i>	0-420	10-70	90	220	Moon y col., 2010
Estireno	Anillos PP	Fango activado	10-130	15-60	30-96	63	Sempere y col., 2011
Tolueno	Anillos PP	Cultivo mixto	160	45	40-80	128	Cox y Deshusses, 2002
Tolueno	Cerámica	<i>Bacillus cereus</i>	26-541	33-200	46-100	300	Li y col., 2008
Xileno	Anillos PP	Cultivo mixto	20-116	35	20-78	30	Trejo-Aguilar y col., 2005
Mezcla COV	Esferas PP	<i>P. oleovorans</i>	280	14	89	250	Popov y col., 2004
Mezcla COV	Anillos PP	Fango activado	-	10-40	40-100	-	Martínez-Soria y col., 2009
Mezcla COV	Anillos PP	Fango activado	0-160*	26-36	50-100	122*	Sempere y col., 2012
Mezcla COV	Anillos PP	Fango activado	0-110*	20-100	35-95	-	Lafita y col., 2012

CV: carga másica volumétrica de contaminante; TRVV: tiempo de residencia a volumen vacío; EE: eficacia de eliminación; BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno; MEK: metil etil cetona; PP: polipropileno; PU: poliuretano. * $\text{g C m}^{-3} \text{h}^{-1}$

En la Tabla 2.2 se muestran otros trabajos sobre el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con compuestos oxigenados. Chang y Lu (2003) emplearon un biofiltro percolador para el tratamiento de diferentes mezclas de isopropanol y acetona, alcanzando CE comprendidas entre 90 y 128 g m⁻³ h⁻¹ para TRVV entre 20 y 30 s y CV entre 106 y 160 g m⁻³ h⁻¹. Pielech-Przybylska y col. (2006) investigaron la biodegradación de acetona determinando una CE máxima de 95.8 g m⁻³ h⁻¹ para una CV de 97.1 g m⁻³ h⁻¹ y un TRVV de 75 s. Morotti y col. (2011) operaron un biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones de etanol alcanzando una CE de 46 g m⁻³ h⁻¹ para una concentración de entrada del contaminante de 1.1 g m⁻³ y un TRVV de 66 s. Popov y col. (2004) operaron un biofiltro percolador en una industria del sector flexográfico donde las emisiones contenían la siguiente mezcla de compuestos oxigenados: etanol, metanol, n-propanol, isopropanol y acetato de etilo. En esta instalación se alcanzó una eficacia de eliminación media del 89% con una concentración media de carbono a la salida de 71 mg m⁻³.

A pesar de que el estireno es un contaminante que presenta baja solubilidad en agua, se ha demostrado la efectividad del proceso de biofiltro percolador para la eliminación de este compuesto. El capítulo 6 de esta tesis doctoral incluye un trabajo sobre la biofiltración de emisiones gaseosas contaminadas con estireno. Además, la eliminación de este compuesto ha sido previamente analizada en el grupo de investigación donde esta tesis doctoral se ha desarrollado. En este sentido, Sempere y col. (2011) utilizaron dos biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones de estireno. A cada reactor se le suministró una solución de nutrientes con una fuente de nitrógeno diferente, en un caso basada en urea y en el otro en nitrato. Los resultados mostraron el mejor funcionamiento para el biorreactor al que se le adicionó la solución de nutrientes compuesta por urea obteniéndose la máxima CE de 57.6 g C m⁻³ h⁻¹ (CV: 65 g C m⁻³ h⁻¹; TRVV: 60 s), que fue un 54% superior a la CE máxima que se obtuvo utilizando el nitrato como fuente de nitrógeno. Además, en la Tabla 2.2 se pueden observar otros trabajos sobre la biofiltración de estireno bajo un amplio rango de condiciones con CV comprendidas entre 0 y 420 g m⁻³ h⁻¹ y TRVV comprendidos entre 10 y 120 s. A modo de ejemplo, Novak y col. (2008) analizaron el efecto del TRVV sobre el funcionamiento de un biofiltro percolador para la eliminación de estireno. Para ello se disminuyó el TRVV desde 53 a 13 s

manteniendo la concentración de entrada de estireno en un valor constante de 100 mg m⁻³. La CE máxima fue 11.3 g C m⁻³ h⁻¹ para una CV de 18.6 g C m⁻³ h⁻¹ y un TRVV alrededor de 19 s. También se han estudiado otros compuestos aromáticos como por ejemplo Cox y Deshusses (2002) que emplearon un biofiltro percolador con anillos de polipropileno como material de relleno para el estudio de la eliminación de tolueno llevando a cabo periodos de interrupción en la entrada de contaminante al sistema. La CE máxima que se obtuvo fue de 128 g m⁻³ h⁻¹ trabajando a una CV de 160 g m⁻³ h⁻¹. Trejo-Aguilar (2005) emplearon un biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones de xileno. En este trabajo se analizó el efecto que tienen las condiciones hidrodinámicas sobre el funcionamiento del biorreactor, evaluando la densidad de flujo (6 - 14 Kg m⁻² s⁻¹) y la porosidad del lecho (41 - 95%). La mayor CE de 30 g m⁻³ h⁻¹ se alcanzó para una densidad de flujo de 14.1 Kg m⁻² s⁻¹ y una porosidad del lecho de 80%.

Se han registrado casos satisfactorios de aplicaciones del proceso de biofiltro percolador para la eliminación de mezclas de COV de diversa naturaleza química. En este contexto, el grupo de investigación GI²AM tras la experiencia previa con emisiones contaminadas con compuestos oxigenados amplió el campo de aplicación industrial de la biotecnología de biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones gaseosas industriales de menor biodegradabilidad. En primer lugar, se probaron a escala de planta piloto los protocolos operacionales desarrollados en laboratorio. Martínez-Soria y col. (2009) estudiaron un biofiltro percolador a escala piloto para la depuración de las emisiones gaseosas de una industria de fabricación de muebles. Las emisiones contenían compuestos de diversa naturaleza química según el foco de emisión. Algunos de estos contaminantes fueron: tolueno, etilbenceno, xileno, estireno, metoxipropanol, acetona, acetato de i-butilo y acetato de n-butilo. Se alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 95% y las concentraciones de carbono en las emisiones de salida cumplieron los límites legales (< 110 mg C m⁻³). Finalmente, se implementó un biofiltro percolador como solución final de depuración en dicha empresa (Lafita y col., 2012). En el capítulo 9 de la presente tesis doctoral se han analizado muestras de biomasa procedentes de este biorreactor industrial a lo largo de un año de experimentación con la finalidad de dar respuesta a uno de los

objetivos de esta tesis doctoral: la caracterización y el seguimiento de las poblaciones bacterianas en reactores de varias escalas.

Para finalizar la revisión bibliográfica efectuada en este apartado, se puede destacar el uso de diferentes tipos de inóculos para la puesta en marcha de los biorreactores tal y como se puede observar en la Tabla 2.2. Por ejemplo, Hwang y col. (2008) operaron un biofiltro percolador para el tratamiento de estireno utilizando como inóculo un cultivo puro de la cepa *Brevibacillus* sp. obteniendo una CE máxima de $125 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una CV alrededor de $200 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Moon y col. (2010) analizaron la eliminación de este mismo contaminante empleando como inóculo un cultivo de la especie *Pseudomonas putida*. La CE máxima fue de $220 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una CV de $288 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. El estudio comparativo de la influencia que presentan diferentes tipos de inóculos sobre la eliminación de un compuesto se ha analizado en menor medida. Li y col. (2008) investigaron la eliminación de tolueno comparando el funcionamiento de dos biofiltros percoladores, cada uno de ellos inoculado con diferente cepa, *Bacillus cereus* S1 y *Bacillus cereus* S2. Los valores máximos de CE fueron 300.5 y $228.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para el biorreactor inoculado con la cepa S1 y S2, respectivamente, trabajando a un TRVV de 66.5 s.

2.5. Bibliografía

- Álvarez-Hornos, F.J., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Peña-roja, J.M., Sempere, F. (2007). *Biofiltration of ethyl acetate under continuous and intermittent loading*. Environmental Progress, 26: 327-337.
- Álvarez-Hornos, F.J., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Peña-roja, J.M. (2008). *Biofiltration of toluene in the absence and the presence of ethyl acetate under continuous and intermittent loading*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83: 643-653.
- Aizpuru, A., Khammar, N., Malhautier, L., Fanlo, J.L. (2003). *Biofiltration for the treatment of a complex mixtures of VOC. Influence of the packing material*. Acta Biotechnologica, 23: 211-226.
- Arnold, M., Reittu, A., Von Wright, A., Martikainen, P.J., Suihko, M.L. (1997). *Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter*. Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 738-744.

-
- Arriaga, S., Muñoz, R., Hernandez, S., Guieysse, B., Revah, S. (2006). *Gaseous hexane biodegradation by Fusarium solani in two liquid phase packed-bed and stirred-tank bioreactors*. Environmental Sciences and Technology, 40: 2390-2395.
- Attaway, H., Gooding, C.H., Schmidt, M.G. (2002). *Comparison of microporous and nonporous membrane bioreactor systems for the treatment of BTEX in vapour streams*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28: 245-251.
- Bohn, H. (1992). *Considering biofiltration for descontaminating gases*. Chemical Engineering Progress, 88: 34-40.
- Carlson, A.N., Leiser, C.P. (1966). *Soil beds for the control of sewage odors*. Water Pollution Control Federation, 38(5): 829-840.
- Cesario, M.T., Beverloo, W.A., Tramper, J., Beeftink, H.H. (1997). *Enhancement of gas-liquid mass transfer rate of apolar pollutants in the biological waste gas treatment by a dispersed organic solvent*. Enzyme Microbiology and Technology, 21: 578-588.
- Chang, K., Lu, C. (2003). *Biofiltration of isopropyl alcohol and acetone mixtures by trickle-bed air biofilter*. Process Biochemistry, 39: 415-423.
- Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990). *Constitutive properties of biofilm systems*. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C. (eds), Biofilms. Wiley, New York, pp: 91-131.
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A. (1998). *Biological waste air treatment in biotrickling filter*. Current Opinion in Biotechnology, 9: 256-262.
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A. (1999). *Chemical removal of biomass from waste air biotrickling filters: screening of chemicals of potential interest*. Water Research, 33: 2383-2391.
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A. (2001). *Biotrickling filters*. In: Kennes, C. and Veiga, M.C. (eds) Bioreactors for waste gas treatment. Kluwer academic publisher, pp: 99-131.
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A. (2002). *Effect of starvation on the performance and reacclimation of biotrickling filters for air pollution control*. Environmental Science and Technology, 36: 3069-3073.
- Das, D., Vivekanand, G., Verma, N. (2004). *Removal of volatile organic compound by activated carbon fiber*. Carbon, 42: 2949-2962.
- Daugulis, A.J. (1997). *Partitioning bioreactors*. Current Opinion in Biotechnology, 8: 169-174.
- Dehghanzadeh, R., Torkian, A., Bina, B., Poormoghaddas, H., Kalantary, A. (2005). *Biodegradation of styrene laden waste gas stream using a compost-based biofilter*. Chemosphere, 60: 434-439.
- Delhoménie, M.C., Heitz, M. (2003). *Elimination of chlorobenzene vapors from air in a compost-based biofilter*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78: 588-595.
- Delhoménie, M.C., Heitz, M. (2005). *Biofiltration of air: a review*. Critical Reviews in Biotechnology, 25: 53-72.
-

- Deshusses, M.A., Hamer, B., Deunn, I.J. (1995). *Behavior of biofilters for waste air biotreatment.1. Dynamic model development*. Environmental Sciences and Technology, 29: 1048-1058.
- Devinny, J.S., Deshusses, M.A., Webster, T.S. (1999). *Biofiltration for air pollution control*. Lewis Publishers. Boca Raton, EEUU.
- Diks, R.M.M., Ottengraf, S.P.P. (1991a). *Verification studies of a simplified model for the removal of dichloromethane from waste gases using a biological trickling filter (part I)*. Bioprocesses Engineering, 6: 93-99.
- Diks, R.M.M., Ottengraf, S.P.P. (1991b). *Verification studies of a simplified model for the removal of dichloromethane from waste gases using a biological trickling filter (part II)*. Bioprocesses Engineering, 6: 131-140.
- Directiva 1999/13/CE, de 11 de marzo de 1999, *relativa a la limitación de las emisiones de COV debidas al uso de disolventes*. DO L85, 29 de marzo de 1999.
- Directiva 2004/42/CE, de 21 de abril de 2004, *relativa al uso de COV en determinadas pinturas y barnices*. DO L143, 30 de abril de 2004.
- Directiva 2010/75/UE, de 24 de noviembre de 2010, *sobre las emisiones industriales (Prevención y Control integrados de la contaminación)*. DO L334, 17 de diciembre de 2010.
- Dunn, R.F., El-Halwagi, M.M. (1994a). *Selection of optimal VOC-condensation systems*. Waste Management, 14: 103-113.
- Dunn, R.F., El-Halwagi, M.M. (1994b). *Optimal design of multicomponent VOC condensation systems*. Journal of Hazardous Material, 38: 197-206.
- Edwards, F.G., Nirmalakhandan, N. (1996). *Biological treatment of airstreams contaminated with VOCs: An overview*. Water Science and Technology, 34(3-4): 565-571.
- European Environment Agency. (2014). *Air quality in Europe*. EEA Report No 5/2014, ISSN: 1725-9177. Disponible en línea: <http://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2014>.
- European Environment Agency. (2014). *Costs of air pollution from European industrial facilities 2008-2012: an updated assessment*. EEA Technical report No 20/2014, ISSN: 1725-2237. Disponible en línea: <http://www.eea.europa.eu/publications/costs-of-air-pollution-2008-2012>.
- Environmental Protection Agency. (2002). *Controles de COV (EPA): Incineradores*. Technical report No 452/B-02-002. Disponible en línea: <http://www.epa.gov/ttn/catc1/dir2/cs3-2ch2-s.pdf>.
- Everaert, K., Degreve, J., Baeyens, J. (2003). *VOC-air separations using gas membranes*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78: 294-297.
- Everaert, K., Baeyens, J. (2004). *Catalytic combustion of volatile organic compounds*. Journal of Hazardous Materials, 109: 113-139.

- Foster, K.L., Fuerman, R.G., Economy, J., Larson, M., Rood, M.J. (1992). *Adsorption characteristics of trace volatile organic compounds in gas streams onto activated carbon fibers*. Chemistry of Materials, 4: 1068-1073.
- Friedrich, U., Van Langenhove, H., Altendorf, K., Lipski, A. (2003). *Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16 RNAr-targeting oligonucleotide probes*. Environmental Microbiology, 5(3): 183-201.
- Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Martín, M., Marzal, P., Peña-roja, J.M., Álvarez-Hornos, F.J. (2006). *Removal of TEX vapors from air in a peat biofilter. Influence of inlet concentration and inlet load*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81: 322-328.
- García-Peña, E.I., Hernández, S., Favela-Torres, E., Auria, R., Revah, S. (2001). *Toluene biofiltration by the fungus Scedosporium apiospermum TB1*. Biotechnology and Bioengineering, 76: 61-69.
- Granström, T., Lindberg, P., Nummela, J., Leisola, M. (2002). *Biodegradation of VOCs from printing press air by an on-site pilot plant bioscrubber and laboratory scale continuous yeast cultures*. Biodegradation, 13(2): 155-162.
- Geisthardt, K., Holtze, J., Ludwing, R., Pilhofer, T. (1989). Absorption process for the removal of organic solvents from exhaust air. Chemical Engineering and Technology, 12: 63-70.
- Hwang, J.W., Choi, C.Y., Park, S., Lee, E.Y. (2008). *Biodegradation of gaseous styrene by Brevibacillus sp. using a novel agitating biotrickling filter*. Biotechnology Letters, 30: 1207-1212.
- Jang, J.H., Mirai, M., Shoda, M. (2004). *Styrene degradation by Pseudomonas sp. SR-5 in biofilters with organic and inorganic packing materials*. Environmental Biotechnology, 65: 349-355.
- Jorio, H., Kiared, K., Brzezinski, R., Leroux, A., Viel, G., Heitz, M. (1998). *Treatment of air polluted with high concentration of toluene and xylene in a pilot-scale biofilter*. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 73: 183-196.
- Jung, I.G., Park, C-H. (2005). *Characteristics of styrene degradation by Rhodococcus pyridinovorans isolated from a biofilter*. Chemosphere, 61: 451-456.
- Khan, F.J., Ghoshal, A. Kr. (2000). *Removal of volatile organic compounds from polluted air*. Journal of Loss Prevention in the Process Industries, 13: 527-545.
- Kennes, C., Veiga, M.C. (2002). *Inert filter media for the biofiltration of waste gases: characteristics and biomass control*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 1: 201-214.
- Kennes, C., Veiga, M.C. (2013). *Biotrickling filters*. In: Kennes, C. and Veiga, M.C. (eds) Air pollution prevention and control, 1st edn. Wiley, United Kingdom, pp: 121-138.

- Kim, S., Deshusses, M.A. (2008a). *Determination of mass transfer coefficients for packing materials used in biofilters and biotrickling filters for air pollution control. 1. Experimental results*. Chemical Engineering Science, 63: 841-855.
- Kim, S., Deshusses, M.A. (2008b). *Determination of mass transfer coefficients for packing materials used in biofilters and biotrickling filters for air pollution control-2: Development of mass transfer coefficients correlations*. Chemical Engineering Science, 63: 856-861.
- Kircher, K., Wagner, S., Rehm, H.-J. (1992). *Exhaust gas purification using biocatalyst (fixed bacteria monocultures) - the influence of biofilm diffusion rate (O_2) on the overall reaction rate*. Applied Microbiology and Biotechnology, 37: 277-279.
- Kjaergaard, S.K., Mohalve, L., Pederson, O.F. (1991). *Human reactions to a mixture of indoor air volatile organic compounds*. Atmospheric Environment, 25: 1417-1426.
- Kosuge, K., Kubo, S., Kikukawa, N., Takemori, M. (2007). *Effect of pore structure in mesoporous silicas on VOC dynamic adsorption/desorption performance*. Langmuir, 23: 3095-3102.
- Krailas, S., Tongta, S., Meeyoo, V. (2004). *Macrokinetic determination of isopropanol removal using a downward flow biofilter*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(1): 56-64.
- Kristiansen, A., Pedersen, K. H., Nielsen, P.H., Nielsen, L.P., Nielsen, J.L., Schramm, A. (2011). *Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air*. Systematic and Applied Microbiology, 34: 344-352.
- Kumar, A., Dewulf, J., Van Langenhove, H. (2008). *Membrane-based biological waste gas treatment*. Chemical Engineering Journal, 136: 82-91.
- Lafita, C., Peña-roja, J.M., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V. (2012). *Full-scale biotrickling filtration of volatile organic compounds from air emission in wood-coating activities*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87: 732-738.
- Leson, G., Winer, A.M. (1991). *Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions*. Journal of the Air Waste Management Association, 41(8): 1045-1054.
- Ley 5/2013, de 11 de junio, por la que se modifican la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación y la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE núm. 140, de 12 de junio de 2013.
- Li, G., He, Z., An, T., Zeng, X., Sheng, G., Fu, J. (2008). *Comparative study of the elimination of toluene vapours in twin biotrickling filters using two microorganisms Bacillus cereus S1 and S2*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83: 1019-1026.
- Littlejohns, J.V., Daugulis, A.J. (2009). *A two-phase partitioning airlift bioreactor for the treatment of BTEX contaminated gases*. Biotechnology and Bioengineering, 103: 1077-1086.
- Majumdar, S., Bhaumik, D., Sirkar, K.K., Simes, G. (2001) *A pilot-scale demonstration of a membrane-based absorption stripping process for removal and recovery of volatile organic compounds*. Environmental Progress, 20 (1): 27-35.

- Martínez-Soria, V., Gabaldón, C., Peña-roja, J.M., Palau, J., Álvarez-Hornos, F.J., Sempere, F., Soriano, C. (2009). *Performance of a pilot-scale biotrickling filter in controlling the volatile organic compound emissions in a furniture manufacturing facility*. Journal of the Air and Waste Management Association, 59: 998-1006.
- Moe, W.M., Qi, B. (2004). *Performance of a fungal biofilter treating gas-phase solvent mixtures during intermittent loading*. Water Research, 38: 2259-2268.
- Moe, W.M., Qi, B. (2005). *Biofilter treatment of volatile organic compound emissions from reformulated paint: complex mixtures, intermittent operation, and startup*. Air and Waste Management Association, 55: 950-960.
- Moon, C., Lee, E.Y., Sunghoon, P. (2010). *Biodegradation of gas-phase styrene in a high-performance biotrickling filter using porous polyurethane foam as a packing medium*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15: 512-519.
- Morgan-Sagastume, F., Sleep, B.E., Allen, D.G. (2001). *Effects of biomass growth on gas pressure drop in biofilters*. Journal Environmental Engineering, 127: 388-396.
- Morotti, K., Avalos Ramírez, A., Peter Jones, J., Heitz, M. (2011). *Analysis and comparison of biotreatment of air polluted with ethanol using biofiltration and biotrickling filtration*. Environmental Technology, 33: 1967-1973.
- Moussavi, G., Bahadori, M.B., Farzadkia, M., Yazdanbakhsh, A., Mohseni, M. (2009). *Performance evaluation of a thermophilic biofilters for the removal of MTBE from waste air stream: Effects of inlet concentration and EBRT*. Biochemical Engineering Journal, 45: 152-156.
- Muñoz, R., Daugulis, A.J., Hernández, M., Quijano, G. (2012). *Recent advances in two-phase partitioning bioreactors for the treatment of volatile organic compounds*. Biotechnology Advances, 30: 1707-1720.
- Novak, V., Paca, J., Halecky, M., Soccol, C.R. (2008). *Styrene biofiltration in a trickle-bed reactor*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 51: 385-390.
- Okamoto, K., Izawa, M., Yanase, H. (2003). *Isolation and application of a styrene-degrading strain of Pseudomonas putida to biofiltration*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 95: 633-636.
- Okkerse, W.J., Ottengraf, S.P., Osinga-Kuipers, B, Okkerse, M. (1999). *Biomass accumulation and clogging in biotrickling filters for waste gas treatment. Evaluation of a dynamic model using dichloromethane as a model pollutant*. Biotechnology and Bioengineering, 63(4): 418-430.
- O'Reilly, A. (1997). *Estimation of residence time in VOC incineration*. Chemical Engineering Research and Design, 75: 33-42.
- O'Reilly, A. (1998). *A series reaction approach to VOC incineration*. Chemical Engineering Research and Design, 76: 302-312.
- Ottengraf, S.P.P. (1986). *Exhaust gas purification, in Biotechnology*. Vol.8, Rehm, H.J., Reed, G. Ed. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

- Ottengraf, S.P.P (1987). *Biological systems for waste gas elimination*. Trends in Biotechnology, 5: 132-136.
- Paca, J., Koutsky, B., Maryska, M., Halecky, M. (2001). *Styrene degradation along the bed height of perlite biofilter*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 76: 873-878.
- Parvatiyar, M.G., Govind, R., Bishop, D.F. (1996). *Biodegradation of toluene in a membrane biofilter*. Journal of Membrane Science, 119: 17-24.
- Paul, H., Philipen, C., Gerner, F.J. Strathmann, H. (1988). *Removal of organic vapour from air by selective membrane permeation*. Journal of Membrane Science, 36: 363-372.
- Pielech-Przybylska, K., Zieminski, K., Szopa, JSt. (2006). *Acetone biodegradation in a trickle-bed biofilter*. International Biodeterioration and Biodegradation, 57: 200-206.
- PRTR-España (2012). *Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes*. Disponible en línea: <http://www.prtr-es.es/informes/pollutant.aspx>.
- Pomeroy, R.D. (1957). *De-odorizing of gas streams by the use of microbial growth*. US Patent 2:793-796.
- Popov, V.O., Bezborodov, A.M., Cavanagh, M., Cross, P. (2004). *Evaluation of industrial biotrickling filter at the flexographic printing facility*. Environmental Progress, 23: 39-44.
- Qi, B., Moe, W.M., Kinney, K.A. (2005). *Treatment of paint spray booth off-gases in a fungal biofilter*. Journal of Environmental Engineering, 131(2): 180-189.
- Rahul, Mathur, A. K., Balomajumder, C. (2013). *Biological treatment and modeling aspect of BTEX abatement process in a biofilter*. Bioresource Technology, 142: 9-17.
- Real Decreto 117/2003, de 31 de enero, *sobre limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes*. BOE núm. 33, de 7 de febrero de 2003.
- Real Decreto 227/2006, de 24 de febrero, *por el que se complementa el régimen jurídico sobre la limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en determinadas pinturas y barnices y en productos de renovación del acabado de vehículos*. BOE núm.48, de 25 de febrero de 2006.
- Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, *por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación*. BOE núm. 251, de 19 de octubre de 2013.
- Rene, E.R., Murthy, D.V.S., Swaminathan, T. (2005). *Performance evaluation of a compost biofilter treating toluene vapours*. Process Biochemistry, 40: 2771-2779.
- Ruddy, M.J., Carrol, L.A. (1993). *Select the best VOC control strategy*. Chemical Engineering Progress, 7: 28-35.
- Ruthven, D.M. (1984). *Principles of adsorption processes*. New York: John Wiley.
- Shareefdeen, Z., Singh, A. (2005). *Biotechnology for odor and air pollution control*. Springer Publisher. Heidelberg, Alemania.

- Sempere, F., Gabaldon, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Peña-roja, J.M. (2008). *Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading*. *Chemosphere*, 73: 1533-1539.
- Sempere, F., Gabaldon, C., Martínez-Soria, V., Peña-roja, J.M., Álvarez-Hornos, F.J. (2009). *Evaluation of a combined activated carbon prefilter and biotrickling filter system treating variable ethanol and ethyl acetate gaseous emissions*. *Engineering in Life Sciences*, 9: 317-323.
- Sempere, F., Martínez-Soria, V., Palau, J., Peña-roja, J.M., San-Valero P., Gabaldón, C. (2011). *Effects of nitrogen source and empty bed residence time on the removal of styrene gaseous emissions by biotrickling filtration*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34: 859-867.
- Sempere, F., Martínez-Soria, V., Palau, J., Peña-roja, J.M., Waalkens, A., Gabaldón, C. (2012). *Control of VOC emissions from a flexographic printing facility using an industrial biotrickling filter*. *Water Science and Technology*, 65, 177-182.
- Singh, A., Ward, O.P. (2005). *Microbiology of bioreactors for waste gas treatment*, in Shareefdeen, Z., and Singh, A. (eds), *Biotechnology for odor and air pollution control*, Springer-Verlag, Berlín, pp 101-124.
- Spigno, G., Pagella, C., Fumi, M.D., Molteni, R., De Faveri, D.M. (2003). *VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Science*, 58: 739-746.
- Spivey, J.J. (1987). *Complete catalytic oxidation of volatile organics*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 26: 2165-2180.
- Stockley, N.J. (1994). *VOC abatement by absorption*. *European Coatings Journal*, 10: 751-757.
- Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D., Schleifer, K. (1998). *Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 930-939.
- Takeuchi, Y., Hayato, N., Miyata, S. A., Harada, A. (1995). *Adsorption of 1-butanol and p-xylene vapour and their mixtures with high silica zeolites*. *Separation Technology*, 5: 23-34.
- Togna, A.P., Singh, M. (1994). *Biological vapor-phase treatment using biofilter and biotrickling filter reactors: Practical operating regimes*. *Environmental Progress*, 13: 94-97.
- Trejo-Aguilar, G., Revah, S., Lobo-Oehmichen, R. (2005). *Hydrodynamic characterization of a trickle bed air biofilter*. *Chemical Engineering Journal*, 113: 145-152.
- Van Langenhove H., Wuyts E., Schamp N. (1986). *Elimination of hydrogen sulphide from odorous air by a wood bark biofilter*. *Water Research*, 12: 1471-1476.

- Wen, J.P., Chen, Y., Jia, X.Q., Chen, D.Y. (2005). *Simultaneous removal of ethyl acetate and ethanol in air streams using a gas-liquid-solid three-phase flow airlift loop bioreactor*. Chemical Engineering Journal, 106: 171-175.
- Yang, Y., Allen, E.R. (1994). *Biofiltration control of hydrogen sulphide, design and operational parameters*. Journal of the Air Waste management Association, 44: 863-868.
- Yi, F.Y., Lin, X.D., Chen, S.X. Wei, X.Q. (2009). *Adsorption of VOC on modified activated carbon fiber*. Journal of porous material. 16: 521-526.
- Zare, H., Najafpour, G., Rahimnejad, M., Tardast, A., Gilani, S. (2012). *Biofiltration of ethyl acetate by Pseudomonas putida immobilized on walnut shell*. Bioresource Technology, 123: 419-423.
- Zuber, L., Dunn, I.J., Deshusses, M.A. (1997). *Comparative scale-up and cost estimation of a biological trickling filter and a three-phase airlift bioreactor for the removal of methylene chloride from polluted*. Air Journal of the Air and Waste Management Association, 47: 969-975.

3. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR AL ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha supuesto el estudio de la diversidad de las comunidades microbianas desde un punto de vista diferente: el nivel genético. La taxonomía moderna tiende a agrupar a los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a su vez es un reflejo de su proximidad evolutiva. En este sentido, se ha aceptado el uso de un sistema filogenético basado en la secuencia del ARNr, donde el grado de semejanza entre secuencias ribosómicas proporciona una estimación de las relaciones filogenéticas o evolutivas (Woese, 1987). El gen ARNr 16S se considera uno de los principales marcadores filogenéticos debido a que está presente en todos los microorganismos y que contiene regiones conservadas que sirven para establecer relaciones filogenéticas lejanas, así como regiones variables que permiten evaluar relaciones filogenéticas próximas, distinguiendo entre secuencias de distintas especies. Por tanto, los genes ARNr se consideran potentes marcadores moleculares ya que permiten la elaboración de árboles filogenéticos robustos, de modo que en función de la similitud de la secuencia de ARNr se clasifican los microorganismos en dominios y taxones (Woese y col., 1990).

Así pues, a partir de marcadores moleculares se han desarrollado diferentes técnicas de análisis de las comunidades microbianas. Algunas de estas técnicas moleculares son: secuenciación de genes ribosomales, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), hibridación fluorescente in situ (FISH), polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP), análisis de los espaciadores intergénicos ribosomales (RISA) o pirosecuenciación.

3.1. Clonaje y secuenciación de los genes 16S ARNr

Las técnicas de clonación y secuenciación del gen 16S ARNr son ampliamente utilizadas en el campo de la ecología microbiana (Giovannoni y col., 1990). Esta metodología implica la extracción de ácidos nucleicos, la amplificación y la clonación de los genes de 16S ARNr, seguido de la secuenciación y, finalmente, la

identificación y la afiliación del clon aislado con la ayuda de un software filogenético. Mientras que los amplicones generados a partir de cultivos puros de bacterias podrían ser secuenciados directamente, en el caso de extractos de ADN genómico de las comunidades microbianas, el paso de la clonación resulta necesario con el fin de separar las diferentes secuencias de ADN.

El procedimiento metodológico a seguir consiste en la extracción inicial de los ácidos nucleicos de la muestra, generalmente ADN, seguida de una amplificación de los fragmentos de los genes 16S ARNr gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR permite amplificar un fragmento de ADN de interés, es decir, obtener un gran número de copias de dicho fragmento por la acción de la enzima Taq Polimerasa. En la PCR, la doble hélice de ADN se desnaturaliza (fase de desnaturalización) y se pone en contacto con los llamados *primers* o cebadores (fase de hibridación). Los cebadores son una secuencia de nucleótidos complementaria a los extremos del fragmento de ADN que se pretende amplificar. Cuando se pretende amplificar el gen 16S ARNr prácticamente completo, se utilizan cebadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1500 pares de bases aproximadamente. Sin embargo, una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del gen 16S ARNr completo, pudiéndose utilizar cebadores de menor tamaño. Estos cebadores son extendidos en la PCR por la polimerasa que usa como molde el ADN de cadena sencilla para crear una hebra de ADN complementaria (fase de extensión). Cada una de estas tres fases de la PCR (desnaturalización, hibridación y extensión) se define por un tiempo y una temperatura determinados y en su conjunto se denomina ciclo. La repetición sucesiva de estos ciclos permite el incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN de interés (Erich y col., 1991).

Una vez completada la etapa de amplificación por PCR, se llevan a cabo las reacciones de secuenciación. La secuenciación de ADN se basa en determinar la estructura primaria del material genético, es decir, establecer el orden en el que los cuatro nucleótidos que constituyen el ADN (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) se encuentran en un fragmento dado. Los métodos actuales de secuenciación de ADN

son una variación del método clásico de Sanger (Sanger y Coulson, 1975), que requiere una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, una ADN polimerasa con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados (didesoxinucleótidos trifosfato, ddNTPs) que terminan la elongación de la cadena de ADN. La muestra de ADN se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas en las que se añade sólo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer de grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de ADN. La incorporación de un didesoxinucleótido en la cadena naciente de ADN termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de ADN de longitud variable. Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados de nuevo son desnaturalizados por calor y separados por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis se lleva a cabo en carriles individuales, uno para cada nucleótido (Carril A, T, G y C), y se visualizan las bandas de ADN mediante autoradiografía o luz ultravioleta. La secuencia de ADN se puede leer directamente a partir de la imagen del gel (Sanger y Coulson, 1978).

La secuenciación automatizada se consigue con el marcaje de los fragmentos de ADN en el extremo 5' mediante un colorante. Se necesitan cuatro reacciones, pero los fragmentos de ADN marcados con colorantes se pueden leer utilizando un sistema óptico, lo que conlleva un análisis rápido, económico y automatizado. Después de la secuenciación del ADN, se comparan las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos como GenBank NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) o EMBL (*European Molecular Biology laboratory*).

El clonaje y secuenciación de los genes 16S ARNr proporciona información filogenética precisa de los miembros de comunidades microbianas complejas, por ello, estas técnicas se han aplicado en el campo de la biofiltración de efluentes gaseosos de COV a fin de caracterizar las comunidades microbianas desarrolladas en estos procesos. En este contexto, Arnold y col. (1997) utilizaron tres biofiltros de turba para el tratamiento de emisiones contaminadas con estireno. Entre las

especies identificadas en la biopelícula desarrollada sobre el material de relleno de los sistemas, se identificaron siete cepas con capacidad para degradar estireno. Estas especies pertenecieron a los géneros *Tsukamurella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* y un género no identificado del grupo bacteriano *Gammaproteobacteria*. Juteau y col. (1999) analizaron la comunidad microbiana de un biofiltro de compost aplicado al tratamiento de tolueno, en el que se identificaron los géneros *Acinetobacter*, *Azoarcus*, *Mycobacterium*, *Nevskia*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia* y *Rhodococcus* de los cuales *Pseudomonas* y *Rhodococcus* fueron los más abundantes. Roy y col. (2003) estudiaron las comunidades bacterianas de tres biofiltros de compost para el tratamiento de emisiones contaminadas con tolueno. En este trabajo sólo se detectó una única especie con capacidad para eliminar el tolueno que se identificó como *Pseudomonas putida*. Amouric y col. (2006) analizaron la biofiltración de hexano en un biofiltro de vermiculita. Este biofiltro se inoculó con un cultivo bacteriano previamente adaptado a vapores de gasolina. Los resultados de la clonación y secuenciación indicaron que todas las cepas aisladas del inóculo pertenecieron a Proteobacteria (*Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*) con dominancia del grupo bacteriano *Gammaproteobacteria* que estuvo mayoritariamente constituido por la especie *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos del análisis de muestras del biofiltro después de 27 días de operación indicaron que la comunidad bacteriana estaba compuesta principalmente por el grupo *Gammproteobacteria*. Además se identificaron los grupos bacterianos *Betaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Deltaproteobavteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides* y algunas especies de *Actinobacteria*. Mathur y col. (2007) emplearon un biofiltro para el tratamiento de la mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y o-xileno (BTEX). El material de relleno consistió en una mezcla de compost, caña de azúcar y carbón activado. Los autores aislaron una cepa con elevada capacidad para degradar la mezcla de contaminantes que se identificó como *Bacillus sphaericus*. Barcon y col. (2012) estudiaron la eliminación de metanol en dos biofiltros en los que se utilizó, en uno de ellos, un material de relleno orgánico de corteza de pino y, en el otro, un material de relleno sintético de anillos de PVC. En la primera fase de experimentación se operó el biofiltro con el material de relleno orgánico sin llevar a

cabo un control de pH lo que provocó una acidificación del sistema. Bajo estas circunstancias, las técnicas de clonación y secuenciación permitieron la identificación de los microorganismos predominantes que fueron las siguientes especies de hongos: *Candida boidinii*, *Nectria mariannaeae*, *Scytalidium lignicola* y *Hydrocina chaetoclada*. En la segunda fase de experimentación se operó el biofiltro percolador con anillos de PVC como material de relleno y, en este caso, se llevó a cabo el control de pH a condiciones neutras. Durante esta fase, se identificaron como predominantes los siguientes grupos de bacterias: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*. Zehraoui y col. (2014) estudiaron el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con n-hexano mediante un biofiltro percolador evaluando si la introducción de metanol incrementaba la eliminación del contaminante. Los autores determinaron que las especies dominantes durante el tratamiento de la mezcla n-hexano y metanol fueron *Methylobacterium aminovorans*, *Hyphomicrobium* sp. y *Mycobacterium* sp. Sin embargo, cuando sólo se introducía n-hexano en el biorreactor la especie predominante fue *Mycobacterium* sp., mientras que la especie *Hyphomicrobium* sp. redujo significativamente su abundancia y la especie *Methylobacterium aminovorans* desapareció.

3.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La técnica DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero diferente secuencia de nucleótidos (Muyzer y col., 1993). Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis se mantiene una temperatura constante, normalmente de 60 °C, y los fragmentos de ADN migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) en la que las cadenas de ADN se separan y el desplazamiento de las moléculas se interrumpe. Para asegurar que las moléculas se detengan en su punto de desnaturización se necesita una cola poli-GC que se incorpora al extremo 5' de uno de los cebadores.

Esta cola está formada por 40-60 guaninas (G) y citosinas (C) y proporciona a los fragmentos amplificados una elevada temperatura de desnaturalización que evita que las moléculas de ADN se desnaturalicen por completo para conseguir una resolución óptima en el gel.

Las propiedades de desnaturalización de los fragmentos de ADN que se someten a análisis por DGGE se deben determinar previamente para optimizar el gradiente desnaturalizante y la duración de la electroforesis, de manera que los fragmentos se separen correctamente. El porcentaje de acrilamida del gel se suele ajustar en función de la longitud de los productos de PCR y dado que la técnica de DGGE es adecuada para fragmentos de ADN de hasta 500 pares de bases (Muyzer y Smalla, 1998) el porcentaje de acrilamida suele oscilar entre el 6% y el 10%. Existen variaciones de la técnica DGGE, como la TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) que utiliza un gradiente lineal de temperatura a lo largo del gel de electroforesis en lugar de un agente químico desnaturalizante. Las moléculas con distinta secuencia se desnaturalizan a distintas temperaturas, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer, 1999).

La técnica DGGE es un método altamente sensible y relativamente reproducible, permite analizar simultáneamente numerosas muestras posibilitando la realización de estudios de diversidad microbiana. En este sentido, esta técnica permite comparar las comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes puntos de muestreo o permite estudiar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales u operacionales. Además una de las principales ventajas es la posibilidad de extracción de las bandas correspondientes a los fragmentos separados para su identificación mediante secuenciación. En contraposición, la técnica presenta algunas limitaciones pues la longitud de los fragmentos separados no suelen ser mayor de 500 pares de bases, limitando la resolución en la identificación de secuencias diferentes, de modo que es posible la co-migración de fragmentos de ADN, es decir, que dos secuencias diferentes de ADN compartan una misma posición en el gel. Esto puede provocar la subestimación de la diversidad microbiana presente en las muestras analizadas. Además, pueden presentarse bandas dobles provenientes de la formación de

moléculas heteroduplex durante la PCR, es decir, que un organismo esté representado por varias bandas, de manera que se dificulta la interpretación de los perfiles de DGGE ya que, en este caso, se puede sobreestimar la diversidad microbiana.

La técnica DGGE ha sido utilizada en el campo de la ecología microbiana permitiendo evaluar la dinámica poblacional en ecosistemas tales como las biopelículas desarrolladas en los biorreactores para el tratamiento de emisiones de COV. En este sentido, Tresse y col. (2002) estudiaron la evolución temporal de las poblaciones microbianas en un biofiltro percolador en el que se evaluó la eliminación de estireno. Los patrones de bandas de la DGGE mostraron que el inóculo presentaba 6 bandas, mientras que después de 182 días de operación se observaron 17 bandas en las muestras tomadas del biorreactor. Sólo el 50% de las bandas del inóculo se mantuvieron a lo largo de la operación del biofiltro percolador. Además, se analizó la comunidad microbiana a diferentes alturas del lecho del biorreactor observándose uniformidad en los patrones de bandas obtenidos, fenómeno que los autores asociaron a la homogenización causada por los flujos de aire y de líquido que atraviesan el lecho. Una de las especies dominantes que se identificó a lo largo de los 182 días fue *Rhodococci erythropolis*, una bacteria Gram positiva perteneciente al grupo *Actinobacteria*. Cai y col. (2006) estudiaron el funcionamiento y la comunidad microbiana de un biofiltro percolador en el que se llevaron a cabo diferentes fases de experimentación, cada una de ellas con diferente composición de contaminantes. Los compuestos estudiados fueron metil etil cetona (MEK) en la primera fase (fase I), una mezcla de tolueno y metil isobutil cetona (MIBK) en la segunda fase (fase II), estireno en la tercera fase (fase III) y por último, de nuevo MEK en la cuarta fase (fase IV). Los patrones de bandas obtenidos con la técnica DGGE mostraron cambios en la comunidad microbiana. Particularmente, se apreció un cambio drástico en los patrones de bandas entre la fase I y II, ya que desaparecieron algunas de las bandas de la fase I y aparecieron múltiples bandas nuevas en la fase II. Babbit y col. (2009) estudiaron dos biofiltros de carbón activado para el tratamiento de metanol. Uno de los biofiltros se inoculó con un cultivo de bacterias degradadoras de metanol mientras que el otro biofiltro no se inoculó. La comunidad microbiana se analizó a lo largo del experimento mediante la técnica de

DGGE observándose un mayor número de bandas en el patrón correspondiente a las muestras del biofiltro que fue inoculado, lo que implicó una mayor diversidad microbiana. Por otra parte, se observó una comunidad bacteriana estable a lo largo de la operación que no se vio afectada por los cambios en la concentración de metanol en las emisiones a depurar. Las bandas con mayor intensidad se extrajeron para una posterior identificación mediante secuenciación, determinándose una elevada abundancia de especies con capacidad para degradar metanol pertenecientes al grupo *Betaproteobacteria* como es el caso del género *Methylophilus* y al grupo *Alfaproteobacteria* con géneros como *Hyphomicrobium* y *Methylocella*. Li y col. (2012) estudiaron la comunidad bacteriana desarrollada en un biofiltro percolador a escala industrial para la depuración de una mezcla de contaminantes constituida por MEK, estireno y tolueno. Los patrones de bandas de la técnica DGGE mostraron desde el día 38 de operación una composición de la comunidad microbiana diferente a la identificada en el inóculo. La comunidad bacteriana presentó una predominancia del filum Proteobacteria, particularmente *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Alfaproteobacteria*. Los autores relacionaron la aparición de una cepa perteneciente al género *Xanthomonadales* (*Gammaproteobacteria*) a partir del día 68 con una recuperación de la eficacia de eliminación del sistema. Okunishi y col. (2012) utilizaron la técnica de DGGE para el estudio de la comunidad microbiana en un biofiltro para el tratamiento de emisiones de tolueno empleando como material de relleno polivinilo. Se observaron cambios en la composición de las poblaciones bacterianas a lo largo del periodo experimental asociados a la variación de condiciones de operación tales como la concentración de contaminante, la adición de nutrientes o las interrupciones en la alimentación de COV. Los patrones de la técnica DGGE mostraron una comunidad bacteriana diversa, identificándose especies como *Burkholderia cepacia* (*Betaproteobacteria*), *Shingobacterium multivorum* (*Bacteroidetes*) y *Pseudomonas putida* (*Gammaproteobacteria*). Sólo la especie *Alicyclophilus denitrificans* (*Betaproteobacteria*) se mantuvo a lo largo de todo el periodo experimental. Prenafeta-Boldú y col. (2012) analizaron la comunidad microbiana de tres biofiltros. En cada biofiltro se llevó a cabo la eliminación de uno de los siguientes contaminantes: tolueno, etilbenceno y p-xileno. Los tres biofiltros se rellenaron de un

fertilizante orgánico peletizado y se inocularon con un cultivo de bacterias degradadoras de tolueno. Las bandas dominantes observadas en el gel de la DGGE procedentes del inóculo, del material de relleno y de muestras de biomasa de los biofiltros después de 185 días de operación, se extrajeron y secuenciaron para su identificación. El inóculo resultó estar constituido por las siguientes especies: *Burkholderia cepacea*, *Pandora pnomenusa*, *Xanthomonadales* sp., y un hongo *Acremonium kiliense*. La comunidad microbiana identificada en el material de relleno fue altamente diversa, compuesta por bacterias y hongos como *Cytophagales*, *Pseudoactinobacter* sp., *Actinomycetales* (*Ruania albidiflava* y *Aeromicrobium ginsengisoli*), *Streptomyces halotolerans*, *Rhodococcus coprophilus*, *Exophiala oligosperma*, *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus versicolor*. En las muestras procedentes de los biorreactores al final del experimento se identificaron especies provenientes del material de relleno como *S. halotolerans* o *R. coprophilus* y hongos como *E. oligosperma* y *A. versicolor*. Además, se detectaron comunidades microbianas similares en dos de los biofiltros, en concreto, en los biofiltros que trataron emisiones contaminadas de tolueno y etilbenceno, con géneros como *Alcaligenes*, *Microbacterium* y *Streptomyces*. Sin embargo, la comunidad microbiana del biofiltro alimentado con xileno fue diferente y más compleja, con géneros bacterianos como *Sphingobacteriales* y *Thermoleophilales* y especies de hongos como *Cladophialophora saturnica*.

3.3. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

La técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) permite la detección de secuencias concretas de ácidos nucleicos mediante sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos. Las sondas hibridan de modo específico con la secuencia complementaria. El uso de sondas de oligonucleótidos para regiones específicas del gen 16S ARNr permite la identificación filogenética de los microorganismos dentro de una muestra ambiental (DeLong y col., 1989). La metodología para la aplicación de la técnica FISH requiere una serie de pasos (Amann y col., 1995). El primer paso necesario es la fijación de las bacterias. De esta forma se conserva su morfología y se favorece el acceso de las sondas.

Posteriormente se pone en contacto la muestra con una solución de hibridación donde está inmersa la sonda marcada con un fluorocromo. Esta solución contiene formamida para favorecer las condiciones de especificidad de la sonda. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno. El siguiente paso es la incubación de la muestra donde se produce la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria. Posteriormente, se requiere la visualización de las células hibridadas. Para ello, se puede utilizar desde microscopia de epifluorescencia a microscopia láser confocal o citometría de flujo (Amman y col., 1990; Wagner y col., 1994; DeLong y col., 1999). Finalmente, se realiza una cuantificación relativa de la presencia de un grupo microbiano, género o especie en la muestra analizada. En este sentido, Jubany y col. (2009) crearon un método automático para la determinación de la fracción de biomasa hibridada frente al total de bacterias presentes.

La técnica FISH permite visualizar, identificar y cuantificar diferentes microorganismos dentro de una muestra compleja, ya que se pueden utilizar sondas con dominios específicos para especies, géneros, familias y órdenes (Amann y col., 1995 y 2001). En contraposición al potencial de esta técnica, su aplicación está limitada a la disponibilidad de las sondas para los microorganismos que se pretenden analizar ya que no siempre se encuentran en las bases de datos disponibles. Otra limitación de la técnica viene dada por la aparición de falsos negativos y falsos positivos que afectan a la cuantificación final, subestimando o sobreestimando los resultados.

La técnica FISH ha sido utilizada para el estudio de las comunidades de microorganismos en diferentes bioprocesos y en concreto en el campo de la biofiltración de COV demostrando ser una metodología efectiva para llevar a cabo el seguimiento simultáneo de diferentes grupos de microorganismos en comunidades complejas como son las biopelículas. Por ejemplo, Stoffels y col. (1998) estudiaron la dinámica de la comunidad bacteriana mediante la técnica FISH en un biofiltro percolador a escala industrial para la degradación de una mezcla de compuestos aromáticos en emisiones gaseosas. Para la preparación del inóculo se utilizó fango

activado de una EDAR que presentó mayor proporción de los grupos bacterianos *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. Este fango activado se aclimató a la mezcla de compuestos aromáticos durante 48 días. Después de este periodo, el reactor se inoculó con este cultivo que presentó una abundancia del grupo bacteriano *Gammaproteobacteria* del 80% con *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* como especies representativas. Sin embargo, los resultados de la aplicación de la técnica FISH en muestras de biopelícula del biorreactor de los días 127 y 227 de operación mostraron como la composición de la comunidad bacteriana fue diferente a la del inóculo aclimatado, ya que los grupos *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* volvieron a ser dominantes frente a *Gammaproteobacteria*. Friedrich y col. (2003) investigaron la comunidad microbiana de un biofiltro a escala industrial que se operó utilizando como material de relleno una mezcla de raíces de árboles trituradas y compost. Los resultados mostraron una dinámica temporal de las poblaciones bacterianas a lo largo del periodo experimental con dominancia del grupo bacteriano *Betaproteobacteria* seguido de *Actinobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Firmicutes* y *Gammaproteobacteria*. Hekmat y col. (2003) estudiaron la comunidad bacteriana mediante la técnica FISH en un biofiltro percolador alimentado con una mezcla de compuestos aromáticos. En primer lugar se analizó la comunidad bacteriana del inóculo en el que se detectaron mayoritariamente *Actinobacterias*, mientras que el filum Proteobacteria, representado en este estudio por *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, se identificó con una abundancia inferior al 2%. El análisis de la comunidad microbiana en el biorreactor después de un tiempo prolongado de operación presentó una abundancia de Proteobacteria entre el 87 y el 92%, siendo *Gammaproteobacteria* el grupo bacteriano más abundante tanto en las muestras procedentes de la biopelícula como de la solución de recirculación. Además, se detectaron dos cepas con capacidad para degradar la mezcla de contaminantes que pertenecieron al género *Pseudomonas*. Kristiansen y col. (2011) analizaron la estructura de la comunidad bacteriana en un biofiltro a escala industrial para el tratamiento de amoníaco y una mezcla de COV. Los resultados indicaron el desarrollo de una comunidad bacteriana especializada con dominancia del grupo *Betaproteobacteria* (especialmente *Comamonas*), seguido de *Bacteroidetes*,

Actinobacteria, *Gammaproteobacteria*, y bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas* o *Nitrosococcus*.

La técnica FISH también se ha empleado para el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas en otro tipo de aplicaciones asociadas a la depuración de emisiones gaseosas, como por ejemplo, en la desulfuración de gases mediante biofiltración (Chung, 2007; Maestre y col., 2010).

3.4. Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP)

La técnica de SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*) se basa en la movilidad electroforética del ADN monocatenario en geles de acrilamida bajo condiciones no desnaturizantes que depende de su estructura espacial tridimensional y está directamente relacionada con su secuencia (Lessa y Applebaum, 1993). El primer paso para la aplicación de la técnica SSCP consiste en una amplificación por PCR de la región de interés del gen que se pretende analizar. Después de la amplificación por PCR los fragmentos de ADN son desnaturizados, y bajo unas condiciones concretas de concentración y de temperatura las cadenas simples de ADN adoptan una conformación tridimensional específica. La técnica SSCP puede ser fácilmente automatizada mediante cebadores marcados con moléculas fluorescentes y utilizando un secuenciador automático de ADN.

A diferencia de la técnica DGGE, la SSCP no requiere el uso de cebadores con cola GC, geles con gradiente o instrumentos específicos de electroforesis por lo que resulta una técnica más sencilla. Sin embargo, presenta algunas desventajas ya que la obtención de resultados satisfactorios requiere el análisis de fragmentos con un tamaño menor a 400 pares de bases. A medida que aumenta el tamaño de la molécula a analizar ésta se vuelve insensible a determinados cambios, adoptando siempre la misma conformación tridimensional a pesar de haberse producido un cambio en su secuencia. Además, la desnaturización completa es difícil de conseguir y muchas veces aparece más de una banda para un mismo fragmento de ADN (Scwieger y Tebbe, 1998). Sin embargo, la técnica SSCP ha sido utilizada en varios trabajos sobre caracterización de las comunidades microbianas de muestras

ambientales, como es el caso de algunos de los estudios microbiológicos llevados a cabo en biorreactores para la depuración de emisiones gaseosas contaminadas con COV. Por ejemplo, Khammar y col. (2005) operaron un biofiltro de turba para estudiar la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la actividad de degradación a diferentes alturas del biorreactor. Las emisiones tratadas consistieron en una mezcla de 11 COV (compuestos oxigenados, aromáticos y halogenados). Los resultados obtenidos mediante la técnica SSCP indicaron una composición de la comunidad microbiana altamente diversa que presentaba diferencias a lo largo del lecho, lo que se relacionó con una degradación específica de contaminantes. Los compuestos oxigenados se eliminaron en la parte superior del biofiltro, zona de alimentación de las emisiones a depurar, mientras los compuestos aromáticos se eliminaron en la parte final del reactor. A 10 cm de altura del biorreactor se detectaron especies del grupo *Actinobacterias* como *Rhodococcus erythropolis*. A partir de 70 cm de altura del biorreactor se identificaron especies del grupo *Betaproteobacteria* como *Burkholderia* sp. Las especies del grupo *Gammaproteobacteria*, como *Pseudomonas* sp., se detectaron a lo largo de todo el biorreactor. Lin y col. (2007) estudiaron la eliminación de metil ter-butil éter (MTBE) en un biofiltro percolador analizando dos soluciones de nutrientes en las que se cambió la fuente de nitrógeno, en una de ellas se utilizó sulfato de amonio y en la otra nitrato de sodio. Los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica SSCP mostraron diferente comunidad bacteriana con cada una de las soluciones de nutrientes. La mayor eliminación de MTBE se obtuvo utilizando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, lo que además coincidió con una comunidad bacteriana menos diversa, es decir más especializada en la degradación de MTBE. Bayle y col. (2009) estudiaron la biofiltración de una mezcla de 11 COV (compuestos oxigenados, aromáticos y halogenados), analizando como afectaba la carga volumétrica de contaminantes sobre la comunidad microbiana desarrollada. Los resultados obtenidos con la técnica SSCP determinaron mayor diversidad de especies para cargas bajas de contaminante. Las especies más abundantes pertenecieron a los grupos *Bacteroides* (35%), *Alfaproteobacteria* (20%), *Betaproteobacteria* (20%), *Cyanobacteria* (4-10%) y el resto se identificaron como *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Epsilonproteobacteria*.

3.5. Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

La técnica ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) se basa en una amplificación por PCR del gen 16S ARNr y una digestión con endonucleasas de restricción. Posteriormente los productos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (Smit y col., 1997). Los perfiles electroforéticos obtenidos revelan la diversidad microbiana existente en la muestra analizada. ARDRA es una técnica efectiva y sencilla que se ha utilizado usualmente en combinación con otras técnicas como T-RFLP o DGGE permitiendo estudiar la dinámica de las poblaciones microbianas ante cambios ambientales. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la elección de la endonucleasa y la aparición de más de una banda en el gel para un mismo fragmento amplificado, lo que produce una sobrestimación de los resultados. La técnica ARDRA se ha aplicado en algunos estudios de caracterización de las comunidades microbianas presentes en bioprocesos. Friedrich y col. (2002) analizaron la diversidad bacteriana presente en un biofiltro a escala industrial operado para el tratamiento de una mezcla compleja de contaminantes. El resultado de la aplicación de la técnica ARDRA mostró una elevada diversidad bacteriana ya que se detectaron 444 clones de los cuales 106 fueron secuenciados, identificándose que el 90.5% pertenecían a los grupos Proteobacteria y Bacteroidetes. Los grupos mayoritarios fueron *Alfaproteobacteria* (22.1%), *Betaproteobacteria* (17.6 %) y *Gammaproteobacteria* (18.6%), seguido de *Actinobacteria* (2%), *Firmicutes* y *Verrucomicrobia* (1%), *Deltaproteobacteria* (0.5%) y *Thermomicrobia* (0.5%). Bailón y col. (2009) estudiaron la eliminación de diclorometano en dos biofiltros percoladores. En este trabajo se utilizó la técnica ARDRA para realizar el seguimiento de las cepas *Hyphomicrobium* KDM2 y KDM4 a lo largo del periodo de operación ya que se emplearon como inóculo de los biorreactores. Los resultados mostraron que estas cepas estuvieron presentes durante toda la experimentación, sin embargo no fueron las especies dominantes.

3.6. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

La técnica T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la amplificación del ADN por PCR utilizando un cebador marcado con una molécula fluorescente (Liu y col., 1997). El fragmento de PCR resultante se digiere con una o más endonucleasas de restricción y los fragmentos de restricción terminales se separan físicamente en un analizador automático de ADN. La diversidad microbiana en una comunidad puede estimarse mediante un secuenciador capilar en el que se obtiene un electroforograma donde cada pico corresponde a un fragmento de restricción terminal. Una de las principales ventajas de la técnica es la separación de los fragmentos con alta resolución, sin embargo esta técnica presenta la limitación de no poder extraer los fragmentos de las bandas separadas para su posterior secuenciación. La técnica T-RFLP se ha utilizado para el estudio de la dinámica de la comunidad microbiana tanto espacial como temporal en bioprocesos. Maestre y col. (2009) estudiaron la comunidad microbiana desarrollada en un biofiltro percolador para la desulfuración de gases o Yang y col. (2014) aplicaron esta técnica para estudiar la comunidad bacteriana desarrollada en cuatro biofiltros para la eliminación de amoníaco.

En el caso de la biofiltración de emisiones gaseosas de COV se pueden encontrar trabajos donde se utiliza la técnica T-RFLP, aunque normalmente se emplea como complemento de otras técnicas de biología molecular. En este sentido, Khammar y col. (2005) operaron un biofiltro de turba para el tratamiento de una mezcla de 11 COV (oxigenados, aromáticos y halogenados). Se cultivaron muestras de turba utilizando un medio de cultivo general de triptona, soja y agar y se aislaron 31 cepas que se analizaron mediante la técnica T-RFLP. Los resultados determinaron que las cepas aisladas pertenecieron a los grupos bacterianos *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria* y a las divisiones de hongos *Basidiomycota* y *Saccharomyces*.

3.7. Análisis de los espaciadores intergénicos ribosomales (RISA)

RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) es una técnica basada en la amplificación mediante PCR de la región entre los operones 16S y 23S ARNr conocida como región espaciadora intergénica (ISR). Esta región es diferente en cada especie tanto en secuencia como en longitud. Las ISR pueden ser amplificadas por PCR mediante cebadores a partir de nucleótidos conservados de los extremos 5' de los genes 23S ARNr y de los extremos 3' de los genes 16S ARNr (Borneman y Triplett, 1997). La versión automatizada de la técnica RISA se conoce como ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) y se basa en el uso de un cebador marcado con una molécula fluorescente que permite la detección de la ISR automáticamente mediante un detector láser (Fisher y Triplett, 1999). Este método es rápido y simple y permite el análisis de la dinámica poblacional en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales u operacionales. El inconveniente es que la base de datos existente de ISR es limitada y no siempre es posible la identificación de los microorganismos presentes en las muestras ambientales. No obstante, la técnica RISA/ARISA ha sido utilizada en algunos estudios para el análisis de las comunidades microbianas de biofiltros para la eliminación de COV.

Steele y col. (2005) evaluaron la estructura de la comunidad microbiana presente en dos biofiltros para el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con etanol. Cada biofiltro se operó utilizando diferente material de relleno, en uno de ellos se utilizó arena y, en el otro, rocas de lava. Para la inoculación de los biorreactores se empleó fango activado procedente de una EDAR que se aclimató a etanol durante 68 días. El resultado de la aplicación de la técnica ARISA mostró una disminución en la diversidad microbiana durante el proceso de aclimatación del fango. Durante el funcionamiento de los biorreactores, la menor diversidad microbiana se detectó cuando la eficacia de eliminación fue superior al 80%. Por otra parte, se relacionó la diversidad bacteriana con el pH de operación, de modo que para pH inferiores a un valor de 4 se identificó una elevada diversidad microbiana coincidiendo con menores eficacias de eliminación. Sin embargo, en los periodos de operación a pH neutro la diversidad microbiana disminuyó mientras que la eficacia de eliminación de los sistemas se incrementó. Borin y col. (2006) analizaron la diversidad microbiana de un biofiltro de compost alimentado con emisiones de

benceno mediante la técnica RISA a lo largo de 240 días. Los resultados determinaron un aumento de la diversidad microbiana al incrementar la concentración de benceno de las emisiones gaseosas. Se determinó como grupo mayoritario *Rhodococcus*, bacteria Gram positiva perteneciente al grupo de las *Actinobacterias*, seguido de los géneros *Bordetella* y *Neisseria*, bacterias Gram negativas pertenecientes al grupo *Betaproteobacteria*. Del total de las cepas aisladas, más del 35% presentaron capacidad de utilizar el benceno como fuente de carbono. Estas cepas pertenecieron a los siguientes grupos bacterianos: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*.

3.8. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación está basada en la secuenciación por síntesis, acoplando la síntesis de ADN a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una determinación de secuencias en tiempo real (Ronaghi y col., 1996 y 1998). Esta técnica ha sido comercializada por la empresa Roche con el primer equipo de secuenciación masiva (Secuenciador GS 20™). Este método se basa en la nanotecnología ya que utiliza esferas atrapadas en una placa que contiene más de un millón y medio de microceldas de 44 µm de diámetro. Al introducir una esfera por cada celdilla se realiza una reacción de secuenciación individual basada en la síntesis complementaria de ADN de cadena sencilla, el cual ha sido multiplicado por una reacción de PCR y alineado a cada esfera. La incorporación de cada nucleótido durante la polimerización de ADN libera una molécula de pirofosfato (PPi), que al interaccionar con algunas enzimas presentes en el medio (ADN polimerasa, sulfurilasa, ATP luciferasa y apirasa) produce una señal quimioluminiscente que es capturada por una cámara de detección de fotones, y que con el soporte de un programa de cómputo es traducida como la adición de un nucleótido determinado, generando una secuencia individual por cada celda. La técnica de pirosecuenciación ofrece la posibilidad de obtener una visión muy detallada de las comunidades microbianas y de su estructura mediante el examen de secuencias bacterianas en órdenes de magnitud mayor que mediante el uso de los métodos tradicionales tales como la clonación y secuenciación de Sanger (Rothberg y Leamon, 2008).

La aplicación de la pirosecuenciación a los estudios de biofiltración permite el análisis de cambios en la estructura microbiana identificando todas las especies presentes. La técnica de pirosecuenciación se ha comenzado a aplicar en los últimos años en el campo de la biofiltración. Jianming y col. (2014) estudiaron la comunidad bacteriana de dos biofiltros percoladores que trataron emisiones de diclorometano mediante pirosecuenciación. Los resultados determinaron que los tres filum dominantes fueron *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* siendo *Pandoraea* el género predominante. Este género perteneciente a la clase *Betaproteobacteria* se utilizó en la inoculación de los biorreactores ya que presentó capacidad para degradar el diclorometano. Otros géneros minoritarios identificados fueron *Novosphingobium* (*Alfaproteobacteria*), *Acidovorax* (*Betaproteobacteria*), *Xanthomonas* (*Gammaproteobacteria*) y *Flexibacter* (*Bacteroidetes*). Russell y col. (2014) aplicaron la técnica de pirosecuenciación para analizar la comunidad bacteriana de un biofiltro con raíces de árbol como material de relleno que se empleó para el tratamiento de una mezcla de 6 COV (propanol, hexanol, percloroetileno, d-limoneno, benceno y tolueno). Inicialmente, se analizó la comunidad microbiana presente en las raíces de árbol que se utilizaron como material de relleno, determinándose los filum *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* como dominantes. En el caso del grupo *Proteobacteria* destacaron los órdenes *Rhizobiales* (*Alfaproteobacteria*) y *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*). En el caso del grupo *Bacteroidetes* destacaron los órdenes *Sphingobacteriales* (*Sphingobacteria*) y *Flavobacteriales* (*Flavobacteria*). Posteriormente, se analizó la comunidad bacteriana que se desarrolló en el biorreactor después de un tiempo prolongado de operación, observándose una proliferación de especies de las cuales la familia más abundante fue *Hyphomicrobiaceae* (*Alfaproteobacteria*). Además se identificaron otras especies pertenecientes a las familias *Pseudomonadaceae* (*Gammaproteobacteria*), *Rhodobacteraceae* (*Alfaproteobacteria*) y *Burkholderia* (*Betaproteobacteria*).

La técnica de pirosecuenciación ha permitido completar el estudio microbiológico que se ha desarrollado mediante la técnica FISH en el biofiltro de turba para la eliminación de estireno de esta tesis doctoral (capítulo 6). Los resultados de pirosecuenciación determinaron *Azoarcus* (*Betaproteobacteria*) y

Pseudomonas (*Gammaproteobacteria*) como los géneros dominantes. Además, se estableció que los géneros *Brevundimonas* (*Alfaproteobacteria*), *Hydrogenophaga* y *Achromobacter* (ambos *Betaproteobacteria*) presentaron una función importante en la degradación de estireno. Se observó una relación entre la abundancia de estos géneros y las concentraciones de estireno de las emisiones gaseosas (Portune y col., 2015).

La técnica de pirosecuenciación también se ha utilizado en otro tipo de aplicaciones como por ejemplo la desulfuración de gases mediante biofiltración (Rovira, 2012; Montebello y col., 2013) o la eliminación de metano (Kim y col., 2014).

3.9. Bibliografía

- Amann, R.I., Binder, B.J., Olser, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stalh, D. (1990). *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotides probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations*. Applied and Environmental Microbiology, 56: 1919-1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Scheleifer, K.-H. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiological reviews, 59: 143-169.
- Amann, R.I., Fuchs, B.M., Behrens, S. (2001). *The identification of microorganismes by fluorescence in situ hybridization*. Current Opinion in Biotechnology, 12: 213-236.
- Amouric, A., Verh, F., Auria, R., Casalot, L. (2006). *Study of a hexane-degrading consortium in a biofilter and in liquid culture: biodiversity, kinetics and characterization of degrading strains*. FEMS Microbiology Ecology, 55: 239-247.
- Arnold, M., Reittu, A., Von Wright, A., Martikainen, P.J., Suihko, M.-L. (1997). *Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter*. Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 738-744.
- Babbitt, C.W., Pacheco, A., Lindner, A.S. (2009). *Methanol removal efficiency and bacterial diversity of an activated carbon biofilter*. Bioresource Technology, 100: 6207-6216.
- Bailón, L., Nikolausz, M., Kästner, M., Veiga, M.C., Kennes, C. (2009). *Removal of dichloromethane from waste gases in one- and two-liquid-phase stirred tank bioreactors and biotrickling filters*. Water Research, 43: 11-20.
- Barcon, 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.

- Bayle, S., Malhautier, L., Degrange, V., Godon, J.J., Fanlo, J.L. (2009). *Structural and functional responses of sewage microbial communities used for the treatment of a complex mixture of volatile organic compounds (VOCs)*. Journal of Applied Microbiology, 107(1): 85-96.
- Borin, S., Marzorati, M., Brusetti, L., Zilli, M., Cherif, H., Hassen, A., Converti, A., Sorlini, C., Daffonchio, D. (2006). *Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air*. Biodegradation, 17: 181-191.
- Borneman, J., Triplett, E.W. (1997). *Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and population shifts associated with deforestation*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2647-2653.
- Cai, Z., Kim, D., Sorial, G.A., Saikaly, P., Zein, M.M., Oerther, D.B. (2006). *Performance and microbial diversity of a trickle-bed air biofilter under interchanging contaminants*. Engineering in Life Sciences, 6(1): 37-42.
- Chung, Y.C. (2007). *Evaluation of gas removal and bacterial community diversity in a biofilter developed to treat composting exhaust gases*. Journal of Hazardous Materials, 144: 377-385.
- DeLong, E.F., Wickhan, G.S., Pace, N.R. (1989). *Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells*. Science, 243: 1360-1363.
- DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L. Preston, C.M. (1999). *Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescence in situ hybridization*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5554-5563.
- Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J. (1991). *Recent advances in the polymerase chain reaction*. Science, 252: 1643-1651.
- Fisher, M.M., Triplett, E.W. (1999). *Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities*. Applied and Environmental Microbiology, 65(10): 4630-4636.
- Friedrich, U., Prior, K., Altendorf, K., Lipski, A. (2002). *High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library*. Environmental Microbiology, 4(11): 721-734.
- Friedrich, U., Van Langenhove, H., Altendorf, K., Lipski, A. (2003). *Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16 RNAr-targeting oligonucleotide probes*. Environmental Microbiology, 5(3): 183-201.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. (1990). *Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton*. Nature, 345: 60-63.

- Hekmat, D., Feuchtinger, A., Stephan, M., Vortmeyer, D. (2003). *Microbial composition and structure of a multispecies biofilm from a trickle-bed reactor used for the removal of volatile aromatic hydrocarbons from a waste gas*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79: 13-21.
- Jianming, Y., Wei, L., Zhuowei, C., Yifeng, J., Wenji, C., Jianmeng, C. (2014). *Dichloromethane removal and microbial variations in a combination of UV pretreatment and biotrickling filtration*. Journal of Hazardous Materials 268: 14-22.
- Jubany, I., Lafuente, J., Carrera, J., Baeza, J.A. (2009). *Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy*. Journal Chemical Technology and Biotechnology, 84: 1140-1145.
- Juteau, P., Larocque, R., Rho, D., LeDuy, A. (1999). *Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter*. Applied Microbiology and Biotechnology, 52: 863-868.
- Khamar, N., Malhautier, L., Degrange, V., Lensi, R., Godon, J.-J., Fanlo, J.-L. (2005). *Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters*. Journal of Applied Microbiology, 98: 476-490.
- Kim, T.G., Jeong, S.-Y. Cho, K.-S. (2014). *Characterization of tobermorite as a bed material for selective growth of methanotrophs in biofiltration*. Journal of Biotechnology, 173: 90-97.
- Kristiansen, A., Pedersen, K. H., Nielsen, P.H., Nielsen, L.P., Nielsen, J.L., Schramm, A. (2011). *Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air*. Systematic and Applied Microbiology, 34: 344-352.
- Lessa, E.P., Applebaum, G. (1993). *Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences*. Molecular Ecology, 2: 119-129.
- Li, J., Ye, G., Sun, D., An, T., Sun, G., Liang, S. (2012). *Performance of a biotrickling filter in the removal of waste gases containing low concentrations of mixed VOCs from a paint and coating plant*. Biodegradation, 23(1): 177-187.
- Lin, C.-W., Lin, N.-C., Liu, M.-C. (2007). *Biodegradation kinetics and microbial communities associated with methyl tert-butyl ether removal in a biotrickling filter*. Chemical Engineering Journal, 127: 143-149.
- Liu, W., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L. (1997). *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4516-4522.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Gamsans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D. (2009). *Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools*. Water Sciences and Technology, 59: 1331-1337.

- Maestre, J.P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, J., Gamisans, X., Gabriel, D. (2010). *Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the RNAr approach*. Chemosphere, 80: 872-880.
- Mathur, A.K., Majumder, C.B., Chatterjee, S. (2007). *Combined removal of BTEX in air stream by using mixture of sugar cane bagasse, compost and GAC as biofilter media*. Journal of Hazardous Materials, 148: 64-74.
- Montebello, A., Bezerra, T., Rovira, R., Rago, L., Lafuente, J., Gamisans, X., Campoy, S., Baeza, M., Gabriel, D. (2013). *Operational aspects, pH transition and microbial shifts of a H₂S desulfurizing biotrickling filter with random packing material*. Chemosphere, 93: 2675-2682.
- Muyzer, G., Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for RNAr 16S*. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Antonie van Leeuwenhoek, 73: 127-141.
- Muyzer, G. (1999). *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology, 2: 317-322.
- Okunishi, S., Morita, Y., Higuchi, T., Maeda, H., Nishi, K. (2012). *Transformation of microflora during degradation of gaseous toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE*. Journal of the Air and Waste Management Association, 62(7): 748-757.
- Prenafeta-Boldú, F.X., 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 Microbiology Ecology, 80: 722-734.
- Portune, K., Pérez, M.C., Álvarez-Hornos, F.J., Gabaldón, C. (2015). *Investigating bacterial populations in styrene-degrading biofilters by 16S rDNA tag pyrosequencing*. Applied Microbiology and biotechnology, 99: 3-18.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlén, M., Nyren, P. (1996). *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. Analytical Biochemistry, 242: 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyren, P. (1998). *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science, 281: 363-365.
- Rothberg, J.M., Leamon, J.H. (2008). *The development and impact of 454 sequencing*. Nature Biotechnol, 26(10): 1117-1124.

- Rovira, R. (2012). *Caracterizació de l'operació i estudi metatranscriptòmic d'un bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya.
- Roy, S., Gendron, J., Delhoménie, M.-C., Bibeau, L., Heitz, M., Brzezinski, R. (2003) *Pseudomonas putida as the dominant toluene-degrading bacterial species during air decontamination by biofiltration*. Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 366-373.
- Rusell, J., Hu, Y., Chau, L., Pauliushchuk, M., Anastopoulos, I. (2014). *Indoor biofilter growth and exposure to airborne chemicals drive similar changes in the bacterial communities of plant roots*. Applied Environmental and Microbiology, 80: 4805-4813.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. Journal of Molecular Biology, 94: 441-448.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1978). *The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing*. Febs Letters, 87: 107-110.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. (1998). *A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis*. Applied Environmental and Microbiology, 64: 4870-4876.
- Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K. (1997). *Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis*. FEMS Microbiology Ecology, 23: 249-261.
- Steele, J.A., Ozis, F., Fuhrman, J.A., Devinny, J.S. (2005). *Structure of microbial communities in ethanol biofilters*. Chemical Engineering Journal, 113: 135-143.
- Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D., Schleifer, K. (1998). *Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds*. Applied and Environmental Microbiology, 64: 930-939.
- Tresse, O., Lorrain, M.-J., Rho, D. (2002). *Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 585-590.
- Wagner, M., Erhart, R., Marz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.H. (1994). *Development of a rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring of activated sludge*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 792-800.
- Woese, C.R. (1987). *Bacterial evolution*. Microbiology Reviews, 51: 221-271.
- Woese, C.R. (1990). *Towards a natural system of organisms proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 4576-4579.

Yang, L., Kent, A.D., Wang, X., Funka, T.L., Gates, R.S., Zhang, Y. (2014). *Moisture effects on gas-phase biofilter ammonia removal efficiency*. Journal of Hazardous Materials, 271: 292-301.

Zehraoui, A., Kapoor, V., Wendell, D., Sorial, G. A. (2014). *Impact of alternate use of methanol on n-hexane biofiltration and microbial community structure diversity*. Biochemical Engineering Journal, 85: 110-118.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo a fin de proporcionar una visión integrada de los materiales y los métodos detallados en cada uno de los artículos científicos que constituyen esta tesis doctoral, se incluye una descripción conjunta de los mismos. Para ello, se detallan los sistemas de biofiltración, las técnicas analíticas utilizadas para llevar a cabo el seguimiento de los biorreactores, y las técnicas de biología molecular que se han aplicado para el estudio de las comunidades bacterianas.

4.1. Sistemas de biofiltración

En el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se han utilizado dos tipos de biorreactores: biofiltros y biofiltros percoladores. El proceso de biofiltro se ha estudiado a nivel de laboratorio mientras que el proceso de biofiltro percolador se ha aplicado a nivel de laboratorio, planta piloto e industrial. Los distintos sistemas de biofiltración empleados se describen a continuación.

4.1.1. Biofiltros de laboratorio

Durante la experimentación en laboratorio sobre el tratamiento de aire contaminado con estireno (capítulo 6) se utilizaron dos biofiltros fabricados en metacrilato con una longitud de 97 cm y un diámetro interno de 13.6 cm (volumen de 14 L). El esquema del montaje experimental se presenta en la Figura 4.1. Cada biofiltro estaba equipado con cinco puertos para la toma de muestras gaseosas localizados a una distancia de 0 cm (puerto de entrada), 25, 50, 75 y 97 cm (puerto de salida) de la entrada del aire a depurar. Además, cada biofiltro disponía de cuatro puertos localizados a una distancia de 20, 40, 60 y 80 cm de la entrada de aire para la toma de muestras del material de relleno. En la parte superior de cada reactor se dispuso un espacio vacío de 10 cm de longitud con el fin de conseguir la correcta distribución del aire contaminado y de la disolución de nutrientes suministrada periódicamente. En la parte inferior también se situó un espacio de 10 cm para la salida del aire tratado y la recogida del lixiviado producido durante el funcionamiento del sistema. El aire utilizado en los experimentos provenía de un compresor. El aire comprimido se acondicionó mediante una etapa de filtración para eliminar partículas

y gotas de aceite seguida de una etapa de secado para eliminar la humedad. El caudal de aire se ajustó utilizando un controlador de flujo másico (Bronkhorst Hi-Tec, Países Bajos). El aire comprimido, filtrado y secado se humidificó previamente a la entrada de los biofiltros y, a continuación, se contaminó con estireno mediante una bomba de jeringa (modelo infusión/withdraw NE 1000, New Era Pumps Systems Inc., EEUU). El aire, una vez contaminado, se introdujo en los biofiltros por la parte superior de los mismos, siendo el flujo descendente. El aporte de nutrientes se realizó mediante la adición de una disolución con efecto tampón por la parte superior de los biofiltros con una dosis de 50 mL cada día. A su vez, junto con la adición de dicha disolución, se suministraron entre 50 y 150 mL de agua para la regulación del contenido en humedad del material de relleno.

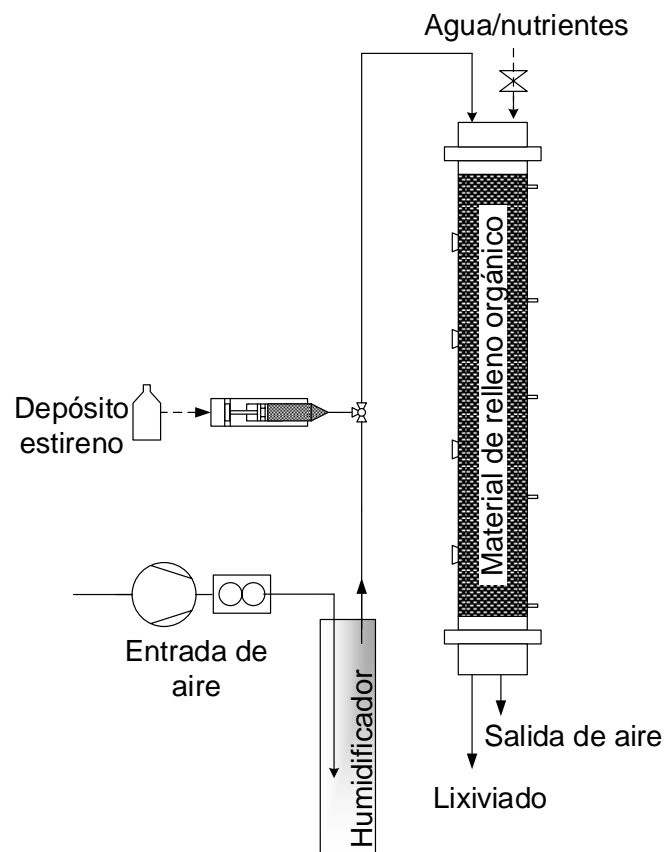


Figura 4.1. Esquema del montaje experimental de un biofiltro a escala de laboratorio.

4.1.2. Biofiltros percoladores de laboratorio

La experimentación de laboratorio para el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con isopropanol se llevó a cabo mediante dos biofiltros percoladores (capítulo 5). En el experimento de depuración de aire contaminado con estireno, además de los dos biofiltros explicados anteriormente, se utilizó un biofiltro percolador (capítulo 6). Estos biofiltros percoladores se fabricaron en metacrilato, con una longitud de 126 cm y un diámetro interno de 14.4 cm (volumen de 20 L). El esquema del montaje experimental se presenta en la Figura 4.2. Cada biofiltro percolador estaba equipado con cuatro puertos para la toma de muestras gaseosas, localizados a una distancia de 0 cm (puerto de entrada), 44, 86 y 123 cm (puerto de salida) de la entrada del aire a depurar. Además, cada biorreactor disponía de tres puertos localizados a una distancia de 20, 63 y 105 cm de la entrada de aire para la toma de muestras de biopelícula. En cada uno de los sistemas se utilizó un tanque de 10 L para contener la solución de recirculación que se introducía por la parte superior de cada reactor en contracorriente al flujo de aire mediante una bomba centrífuga (HPR 10/15, RS Amidata S.A., España). Además, se dispuso un espacio de 20 cm de longitud en la parte superior de cada reactor para la salida del aire tratado. En este espacio se situó un desnebulizador con el fin de separar las gotas de líquido arrastradas por la corriente gaseosa. En la parte inferior de cada reactor se dispuso un espacio vacío de 20 cm para la distribución del aire contaminado y la recogida de la solución de recirculación. El dispositivo se completó con un sistema de dosificación de nutrientes constituido por un tanque de almacenamiento y una bomba peristáltica. El aire comprimido, filtrado y secado se contaminó con el compuesto correspondiente utilizando una bomba de jeringa (modelo infusión/withdraw NE 1000, New Era Pumps Systems Inc., EEUU). El caudal de aire se ajustó mediante un controlador de flujo másico (Bronkhorst Hi-Tec, Países Bajos). La corriente de aire contaminada se introdujo en los biofiltros percoladores por la parte inferior de los mismos.

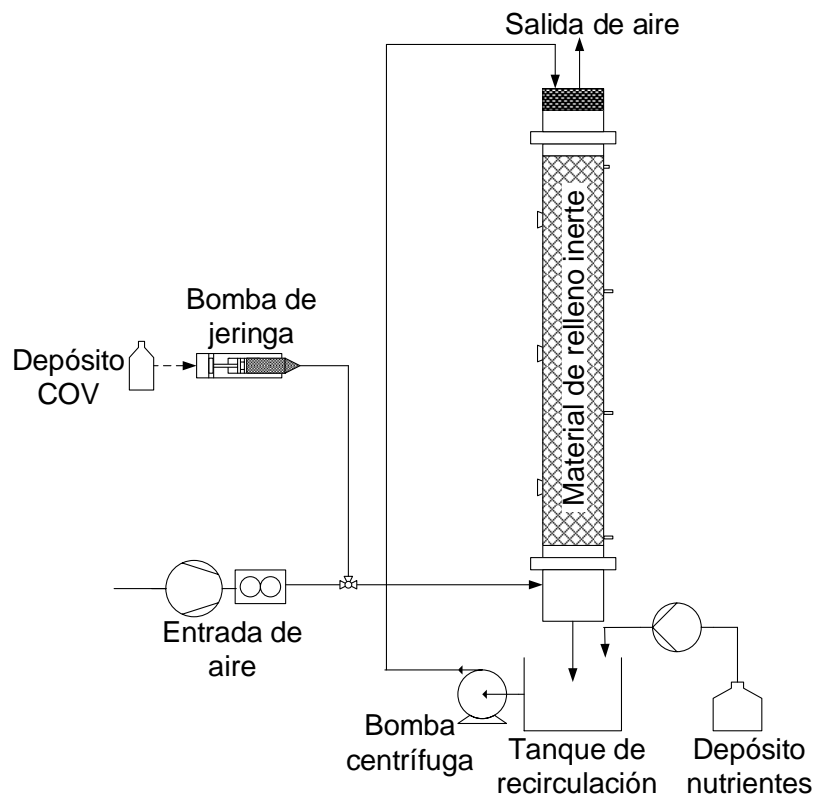


Figura 4.2. Esquema del montaje experimental de un biofiltro percolador a escala de laboratorio.

En el experimento sobre el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con 2-butoxietanol (capítulo 7) se utilizaron dos biofiltros percoladores. Inicialmente, se operó uno de estos biorreactores en la Universität Stuttgart y, a continuación, se operó el otro biorreactor en la Universitat de València. El biofiltro percolador empleado en la Universität Stuttgart se fabricó en PVC, con una longitud de 100 cm y un diámetro interno de 15 cm (volumen de 18 L). En la Figura 4.3a se muestra una fotografía del montaje experimental utilizado. El biofiltro percolador estaba equipado con dos puertos para la toma de muestras gaseosas localizados a una distancia de 0 cm (puerto de entrada) y 100 cm (puerto de salida) de la entrada del aire a depurar. Además, el biorreactor disponía de un puerto localizado a una distancia de 100 cm de la entrada de aire para la toma de muestras de biopelícula. En el sistema se utilizó un tanque de 15 L que contenía la solución de recirculación, ésta se introducía por la parte superior del reactor en contracorriente al flujo de aire mediante una bomba dosificadora de membrana (Vario HM15-PP, ProMinent GmbH, Alemania). Además, se dispuso un espacio de 20 cm de longitud en la parte superior del reactor

para la correcta salida del aire tratado y la entrada de la solución de recirculación. El aire comprimido, filtrado y secado se contaminó con 2-butoxietanol utilizando una bomba dosificadora de diafragma (STEPDOS[®] 03, KNF, Suiza). La corriente de aire contaminada se introdujo por la parte inferior del biorreactor.

El biofiltro percolador empleado en la Universitat de València se fabricó en PVC, con una longitud de 70 cm y un diámetro interno de 10.5 cm (volumen de 6 L). En la Figura 4.3b se muestra una fotografía del montaje experimental utilizado. El biofiltro percolador estaba equipado con cuatro puertos para la toma de muestras gaseosas, localizados a una distancia de 0 cm (puerto de entrada), 30, 50 y 70 cm (puerto de salida) de la entrada del aire a depurar. Estos mismos puertos se emplearon para la toma de muestras de biopelícula. En el sistema se utilizó un tanque de 5 L para contener la solución de recirculación, ésta se introducía por la parte superior del reactor en contracorriente al flujo de aire mediante una bomba dosificadora de membrana (Sigma/2, ProMinent Gugal S.A, España). Además, se dispuso un espacio libre de 8 cm de longitud en la parte superior del reactor para la salida del aire tratado donde se situó un desnebulizador. En la parte inferior se dispuso un espacio vacío de 8 cm para la distribución del aire contaminado y la recogida de la solución de recirculación. El dispositivo se completó con un sistema de dosificación de nutrientes constituido por un tanque de almacenamiento y una bomba peristáltica. El aire comprimido, filtrado y secado se contaminó con 2-butoxietanol utilizando una bomba de jeringa (modelo infusión/withdraw NE 1000, New Era Pumps Systems Inc., EEUU). El caudal de aire se ajustó mediante un controlador de flujo másico (Bronkhorst Hi-Tec, Países Bajos). La corriente de aire contaminada se introdujo en el biofiltro percolador por la parte inferior del mismo.



Figura 4.3. Fotografías de los montajes experimentales utilizados para el estudio de la eliminación de 2-butoxietanol. a) Universität Stuttgart b) Universitat de València.

La Tabla 4.1 resume las principales condiciones de operación de los distintos experimentos a escala de laboratorio. En los biofiltros percoladores que se emplearon para el tratamiento de isopropanol (capítulo 5) se utilizaron condiciones de alimentación intermitente de contaminante, es decir, las emisiones gaseosas se contaminaron durante 16 horas al día (desde las 6 a las 22 h) y 5 días a la semana (de lunes a viernes). Durante las horas que no se aportaba contaminante al sistema se mantenía el mismo caudal de aire que cuando sí era aportado. En el resto de experimentos de laboratorio se utilizó un patrón de alimentación de contaminante continuo (24 horas, 7 días a la semana). Durante los diferentes estudios realizados se trabajó con caudales de aire comprendidos entre 0.4 y 5 m³ h⁻¹ (TRVV de 12.5 a 160 segundos) y con una concentración de contaminante en la corriente de entrada con valores comprendidos entre 180 y 1700 mg Nm⁻³. La adición de los nutrientes a los biorreactores se efectuó con dosis comprendidas entre 7 y 200 mL cada día. En el caso de los biofiltros percoladores, la solución de recirculación se introdujo en los reactores con caudales comprendidos entre 1.6 y 3.25 L min⁻¹ (velocidades superficiales de 9-11 m h⁻¹) y utilizando diversas frecuencias de riego, desde 5 segundos por minuto hasta 15 minutos cada 2 horas. Respecto a la purga de la solución de recirculación, ésta se realizó semanalmente con un volumen que varió entre el 10 y el 50% de la cantidad total del tanque de recirculación.

Tabla 4.1. Condiciones de operación de los experimentos a escala de laboratorio.

Compuesto	Isopropanol		Estireno			2-butoxietanol	
	BTF1	BTF2	BF1	BF2	BTF	BTF1	BTF2
Sistema	BTF1	BTF2	BF1	BF2	BTF	BTF1	BTF2
Volumen, L	20	20	14	14	20	18	6
Material de relleno	Plástico estructurado	Anillos PP	Turba	Fibra coco	Anillos PP	Espuma de poliuretano	
Q_G , $m^3 h^{-1}$	0.4-4		0.4-1.1		1.2-2.4	5	1.7
TRVV, s	14-160		45-120		30-60	12.5	
Alimentación COV	Intermitente		Continuo			Continuo	
C_e , $mg Nm^{-3}$	425-1700		275-1125		180-475	450-680	
Q_L , $L min^{-1}$	2.7		-		2.5-3	3.25	1.6
v_L , $m h^{-1}$	10		-		9-11	11	11
Frecuencia riego	15 min/1.5 h		-		15 min/2 h	5 s/min	1min/12 min 1 min/2 h
Adición nutrientes, $mL día^{-1}$	30-200		50		32-160	7-10	20

BTF: biofiltro percolador; BF: biofiltro; TRVV: tiempo de residencia a volumen vacío; PP: polipropileno; Q_G : caudal de gas; Q_L : caudal de recirculación; v_L : velocidad superficial de líquido; C_e : concentración de entrada de contaminante.

4.1.3. Planta piloto de biofiltro percolador

La planta piloto basada en la tecnología VOCUS® (Pure Air Solutions B.V., Países Bajos) se construyó en un contenedor de transporte y se instaló en la empresa FICOMIRROR S.A. (Ficosa Grupo Internacional) de fabricación y pintado de componentes de automóvil ubicada en Soria (Figura 4.4) con el objetivo de determinar la viabilidad del proceso de biofiltro percolador para el control de sus emisiones al aire. Las emisiones gaseosas resultantes de esta actividad industrial presentaron una concentración variable de una mezcla de COV comprendida entre 100 y 450 $mg C Nm^{-3}$. La corriente de aire se introducía al biorreactor de modo ininterrumpido (24 horas al día, 7 días a la semana) con caudales comprendidos entre 29 y 90 $m^3 h^{-1}$ (TRVV: 30 - 93 s). La contaminación de las emisiones dependía del patrón de producción de la actividad industrial que comprendía desde las 6:00 am del lunes a las 6:00 am del sábado.



Figura 4.4. Fotografía del exterior de la planta piloto de biofiltro percolador (VOCUS®). Cortesía de FICOMIRROR S.A.

El esquema del sistema se presenta en la Figura 4.5. El reactor biológico consistió en una columna de 0.75 m³ de volumen efectivo, el cual se llenó con anillos de polipropileno Flexiring™ (Koch-Glistch BVBA, Bélgica) de 50 mm de diámetro nominal.

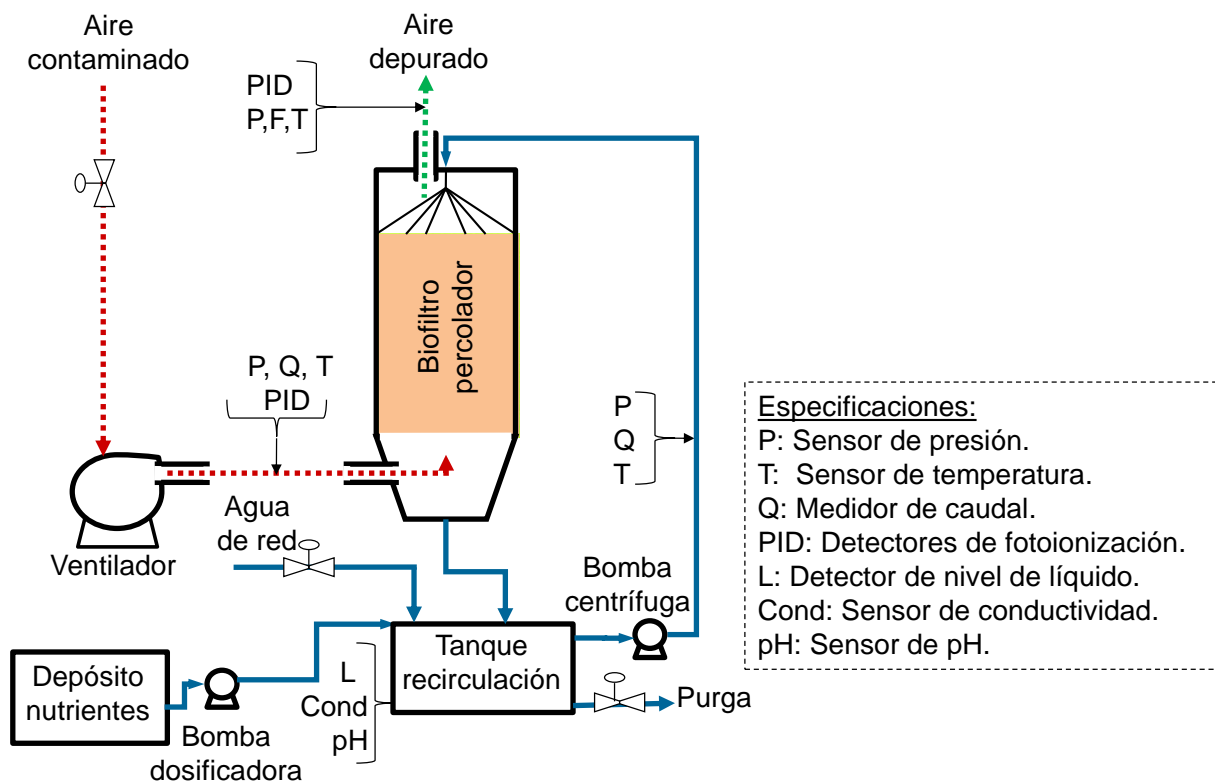


Figura 4.5. Esquema del biofiltro percolador a escala de planta piloto. Adaptada de Martínez-Soria y col. (2009).

El aire contaminado se introdujo por la parte inferior del reactor mediante un ventilador (APE 401/A, Euroventilatori International, Italia) equipado con un variador de frecuencia (CIMR, yaskawa Electric Corporation, EEUU) que permitió el control del caudal de aire. El sistema contaba con un depósito cilíndrico de 400 L donde se almacenaba la solución de recirculación, ésta se introducía en contracorriente por la parte superior del reactor mediante una bomba centrífuga (modelo CEA(M) 70/3, Lowara, Italia) con un caudal de $1.2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ y una frecuencia de 20 min h^{-1} . La solución de recirculación se sustituía completamente una vez al mes por agua limpia. Además, la planta piloto constaba de un sistema de dosificación de nutrientes, formado por un depósito de 100 L y una bomba dosificadora.

El sistema estaba equipado con un controlador de lógica programable y un conjunto de sensores y dispositivos para el control de los parámetros de operación a través de la comunicación por módem. La planta disponía de sensores de pH (modelo Orbisint CPS11, Endress+Hausser, Suiza), conductividad (InduMaxP CLS50, Endress+Hausser, Suiza), temperatura (modelo TR11, Endress+Hausser, Suiza), nivel de líquido (Liquiphant, Endress+Hausser, Suiza), presión (Deltabar S PMD70, Endress+Hausser, Suiza), así como medidores de caudal de aire (Proline t-mass 65, Suiza) y de agua (Proline Promag 10, Endress+Hausser, Suiza). La instrumentación se completaba con dos detectores de fotoionización (TVOC, Ion Science Ltd., Reino Unido) para la medida continua de la concentración de COV en el aire de entrada y de salida al biofiltro percolador.

Los detectores de fotoionización se comprobaron periódicamente mediante un analizador de hidrocarburos totales equipado con un detector de ionización de llama y una bomba para la succión de los gases (Nira Mercury model 901, Spirax Sarco, España). Este equipo se calibró periódicamente utilizando una bala patrón (Carburos Metálicos, España) de mezcla sintética estándar de propano ($1473 \text{ mg C Nm}^{-3}$) en nitrógeno gas. La identificación y la cuantificación de los principales contaminantes presentes en las emisiones se llevaron a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los análisis se efectuaron con un cromatógrafo de gases (modelo 6890N, Agilent Technologies, EE.UU) equipado con una válvula automática de inyección de gases, un detector de llama de ionización y

una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.26 μm). El gas portador fue helio con un caudal de $4.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. La temperatura en el inyector fue de $250 \text{ }^\circ\text{C}$. La temperatura en el horno se fijó inicialmente en $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos, a continuación, se elevó hasta $180 \text{ }^\circ\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de 3°C min^{-1} y, por último, se incrementó hasta $300 \text{ }^\circ\text{C}$ manteniéndose esta temperatura durante 20 minutos hasta el enfriamiento a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. La identificación de cada compuesto se realizó comparando los patrones de fragmentación con los espectros de masas disponibles en las bases de datos.

4.1.4. Unidad industrial de biofiltro percolador

El grupo de investigación GI²AM (Grupo de Investigación en Ingeniería Ambiental) de la Universitat de València, en el que se ha llevado a cabo el desarrollo de la presente tesis doctoral, colabora con la empresa holandesa Pure Air Solutions en la transferencia de tecnología para la depuración de emisiones gaseosas mediante biofiltro percolador. Fruto de esta colaboración, y tras un pilotaje previo (Martínez-Soria y col., 2009), se procedió a la instalación del biofiltro percolador VOCUS[®] (Pure Air Solutions B.V., Países Bajos) en la empresa GAMADDECOR S.A. del Grupo Porcelanosa (Figura 4.6) de fabricación de muebles de madera ubicada en Villareal (Castellón). Esta unidad industrial se diseñó como solución final de depuración de las emisiones gaseosas producidas. Las emisiones gaseosas resultantes presentaron una concentración de mezclas de COV comprendida entre 120 y 600 mg C Nm^{-3} . Estas emisiones se caracterizaron por patrones irregulares y oscilantes, con picos de concentración relativamente elevados (hasta 500 y 600 mg C Nm^{-3}) y de duración normalmente inferior a 60 segundos. La corriente de aire se introducía al biorreactor de modo ininterrumpido (24 horas al día, 7 días a la semana) con caudales comprendidos entre $2000 \text{ y } 12000 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (TRVV: 20 - 100 s). La contaminación de las emisiones dependía del patrón de producción de la actividad industrial que se producía desde las 7:00 am a las 9:00 pm, acorde al nivel de producción y al foco origen de las emisiones.



Figura 4.6. Fotografía del exterior de la planta industrial (VOCUS®). Cortesía de GAMADDECOR S.A. (Grupo Porcelanosa).

El reactor biológico de 60 m^3 de volumen efectivo se llenó con anillos plásticos de superficie específica superior a $110 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ y de porosidad superior al 90%. El sistema se completó con un prefiltro de carbón activado (Karb modelo 9D 460 kg de coral, Italia), al que se introducía el aire a depurar previamente a que éste pasara al biofiltro percolador, a fin de amortiguar la variación de la concentración de COV en las emisiones a depurar. La solución de recirculación se suministraba al reactor por la parte superior con un caudal de $10 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ y una frecuencia de 15 min h^{-1} . Entre un 60 y 70% del total de la solución de recirculación se sustituyó por agua limpia dos veces al mes.

La concentración de COV en el aire de entrada y salida al biofiltro percolador se midió con un analizador de hidrocarburos totales (RS 55-T, Ratfich Analysensysteme GmbH, Alemania) que se comprobó y calibró una vez al mes mediante una bala patrón (Carburos Metálicos, España) de mezcla sintética estándar de propano (300 ppm) en nitrógeno gas. La identificación de los principales contaminantes presentes en las emisiones se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (5973N MS/GC, Agilent Technologies, España) y la composición se determinó mediante un cromatografo de gases (modelo 7890, Agilent Technologies, EEUU). Este biofiltro percolador

actualmente sigue en funcionamiento como la solución de depuración de las emisiones gaseosas de la empresa GAMADDECOR S.A. (Grupo Porcelanosa).

4.2. Materiales

4.2.1. Materiales de relleno

Las principales propiedades de los materiales de relleno que se utilizaron en los diferentes biorreactores se especifican en la Tabla 4.2 y en la Tabla 4.3. La Tabla 4.2 presenta las propiedades físicas y químicas de los materiales orgánicos de los biofiltros que se operaron en el estudio del tratamiento de estireno (capítulo 6), que fueron turba y fibra de coco. La Tabla 4.3 muestra las propiedades físicas de los materiales de relleno inertes empleados en los biofiltros percoladores. Se utilizaron tres tipos de rellenos: anillos de polipropileno de diferentes tamaños, relleno plástico estructurado y espuma de poliuretano. La Tabla 4.3 indica en que biofiltro percolador se utilizó cada uno de los rellenos. A nivel ilustrativo, en la Figura 4.7 se presentan imágenes de algunos de estos materiales.

Tabla 4.2. Propiedades físicas y químicas de los rellenos orgánicos utilizados en los biofiltros.

	Turba	Fibra de coco
pH	4.8	6.8
Capacidad de retención de agua, %	88.0	60.0
Densidad, Kg m ⁻³	133.0	60.0
Contenido en materia orgánica, %	95.0	93.8
Área superficial específica BET, m ² g ⁻¹	13.4	0.9
<i>Análisis químico:</i>		
Carbono, %	48.5	47.8
Hidrógeno, %	5.8	5.8
Oxígeno, %	40.0	42.8
Nitrógeno, %	0.6	0.1
Azufre, %	0.1	0.0

Tabla 4.3. Propiedades físicas de los rellenos inertes utilizados en los biofiltros percoladores.

	Anillos de polipropileno				Relleno estructurado	Espuma de poliuretano
	16	25	50	-		
Tamaño, mm	16	25	50	-	-	-
Densidad, Kg m ⁻³	95	71	60	-	-	23
Porosidad, %	87	92	93	>90	-	96
Sup. Esp., m ² m ⁻³	341	207	110	>110	410	400
Aplicación	Laboratorio	Laboratorio	Piloto	Industrial	Laboratorio	Laboratorio
Contaminante	Isopropanol	Estireno	Mezcla COV		Isopropanol	2-butoxietanol

Sup. Esp: superficie específica.

**Figura 4.7.** Detalle de diferentes materiales de relleno utilizados. Rellenos orgánicos: a) Turba fibrosa; b) Fibra de coco. Rellenos inertes: anillos de polipropileno: c) 16 mm; d) 25 mm.

4.2.2. Compuestos

Los contaminantes utilizados durante la experimentación de laboratorio se seleccionaron entre los compuestos representativos de las emisiones de varios sectores industriales con potencial de aplicación de las tecnologías de biofiltración. Los experimentos en laboratorio se han centrado en el tratamiento de emisiones gaseosas que contenían un único contaminante. Se realizaron tres estudios experimentales cada uno de ellos con uno de los siguientes compuestos: isopropanol, estireno y 2-butoxietanol. El isopropanol se trata de un compuesto habitual en las emisiones procedentes de la industria flexográfica (capítulo 5). Las concentraciones de isopropanol en las emisiones a depurar oscilaron entre 250 y 1000 mg C Nm⁻³. El estireno es un contaminante representativo de las emisiones de

la industria del procesamiento y de la síntesis de polímeros (capítulo 6). Las emisiones de entrada a los sistemas de biotratamiento presentaron concentraciones de estireno entre 200 y 1125 mg Nm⁻³. Por último, el 2-butoxietanol es un compuesto ampliamente usado como disolvente en el sector del recubrimiento y de la limpieza de superficies (capítulo 7). Las concentraciones tratadas de este compuesto oscilaron entre 450 y 680 mg Nm⁻³. La Tabla 4.4 presenta las propiedades físicas de estos compuestos.

Tabla 4.4. Propiedades físicas de los contaminados estudiados a escala de laboratorio.

Propiedad	Isopropanol	Estireno	2-butoxietanol
Formula química	C ₃ H ₈ O	C ₈ H ₈	C ₆ H ₁₄ O ₂
Numero CAS	67-63-0	100-42-5	11-72-2
Peso molecular, g mol ⁻¹	60.1	104.14	118.17
Punto de ebullición, °C ^(a)	82.5	145	171
Densidad relativa del líquido ^(b)	0.785	0.903	0.902
Presión de vapor a 20 °C, Pa	318	317·10 ⁵	100
Cte. de Henry a 25 °C, atm m ³ mol ⁻¹	8.1·10 ⁻⁶	2.75·10 ⁻³	1.6·10 ⁻⁶
Punto de inflamación	11.7	31	61
Temperatura de autoignición, °C	455	490	238
Límites de explosividad, % vol	2-12	0.9-6.8	1.1-12.7

^(a) para 1atm

^(b) a 20 °C y referida al agua a 4 °C

De las propiedades físicas mostradas en la Tabla 4.4 se puede destacar que el 2-butoxietanol y el isopropanol son compuestos de alta solubilidad en agua (constante de Henry de 8.1·10⁻⁶ y 1.6·10⁻⁶ atm m³ mol⁻¹, respectivamente), mientras que el estireno presenta baja solubilidad (constante de Henry de 2.75·10⁻³ atm m³ mol⁻¹).

En cuanto a los ensayos realizados en planta piloto (capítulo 8), las emisiones procedían de una instalación industrial del sector de recubrimiento de superficies plásticas, compuestas por una mezcla de disolventes de diversa naturaleza química atendiendo al foco de emisión y al tipo de producto aplicado. Las emisiones procedían de dos focos (pintado y barnizado) en los que se aplicaron diferentes productos de recubrimiento. Estos productos estuvieron principalmente compuestos por disolventes fácilmente biodegradables como el acetato de n-butilo o el acetato de butil glicol, aunque también presentaron en menor proporción compuestos menos biodegradables como el xileno o el trimetilbenceno. Sin embargo, uno de los

productos (etiquetado como “C”) presentó una composición basada mayoritariamente en compuestos aromáticos, como el xileno o el etilbenceno, y compuestos recalcitrantes, como el naftaleno y cumeno, resultando emisiones gaseosas de difícil biodegradabilidad. La concentración de COV en las emisiones osciló entre 100 y 450 mg C Nm⁻³.

Las emisiones de entrada a la unidad industrial de biofiltro percolador (capítulo 9) procedían de dos focos de producción de una industria del sector de recubrimiento de la madera. En uno de ellos (“foco A”), las emisiones presentaron una composición química compleja formada por una gran variedad de compuestos tanto oxigenados como aromáticos, tales como el tolueno, xileno, acetato de n-butilo, etilbenceno, etanol, acetona, isopropanol, etc. Las emisiones procedentes del otro foco (“foco B”) estuvieron constituidas principalmente por acetona, tolueno y acetato de n-butilo. Las concentraciones de COV oscilaron entre 120 y 600 mg C Nm⁻³.

4.2.3. Disoluciones de nutrientes

El aporte de nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano se realizó mediante soluciones concentradas que se ajustaron a un pH de 7. La adición de nutrientes en el caso de los biofiltros se realizó por la parte superior de los mismos lo que a su vez sirvió para regular el contenido de humedad. En el caso de los biofiltros percoladores, los nutrientes se adicionaron al tanque de recirculación mediante un sistema de dosificación con el fin de mantener una concentración de nitrógeno en el tanque como mínimo de 10 mg N L⁻¹.

A lo largo del desarrollo experimental de esta tesis doctoral se han utilizado diferentes formulaciones de nutrientes, las cuales se presentan a continuación en las Tabla 4.5, Tabla 4.6, Tabla 4.7 y Tabla 4.8. La Tabla 4.5 presenta la formulación química de la disolución de nutrientes que se suministró a los biofiltros percoladores a escala de laboratorio operados para el tratamiento de isopropanol (capítulo 5). En este caso, la fuente de nitrógeno se proporcionó a partir de nitrato potásico y la fuente de fósforo a partir de fosfato trisódico. La formulación química de la solución de nutrientes que se utilizó en la experimentación sobre el tratamiento de estireno

mediante biofiltros se presenta en la Tabla 4.6 (capítulo 6). Esta disolución contenía nitrato potásico como fuente de nitrógeno y una mezcla de fosfato monobásico y difásico para suministrar fósforo y para amortiguar el pH de la disolución. La Tabla 4.7 incluye la formulación química de la solución de nutrientes adicionada al biofiltro percolador empleado para el estudio de la eliminación de estireno que se describe en el capítulo 6. Esta disolución contenía amonio como fuente de nitrógeno el cual se proporcionó a través de cloruro de amonio y de amonio fosfato difásico, este último compuesto, a su vez fue la fuente de fósforo. Esta misma disolución se adicionó en el biofiltro percolador utilizado en la Universitat de València para la eliminación de 2-butoxietanol (capítulo 7). En el caso del biofiltro percolador operado en la Universität Stuttgart (Alemania) para el estudio de la eliminación de 2-butoxietanol se utilizó una disolución comercial de nutrientes usada comúnmente como fertilizante para plantas (capítulo 7). Esta disolución se basaba en una fuente de nitrógeno proporcionado como nitrato (2.3%), amonio (1.5%) y urea (3.2%), una fuente de fósforo en forma de óxido de fósforo (3%) y una fuente de potasio como óxido de potasio (5%).

En el biofiltro percolador a escala de planta piloto (capítulo 8) se suministró una solución de nutrientes basada en urea como fuente de nitrógeno. La composición completa se presenta en la Tabla 4.8. En el biofiltro percolador a escala industrial (capítulo 9) se adicionó una solución de nutrientes basada principalmente en amonio (50 g N L^{-1}) y fosfato (10 g P L^{-1}) y que fue suministrada por la empresa Pure Air Solution (Países Bajos).

Tabla 4.5. Composición de la disolución de nutrientes suministrada a los biofiltros percoladores para el tratamiento de isopropanol.

Compuesto	Concentración, g L⁻¹		
KNO ₃	21.7		
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	4.6		
Compuestos traza	Concentración, µg L⁻¹	Vitaminas	Concentración, µg L⁻¹
Ca	12000	Betacaroteno	20
Fe	1500	B1	70
Mg	2650	B2	70
Zn	605	B6	95
Co	60	B9	10
Mo	60	B12	0.1
Ni	55	C	3
Cu	50	D	0.3
B	45	E	500
Mn	40	Biotina	2
I	8	Niacina	900
Se	3		
Cr	1		

Tabla 4.6. Composición de la disolución de nutrientes suministrada a los biofiltros para el tratamiento de estireno.

Compuesto	Concentración, g L⁻¹		
KNO ₃	22.4		
KH ₂ PO ₄	2.4		
K ₂ HPO ₄	0.4		
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.9		
Compuestos traza	Concentración, µg L⁻¹	Vitaminas	Concentración, µg L⁻¹
Ca	12000	Betacaroteno	20
Fe	1500	B1	70
Mg	2650	B2	70
Zn	605	B6	95
Co	60	B9	10
Mo	60	B12	0.1
Ni	55	C	3
Cu	50	D	0.3
B	45	E	500
Mn	40	Biotina	2
I	8	Niacina	900
Se	3		
Cr	1		

Tabla 4.7. Composición de la disolución de nutrientes suministrada a los biofiltros percoladores de la Universitat de València alimentados con estireno y 2-butoxietanol.

Compuesto	Concentración, g L⁻¹	Vitaminas	Concentración, µg L⁻¹
NH ₄ Cl	9.7	A	40.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.9	C	3000.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.2	D	0.2
NaHCO ₃	0.5	E	500.0
NaOH	0.4	K	1.3
KCl	0.6	B1	70.0
Micronutrientes	Concentración, mg L⁻¹	B2	80.0
CaCl ₂	12.7	niacina	900.0
Fe ₂ (SO ₄) ₃	4.8	B6	100.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	B9	10.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2	B12	0.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	Biotina	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1	B5	300.0
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.24	Ca	600.0
H ₃ BO ₃	0.2	Mg	4000.0
		Fe	700.0
		Cu	45.0
		I	3.8
		Zn	400.0
		Mn	90.0
		K	1160.0
		Se	2.5
		Cr	1.3
		Mo	2.3
		Cl	1075.0
		coenzima Q10	150.0

Tabla 4.8. Composición de la disolución de nutrientes suministrada al biofiltro percolador a escala de planta piloto.

Compuesto	Concentración, g L⁻¹
Urea	6.5
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	7.4
CaCl ₂	12.7
Fe ₂ (SO ₄) ₃	4.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.1
H ₃ BO ₃	0.2

4.2.4. Inóculos

En la puesta en marcha de los biorreactores que se operaron durante el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se emplearon diversos tipos de inóculos. Por una parte, se desarrollaron dos cultivos puros con las cepas *Pseudomonas putida* CECT 324 y *Pseudomonas* sp. BOE200 en nuestro laboratorio. Estas cepas se seleccionaron debido a la capacidad de la especie *Pseudomonas* para degradar diversos tipos de compuestos orgánicos. El cultivo de la cepa *Pseudomonas putida* CECT 324 se empleó en la inoculación de los biofiltros estudiados para el tratamiento de estireno (capítulo 6). El cultivo de la cepa *Pseudomonas* sp. BOE200 se utilizó como inóculo en el biofiltro percolador operado en la Universität Stuttgart para el tratamiento de 2-butoxietanol (capítulo 7). El resto de biorreactores, tanto a escala de laboratorio como industrial, se inocularon mediante un procedimiento simple y económico basado en la adición de fango activado procedente de una estación de depuración de aguas residuales urbana (EDAR) sin ningún tipo de adaptación previa a los contaminantes a degradar.

- **Cultivos puros**

La cepa *Pseudomonas putida* CECT 324 se adquirió de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Esta cepa se cultivó en frascos estériles de 50 mL que contenían 20 mL de medio de cultivo *Nutrient Broth* (NB) con un pH de 7 y cuya composición se detalla en la Tabla 4.9. Los frascos se incubaron a 30 °C en un agitador orbital a 100 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, EEUU). Después de una semana, se introdujeron 250 mL del cultivo puro concentrado en un reactor discontinuo aireado en el que se adicionaron 750 mL de medio de cultivo NB.

Tabla 4.9. Composición del medio de cultivo *Nutrient Broth* (NB).

Compuesto	Concentración, g L ⁻¹
Extracto de carne	1
Extracto de levadura	2
Peptona	5
NaCl	5

El reactor discontinuo se aireó usando aire no estéril y se alimentó continuamente con estireno con un caudal de 0.15 mL h^{-1} utilizando una bomba de jeringa (modelo infusión/withdraw NE 1000, New Era Pumps Systems Inc., EEUU). Después de 30 días, los biofiltros se inocularon mediante 1 L de este cultivo que presentó una concentración de sólidos suspendidos de 1.7 g L^{-1} y un porcentaje de sólidos suspendidos volátiles del 71%.

La cepa *Pseudomonas* sp. BOE200 fue suministrada por Christine Woiski del Instituto de ingeniería sanitaria, calidad del agua y gestión de los residuos sólidos (ISWA) de la Universität Stuttgart (Alemania). Esta cepa se aisló de una muestra de biomasa procedente de un biorreactor a escala industrial operado para el tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con 2-butoxietanol. La cepa se cultivó en matraces cónicos de 100 mL utilizando *Medio Mineral* (MM) con un pH de 7.1 y cuya composición se presenta en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Composición del medio de cultivo *Medio Mineral* (MM).

Compuesto	Concentración, g L^{-1}
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.50
KH_2PO_4	1.00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{FeH}_4\text{N}$	0.01
<i>Compuestos traza:</i>	
H_3BO_3	$0.30 \cdot 10^{-3}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.20 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0.10 \cdot 10^{-3}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.03 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.03 \cdot 10^{-3}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.02 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.01 \cdot 10^{-3}$

En el cultivo de MM se utilizó 2-butoxietanol (5 mmol L^{-1}) como fuente de carbono. Después de 7 días la cepa mostró un crecimiento significativo y se transfirieron 25 mL del cultivo a nuevos matraces con 100 mL de MM repitiendo este proceso hasta la obtención de 1 L de cultivo puro con el que se inoculó el biofiltro percolador. El inóculo alcanzó una concentración de sólidos suspendidos de 2.8 g L^{-1} y un porcentaje de sólidos suspendidos volátiles de 81%.

- **Fango activado**

Cada uno de los fangos activados empleados en los distintos experimentos procedió de una EDAR diferente. Tal y como se observa en la Tabla 4.11 cada muestra de fango activado se adquirió el día anterior a la puesta en marcha de cada sistema. Para la inoculación de los biofiltros percoladores a escala de laboratorio se utilizó entre 0.5 y 1 L de fango activado. En los biofiltros percoladores a escala industrial se adicionó una cantidad de fango activado superior a 100 L. En todos los ensayos el fango activado, sin adaptación previa al contaminante, se adicionó en el tanque de recirculación de los biorreactores y se recirculó de modo continuo entre 24 y 72 horas para fomentar la adhesión de la biomasa al material de relleno. La concentración de sólidos suspendidos de los fangos activados empleados en los distintos experimentos osciló en valores comprendidos entre 3 y 7 g L⁻¹ y el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles presentó valores comprendidos entre 70 y 85%.

Tabla 4.11. Fangos activados utilizados, fecha de adquisición, EDAR municipal de procedencia y aplicación.

Fecha	EDAR de procedencia	Aplicación
14/02/2010	Carlet, Valencia	Laboratorio/Isopropanol (capítulo 5)
12/11/2012	Quart-Benager, Valencia	Laboratorio/Estireno (capítulo 6)
20/02/2014	Paterna, Valencia	Laboratorio/2-butoxietanol (capítulo 7)
29/10/2010	Soria	Piloto/Mezcla de COV (capítulo 8)
30/06/2010	Villareal, Castellón	Industrial/Mezcla de COV (capítulo 9)

4.3. Técnicas analíticas para el control y el seguimiento de los biorreactores

4.3.1. Concentración de COV

En el laboratorio de la Universitat de València la concentración de COV en el aire de entrada y salida a los biorreactores se midió diariamente con un analizador de hidrocarburos totales (Nira Mercury model 901, Spirax Sarco, España) equipado con un detector de ionización de llama y una bomba para la succión de los gases. Este equipo se calibró periódicamente utilizando una bala patrón (Carburos Metálicos, España) de mezcla sintética estándar de propano en nitrógeno gas (99.9% nitrógeno, 0.1% propano) realizando diluciones con aire para obtener un

intervalo de concentraciones adecuado a las condiciones de trabajo entre 10 y 1000 mg C Nm⁻³. Para la medición del factor de respuesta del analizador de hidrocarburos totales se empleó un cromatógrafo de gases (modelo 7890, Agilent Technologies, EE.UU) equipado con un sistema automático de válvula de inyección, un detector de llama de ionización y una columna capilar Rtx[®]-VMS (30 m x 0.25 mm x 1.4 μm). El gas portador fue helio a un caudal de 1.3 mL min⁻¹ y las condiciones cromatográficas de análisis fueron: 250 °C en el puerto de inyección, 100 °C en el horno y 240 °C en el detector. El equipo se conectó a un ordenador y se utilizó un software para registrar y almacenar los datos.

En el laboratorio de la Universität Stuttgart la concentración de COV en el aire de entrada y salida en el biofiltro percolador se midió diariamente con un detector de ionización de llama (Multi-FID 100, Hartmann & Braun, Alemania).

4.3.2. Pérdida de carga

La pérdida de carga de los biorreactores de laboratorio se midió con manómetros electrónicos (modelos Kimo, MP101, España y AMSYS, Alemania) con un intervalo de medida comprendido entre 0 y 1000 ppm de columna de agua.

4.3.3. Dióxido de carbono (CO₂)

En el laboratorio de la Universitat de València las concentraciones de CO₂ en la corriente de aire de entrada y salida a los biorreactores se midieron con un analizador de dióxido de carbono (CARBOCAP[®] modelo GM70, Vaisala; E+E Elektronik, Austria) con un rango de medida entre 0 y 3000 ppmv. En el laboratorio de la Universität Stuttgart, se empleó un analizador (CO₂ transmitter, E+E Elektronik, Austria) con un intervalo de medida entre 0 y 2000 ppmv.

4.3.4. pH, conductividad y temperatura

En el laboratorio de la Universitat de València los parámetros de pH, conductividad y temperatura de los biorreactores se analizaron con un medidor

multiparamétrico (pH/cond 340i, WTW, Alemania). En el caso de los biofiltros estos parámetros se monitorizaron en el lixiviado recogido semanalmente, mientras que en el caso de los biofiltros percoladores se midieron diariamente en la solución de recirculación. En el laboratorio de la Universität Stuttgart se controló diariamente el pH en la solución de recirculación del biofiltro percolador mediante un pHmetro (pH Checker, HANNA, Alemania).

4.3.5. Nutrientes

La concentración de nutrientes se analizó en muestras tomadas de la solución de recirculación de los biofiltros percoladores mediante un cromatógrafo iónico (Ionic Chromatograph 883 Basic IC Plus, Metrohm, Suiza) y mediante kits comerciales fotométricos para la medida de nitrato, amonio y fosfato (114773, 114752 y 114842, Spectroquant[®], Merck KGaA, Alemania).

4.3.6. Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno soluble se analizó empleando un kit comercial fotométrico (114540 Spectroquant[®], Merck KGaA, Alemania).

4.3.7. Carbono orgánico total y carbono inorgánico

La concentración de carbono orgánico total y de carbono inorgánico se midió en muestras procedentes de la solución de recirculación de los biofiltros percoladores utilizando equipos específicos para muestras líquidas (TOC-VCHS, Shimadzu, Japón; Sievers 900, GE analytical Instruments, Alemania y Sievers 900, GE analytical Instruments, Alemania).

4.3.8. Sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles fueron determinados de acuerdo con los métodos 2540 D y 2540 E, respectivamente, según el Standard

Methods (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 1998).

4.3.9. Contenido de humedad de los rellenos orgánicos

El contenido de humedad, en el caso de los rellenos orgánicos que se utilizaron en los biofiltros, se analizó mediante gravimetría por secado.

4.4. Técnicas de biología molecular para la caracterización y el seguimiento de la comunidad bacteriana

El análisis de la comunidad bacteriana se llevó a cabo mediante las técnicas de biología molecular: hibridación fluorescente in situ (FISH), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación del gen 16S ARNr. Estas técnicas se utilizaron para el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas a lo largo del periodo experimental, así como para la identificación de especies presentes en los biorreactores.

4.4.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

La técnica FISH permitió realizar el seguimiento y la cuantificación de los principales grupos y especies de bacterias presentes en los sistemas de biotratamiento de emisiones gaseosas. Esta técnica se aplicó en biorreactores a escala de laboratorio (capítulos 5 y 6) y en los biorreactores a escala piloto e industrial (capítulos 8 y 9). Con el objetivo de emplear la técnica FISH para el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas se tomaron muestras de biopelícula a lo largo del periodo operacional y a diferentes alturas de los biorreactores.

La técnica FISH se basa en la unión de sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos a una región complementaria del ARN 16S de los microorganismos que se pretenden identificar, por ello, para la aplicación de la técnica se utilizó una sonda general de bacterias (EUBmix) marcada con el fluorocromo Cy5 y otras sondas específicas marcadas con el fluorocromo Cy3 (Thermo Fisher Scientific). Las

sondas utilizadas se detallan en la Tabla 4.12. Como se observa en la Tabla 4.12 la sonda general de bacterias consiste en una mezcla de tres sondas EUB338, EUB338-II y EUB338-III. Además existen sondas denominadas competidoras que no van marcadas con fluorocromo. Particularmente, las sondas BET42a, GAM42A, DELTA495A,B,C y HGC96A se usan con sus respectivas sondas competidoras que no emiten señal pero impiden que las sondas marcadas se fijen en un lugar no específico lo que ocasionaría una falsa identificación. En el caso del grupo *Deltaproteobacteria*, se utiliza una mezcla de tres sondas (DELTA495A, DELTA495B y DELTA495C) denominada DELTA495mix, al igual que ocurre en el caso del grupo *Firmicutes*, que se utiliza una mezcla denominada LGCmix resultante de la mezcla de tres sondas (LGC345A, LGC345B Y LGC345C).

Tabla 4.12. Sondas de oligonucleótidos.

Sonda	Fluorocromo	Especificidad	Secuencia (5' a 3')	Formamida (%)
EUB338 ^a		Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50 ^b
EUB338-II ^a	Cy5	Otras bacterias no detectadas con EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50 ^b
EUB338-III ^a			GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50 ^b
ALF968	Cy3	<i>Alfaproteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20
BET42a	Cy3	<i>Betaproteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35
-		Competidor BET42a	GCCTTCCCACATCGTTT	35
GAM42a	Cy3	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	20
-	-	Competidor GAM42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	20
DELTA495A ^c			AGTTAGCCGGTGCTTCCT	35
DELTA495B ^c	Cy3	<i>Deltaproteobacteria</i>	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	35
DELTA495C ^c			AATTAGCCGGTGCTTCCT	35
-	-	Competidor DELTA495a	AGTTAGCCGGTGCTTCTT	35
-	-	Competidor DELTA495b	AGTTAGCCGGCGCTTCKT	35
-	-	Competidor DELTA495c	AATTAGCCGGTGCTTCTT	35
HGC96A	Cy3	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	25
-	-	Competidor HGC96A	TATAGTTACGGCCGCGGT	25
LGC 354A ^d			TGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC 345B ^d	Cy3	<i>Firmicutes</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC 345C ^d			CCGAAGATTCCCTACTGC	35
PS56a	Cy3	<i>Pseudomonas sp.</i>	GCTGGCCTAGCCTTC	20
Ppu56a	Cy3	<i>P.putida</i>	GCTGGCCTAACCTTC	20
REX72	Cy3	<i>Bacillus</i>	TGGGAGCAAGCTCCCAAAG	20
Myc657	Cy3	<i>Mycobacterium</i>	AGTCTCCCCTGYAGTA	30

^aEUB338, EUB338-II, EUB338-III se usaron en una mezcla denominada EUB338mix.

^bRango de aplicación (% seleccionado dependiendo del porcentaje de formamida que requiere la sonda específica).

^cDELTA495A, DELTA495B, DELTA495C se usaron en una mezcla denominada DELTA495mix.

^dLGC354A, LGC345B, LGC345C se usaron en una mezcla denominada LGCmix.

El protocolo que se ha utilizado para la aplicación de la técnica FISH se optimizó previamente a partir de la bibliografía (Amann y col., 1995). El procedimiento seguido se describe a continuación.

Procesamiento y fijación de la muestra: para la fijación de la biomasa se tomó 1 mL de muestra y se adicionaron 15 mL de agua MiliQ esterilizada. A continuación, se disgregó la muestra utilizando la trituración mecánica de alta velocidad mediante el equipo Ultra-Turrax T18 basic (IKA®, Alemania). Para un posterior análisis de las bacterias Gram negativas, la fijación de las muestras se llevó a cabo añadiendo 1.5 mL de paraformaldehído (4%) a 0.5 mL de muestra disgregada. Esta mezcla se homogenizó en un vórtex y se conservó a 4 °C durante 1 a 3 horas. Posteriormente, se centrifugó la mezcla durante 3 minutos a 7000 rpm, se realizó un lavado del pellet con 1 mL de tampón salino de fosfato (PBS) y finalmente se resuspendió la biomasa en 0.5 mL de PBS y 0.5 mL de etanol (-20 °C). Para un posterior análisis de las bacterias Gram positivas, la fijación de las muestras se realizó centrifugando 0.5 mL de muestra disgregada. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se añadieron 0.5 mL de PBS y 0.5 mL de etanol (-20 °C) agitándose la mezcla resultante en un vortex. Las muestras fijadas se transfirieron a un criotubo y se conservaron a -20 °C.

Aplicación de la muestra a un portaobjetos: se añadieron 7 µL de muestra en las diferentes posiciones de un portaobjetos (8 well 6 mm Diagnostic Slides, Thermo Scientific, España) y se secaron a 46 °C durante 10 minutos en una estufa (Incubator basic INB200, Memmert, España). Seguidamente se realizaron tres deshidrataciones seriadas utilizando soluciones de etanol al 50%, 80% y 96% (3 minutos en cada concentración) y, por último, los portaobjetos se dejaron secar al aire.

Hibridación de la sonda: la solución de hibridación se preparó en tubos de 2 mL, para ello se utilizaron los reactivos que se presentan en la Tabla 4.13. Se añadieron 7 µL de la solución de hibridación en cada posición del portaobjetos, 1.5 µL de la sonda general y 1.5 µL de la sonda específica y se mezclaron cuidadosamente. En el caso concreto de las sondas que se utilizan junto a sus sondas competidoras, se añadieron 5.5 µL de la solución de hibridación, 1.5 µL de la sonda general, 1.5 µL de la sonda específica y 1.5 µL de la sonda competidora, con el fin de conseguir un volumen final de 10 µL. A continuación, se preparó un tubo de centrífuga de 50 mL en el que se estableció una base de papel y se adicionó la solución de hibridación sobrante para mantener las condiciones óptimas de

hibridación. El portaobjetos se introdujo en el interior del tubo y éste se mantuvo en la estufa en posición horizontal durante 2 horas a 46 °C. En el portaobjetos se dejaron dos posiciones como controles, en ellos se llevó a cabo todo el procedimiento a excepción de la adición de las sondas.

Tabla 4.13. Composición de la solución de hibridación.

Reactivo	Volumen
5M NaCl	360 µL
1M Tris/HCl	40 µL
10% SDS	2 µL
Formamida	*
Agua MiliQ	Hasta 2 mL

*En función del % que requiere la sonda.

Lavado: durante el periodo de hibridación, se preparó la solución de lavado con los reactivos enumerados en la Tabla 4.14. Los tubos con las soluciones de lavado se introdujeron en un baño termostático (10l Basic, Memmert, España) a 48°C. Al finalizar la hibridación, los portaobjetos se colocaron en el interior de los tubos con la solución de lavado a 48 °C durante 18 minutos.

Tabla 4.14. Composición de la solución de lavado.

Reactivo	Volumen
5M NaCl	Según % Formamida
0.5M EDTA	Según % Formamida
1M Tris/HCl	1 mL
10% SDS	50 µL
Agua MiliQ	Hasta 50 mL

Montaje de las muestras: después de extraer los portaobjetos de la solución de lavado, éstos se lavaron ligeramente con agua MiliQ, se dejaron secar en oscuridad y se montaron con los cubreobjetos utilizando un producto denominado Vectashield® (ATOM, España) que evita el deterioro y la pérdida de fluorescencia.

Visualización y captación de imágenes: la observación de las preparaciones se realizaron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP, Alemania; FV 1000, Olympus, Japón) en el Servicio Central de Soporte a la Investigación de la Universitat de València. La adquisición de imágenes se efectuó tomando 5 imágenes

de los controles (blancos) para evaluar la propia autofluorescencia de la muestra y 30 imágenes de campos visuales diferentes de la muestra hibridada. Cada captación de imágenes constaba de dos imágenes, es decir, una para la señal de la sonda general de bacterias (azul) marcada con el fluorocromo Cy5 y otra para la sonda específica (magenta) marcada con el fluorocromo Cy3 (Figura 4.8).

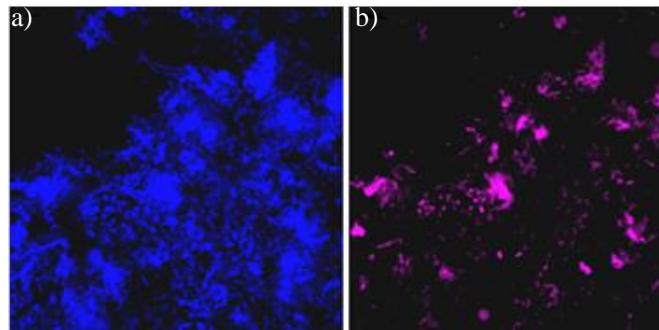


Figura 4.8. Ejemplo de imágenes FISH. a) Sonda general-Cy5. b) Sonda específica-Cy3.

Tratamiento de imágenes: el tratamiento de las imágenes adquiridas se realizó siguiendo el proceso descrito por Jubany y col. (2009) y utilizando un programa desarrollado en el software Matlab[®]. En primer lugar se analizaron las imágenes que correspondían a los controles o blancos, obteniéndose una intensidad umbral. A continuación, se ejecutó el programa informático analizando las 30 imágenes tomadas de la muestra hibridada (30 imágenes para la sonda general y 30 imágenes para la sonda específica), y el programa efectuó el recuento de los píxeles con una intensidad superior al valor umbral. Como resultado de este proceso se obtuvo un porcentaje relativo de la sonda específica (marcada con cianina Cy3) sobre la sonda general de bacterias EUB338mix (marcada con cianina Cy5).

4.4.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante kits comerciales y mediante ruptura mecánica con un homogenizador celular (*Bead-Beater*). En concreto los procedimientos de extracción utilizados en los distintos experimentos fueron:

- Kit JETQUICK tissue DNA Spin (capítulo 5).
- Kit Fast DNA Spin for Soil (capítulo 6).
- Kit PowerSoil® DNA Isolation (capítulo 7).
- Ruptura mecánica mediante un homogenizador celular (capítulo 7).

Los kits comerciales de extracción de ADN se aplicaron siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Estos kits combinan una fase mecánica de ruptura celular con una fase de purificación del ADN que se basa en la unión del ADN a un gel de sílice. A modo de resumen, el protocolo seguido en los kits comerciales se basa en cuatro fases que garantizan la extracción satisfactoria del ADN:

- Homogenización y ruptura mecánica de la biopelícula gracias al efecto de microbolas que contienen los tubos suministrados y al sistema de agitación: vórtex u homogenizador celular.
- Precipitación de las proteínas.
- Adsorción del ADN a un gel de sílice que asegura la eliminación de los inhibidores de la PCR.
- Lavado y purificación del ADN.

La extracción del ADN por ruptura mecánica se realizó mediante la mezcla de 800 μL de muestra con perlas de sílice en un tubo de 2 mL. La suspensión se homogenizó cinco veces durante 60 segundos en un homogenizador celular (*Bead-Beater*, B. Braun Biotech International, Alemania). Se alternaron los ciclos de agitación de 1 minuto con ciclos de refrigeración de la muestra de 1 minuto en hielo. Finalmente, se centrifugaron los tubos y se almacenó el sobrenadante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

4.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La aplicación de la técnica PCR se realizó como paso previo a la técnica de DGGE y a la secuenciación del gen 16S ARNr. El ADN extraído se amplificó mediante PCR utilizando una mezcla de reactivos con un volumen final de 50 μL . Cada reacción de PCR contenía entre 1 y 2 μL del ADN extraído y cada uno de los

reactivos que se detallan en la Tabla 4.15. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (LongGene Scientific Instruments, China; Bio-Rad Laboratorios GmbH, Múnich). Los cebadores utilizados se presentan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.15. Reactivos empleados en la PCR.

Reactivo	Concentración en 50 μ L de reacción
Taq polimerasa	1-1.25 unidades
dNTPs	0.2-0.25 mM
Mg ²⁺	2-2.5 mM
Cebadores	0.1-1 μ M

Tabla 4.16. Cebadores utilizados en la PCR.

Cebador	Cadena	Suministrador
F357-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG3'	Euroclone, Italia
R518	5'ATTACCGCGGCTGCTGG3'	Euroclone, Italia
F27	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'	Biomaster GmbH, Alemania
R1492	5'ACCTTGTTACGACTT3'	Biomaster GmbH, Alemania

Los cebadores F357-GC y R518 se utilizaron en las reacciones de PCR que se ejecutaron como paso previo a la técnica de DGGE (capítulo 5, 6 y 7), así como en la reacciones de PCR que se realizaron para la secuenciación del ADN procedente de bandas extraídas del gel de acrilamida de la técnica DGGE (capítulo 7), utilizando el programa de temperaturas detallado en la Figura 4.9.

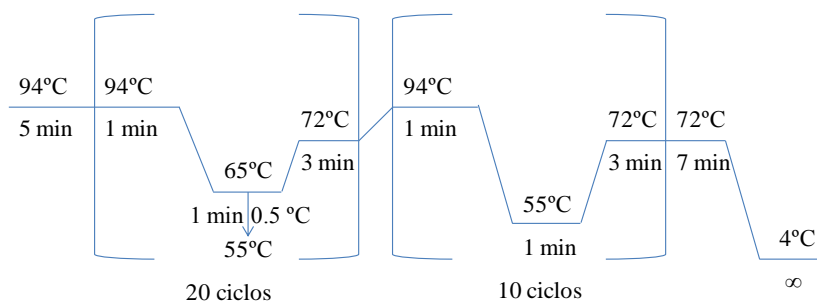


Figura 4.9. Programa de temperatura de PCR-DGGE y PCR para secuenciación del ADN de bandas de la DGGE.

Los cebadores F27 y R1492 se utilizaron en la PCR previa a la secuenciación del ADN procedente de cepas aisladas (capítulo 7) mediante técnicas de cultivo utilizando el programa descrito en la Figura 4.10.

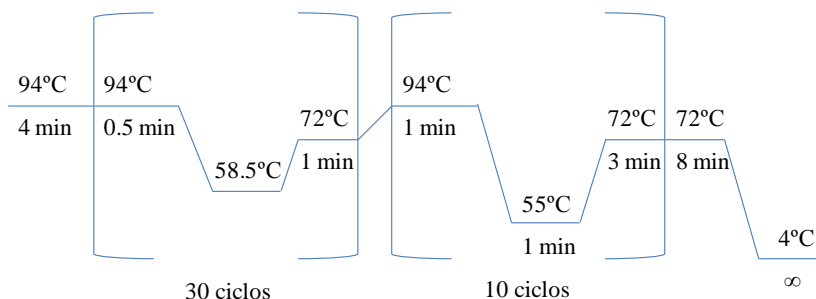


Figura 4.10. Programa de temperatura de PCR para secuenciación del ADN de cepas aisladas.

4.4.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La técnica DGGE se llevó a cabo separando los productos de PCR en un gel de acrilamida al 8% usando un gradiente desnaturalizante de 35% a 55% (capítulo 7) o de 35% a 60% (capítulos 5 y 6). Para ello, se preparó un gel de acrilamida utilizando una solución desnaturalizante de baja concentración urea-formamida y una solución desnaturalizante de alta concentración urea-formamida, cuyas composiciones se detallan en la Tabla 4.17. Además, se empleó una disolución final de acrilamida 0% desnaturalizante. Para la polimerización del gel se añadieron los reactivos persulfato de amonio (APS) al 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED).

Tabla 4.17. Composición de las soluciones desnaturalizantes utilizadas en la técnica DGGE.

Reactivo	35%	55%	60%	Disolución final
Agua miliQ (mL)	8.0	6.0	5.5	3.6
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (mL)	3.0	3.0	3.0	1.3
Tampón TAE 50X (mL)	0.3	0.3	0.3	0.1
Urea (g)	2.2	3.4	3.7	-
Formamida (mL)	2.1	3.3	3.6	-
Glicerol (mL)	0.3	0.3	0.3	-
Volumen final (mL)	15.0	15.0	15.0	5.0

El gel se preparó utilizando dos platos de vidrio rectangulares dispuestos uno encima de otro, de modo que entre ellos existió un espacio de 1 mm donde se introdujeron las soluciones de alta y baja concentración mediante un sistema formador de gradientes. La parte superior del gel se completó con la disolución 0% desnaturalizante donde se dispuso un peine para formar los pocillos en los que se introdujeron entre 10 y 20 μL de los productos de PCR.

La electroforesis se llevó a cabo con el sistema DGGE Kuro verti 2020 (VWR Internacional Eurolab S.L, España). Este sistema dispone de una cámara de electroforesis que se llenó de una solución buffer denominada TAE 1X. La elaboración del buffer TAE 1X se realizó a partir de TAE 50X disolviendo 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de 0.5 M EDTA en 1 L de agua MiliQ, esterilizando la solución final durante 30 minutos a 120 °C. La electroforesis se realizó a 60 °C aplicando un voltaje de 50 V durante 5 minutos, 150 V durante 120 minutos y 200 V durante 60 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la tinción del gel para su posterior visualización utilizando el reactivo Eurosafe (Euroclone, Italia). La visualización y captación de imágenes se realizó en el sistema MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System Ltd., España). Las bandas dominantes que se observaron en los geles obtenidos tras la técnica DGGE se extrajeron sobre un transiluminador UV (ECX-20M, Vilbert Lourmat, España) con un bisturí estéril para su posterior identificación mediante la técnica de secuenciación. Las bandas se disgregaron y se homogenizaron en 30 μL de agua MiliQ. Esta mezcla se incubó a 4 °C durante 15 horas. Posteriormente, se centrifugaron los tubos y se almacenó el sobrenadante a -20°C.

4.4.5. Secuenciación del gen 16S ARNr

La secuenciación del gen 16S ARNr permite obtener información taxonómica y filogenética. Como paso previo a la secuenciación, el gen 16S ARNr se amplificó por PCR. Los productos de PCR se purificaron mediante un Kit comercial (High Pure PCR product Purification Kit, Roche, España; GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich, Alemania). La secuenciación del ADN (capítulo 7) se llevó a cabo por GATC Biotech AG (Constance, Alemania) y por el servicio de Genómica de la Universitat de

València (Valencia, España) mediante un analizador automático de ADN (3730 KL DNA analyzer, Applied Biosystems, España). La edición de las secuencias se realizó con el software MEGA versión 6.06, y los resultados se compararon con los disponibles en la base de datos NCBI GenBank mediante el software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.5. Técnicas de cultivo en placa

Las técnicas de cultivo en placa se aplicaron para el aislamiento de cepas presentes en los biofiltros percoladores empleados para el tratamiento de aire contaminado con 2-butoxietanol (capítulo 7). Se utilizó un medio de cultivo selectivo denominado *Medio Mineral* (MM) que permitió la identificación de cepas que pueden usar 2-butoxietanol como fuente de carbono. En cada placa de MM se adicionaron 15 µL de 2-butoxietanol como la única fuente de carbono. También se empleó un medio de cultivo general denominado *Nutrient Broth* (NB) que permitió el crecimiento de otras especies que no necesariamente presentaron la capacidad para asimilar el contaminante. Las composiciones de los medios MM y NB han sido previamente descritas. Las placas se incubaron a 30 °C.

4.6. Bibliografía

- Amann, R.L., Ludwig, W., Scheleifer, K.-H. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiological Reviews, 59: 143-169.
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponible en línea: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public health association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington.
- Jubany, I., Lafuente, J., Carrera, J. Baeza, J.A. (2009). *Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy*. Journal Chemical Technology and Biotechnology, 84: 1140-1145.

Martínez-Soria, V., Gabaldón, C., Peña-roja, J.M., Palau, J., Álvarez-Hornos, F.J., Sempere, F., Soriano, C. (2009). *Performance of a pilot-Scale biotrickling filter in controlling the volatile organic compound emissions in a furniture manufacturing facility*. Journal of the Air and Waste Management Association, 59: 998-1006.

5. Microbial community analysis in biotrickling filters treating isopropanol air emissions

Este trabajo está publicado en Environmental Technology, vol. 34, 2789-2798. Los editores Taylor y Francis han concedido el derecho de incluir este artículo científico en la presente tesis doctoral.

Microbial community analysis in biotrickling filters treating isopropanol air emissions

M. Carmen Pérez, F. Javier Álvarez-Hornos, Pau San-Valero, Paula Marzal and Carmen Gabaldón*

Research Group GI2AM, Department of Chemical Engineering, Universitat de València, Burjassot, Spain

(Received 12 December 2012; final version received 23 March 2013)

The evolution of the microbial community was analysed over one year in two biotrickling filters operating under intermittent feeding conditions and treating isopropanol emissions, a pollutant typically found in the flexography sector. Each reactor was packed with one media: plastic cross-flow-structured material or polypropylene rings. The communities were monitored by fluorescence in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S rRNA region. After inoculation with activated sludge, the biotrickling filters were operated using inlet loads (ILs) from 20 to 65 g C m⁻³ h⁻¹ and empty-bed residence times (EBRTs) from 14 to 160 s. Removal efficiencies higher than 80% were obtained with ILs up to 35 g C m⁻³ h⁻¹ working at EBRTs as low as 24 s. There was an increase in the total percentage of the target domains of up to around 80% at the end of the experiment. Specifically, the *Gammaproteobacteria* domain group, which includes the well-known volatile organic compound (VOC)-degrading species such as *Pseudomonas putida*, showed a noticeable rise in the two biotrickling filters of 26% and 27%, respectively. DGGE pattern band analysis revealed a stable band of *Pseudomonas putida* in all the samples monitored, even in the lower diversity communities. In addition, at similar operational conditions, the biotrickling filter with a greater relative abundance of *Pseudomonas* sp. (19.2% vs. 8%) showed higher removal efficiency (90% vs. 79%). Results indicate the importance of undertaking a further in-depth study of the involved species in the biofiltration process and their specific function.

Keywords: biotrickling filters; denaturing gradient gel electrophoresis; fluorescence in situ hybridization; microbial community; volatile organic compounds

1. Introduction

Flexography is part of the printing sector and its industry grew by 4.5% from 2009 to 2010, comprising around 150,000 companies in Europe.[1] The main organic solvents used in flexography are ethanol and isopropyl alcohol, since they are used in the formulation of solvent inks, dilution and cleaning processes.[2] Stricter requirements for the control of volatile organic compounds (VOCs) from the use of solvents have been published by a new European Directive on industrial emissions (Council Directive 2010/75/EC), in which VOC emission limits have been established between values of 50 and 150 mg C Nm⁻³ depending on the industrial activity. Thus, the flexographic industry requires treatment technologies to comply with the directive regulating VOC emission.

There are several techniques for treating VOC emissions, such as condensation, adsorption, absorption, thermal destruction and biotechnologies. Biotechnologies, including biofilters, biotrickling filters and bioscrubbers, are a potential alternative to conventional techniques for removing VOCs from emission streams with high flow rates and relatively low VOC concentrations. Moreover, these

have proven to be both cost-effective and environmentally friendly.[3] Furthermore, biological treatment has been included as an end-of-pipe technique for waste-gas abatement in installations for the surface treatment of substances using organic solvents.[4]

Biotrickling filters (BTFs) use a specified inert packing material and involve a liquid phase, which trickles through the bed providing nutrients. The biofilm is developed on the packing surface, the microbial community being essential for the successful performance of the process. The effectiveness of the BTF process has been studied from the laboratory to the industrial scale treating aromatic and oxygenated compounds.[5–13] However, there are few data in the literature on compounds related to the flexographic sector. For example, Chang and Lu studied the removal of isopropanol (IPA) using a trickled-bed air biofilter packed with coal and empty-bed residence times (EBRTs) from 20 to 90 s.[14] Removal efficiencies (REs) between 90 and 99% were achieved for inlet loads (ILs) of between 45 and 88 g C m⁻³ h⁻¹. Krailas and Pham reported an isopropanol elimination capacity (EC) of 276 g m⁻³ h⁻¹ for an IL of 342 g m⁻³ h⁻¹ using a downward flow biofilter.[15] Popov

*Corresponding author. Email: carmen.gabaldon@uv.es

This article was originally published with erroneous pagination. This version has been corrected. Please see Erratum (<http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2013.869380>).

et al. evaluated a pilot-scale biotrickling filter at a flexographic printing facility employing an EBRT of 14 s.[16] Highly variable VOC emissions containing a mixture of alcohols and esters, with an average inlet concentration of 1.56 g m^{-3} , were treated with an average RE of 89%.

As reported above, significant efforts have been made to improve the feasibility and robustness of the bioprocess; however, there are few studies focussed on the characterization of the bacterial population in BTFs. For this purpose, molecular biological techniques are useful for analysing microbial community structures during the removal of contaminants in the biological processes. Some of the applied techniques are polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence in situ hybridization (FISH). PCR consists of amplifying nucleotide fragments and SSCP detects sequence variations (single-point mutations and other small-scale changes) through electrophoretic mobility differences. DGGE is based on the electrophoretic separation of PCR products with the same length, but with different sequences, on a linear denaturing gradient polyacrylamide gel.[17] FISH detects nucleic acid sequences by probes with fluorescent dyes that hybridize specifically to its complementary target sequence within the cell.[18] These techniques have been applied in the field of biofiltration.[19,20] For example, Khammar et al. studied the spatial structure of microbial communities in a biofilter treating a complex mixture of 11 VOCs using PCR-SSCP. The authors observed a spatialization of the biodegradation functions in the biofilter related to the stratification of microbial density and diversity along the filter bed.[21] In another study, Friedrich et al. applied

FISH to determine the bacterial community in a full-scale industrial biofilter.[22] Results indicated that members of the *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* were the most abundant groups, although a non-homogeneous distribution along the biofilter was observed, since the lower 50 cm of the biofilter bed was the most active in removing pollutants. The DGGE technique was applied to assess the impact of changing VOC emission composition on the bacterial community structure in a trickle-bed air biofilter during 192 days.[23] The results showed that the structure of the microbial community in the biofilter was different after each change in the inlet composition.

The purpose of this work was to characterize the microbial communities present in two biotrickling filters, each one with a different packing material (a plastic cross-flow-structured material or polypropylene rings) for treating isopropanol (IPA) emissions. The following specific objectives were developed: (1) application of FISH and DGGE to analyse any variation in the microbial communities following changes in the operating parameters of the BTFs and (2) comparison between the microbial communities in the two BTFs.

2. Material and methods

2.1. BTF set-up and operating conditions

The experimental system consisted of two identical laboratory-scale BTFs operating in parallel, named BTF1 and BTF2. The schematic of the experimental set-up is shown in Figure 1. Both BTFs were built by a methacrylate

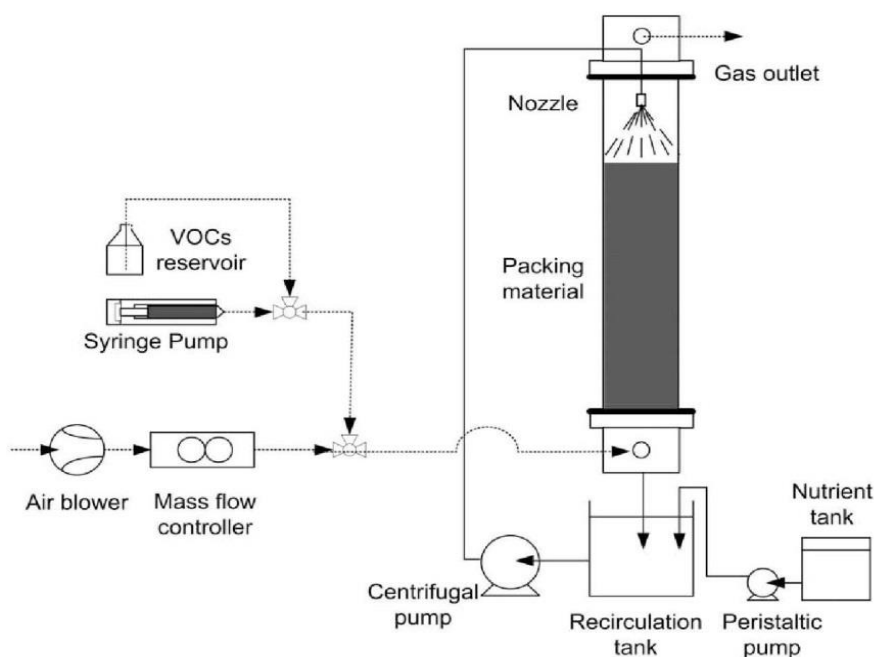


Figure 1. Schematic of the experimental set-up.

column with a total length of 126 cm and an internal diameter of 14.4 cm. BTF1 was filled with a plastic cross-flow-structured packing material (Odourpack, Pure Air Solutions, the Netherlands) with a surface area of $410 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ and BTF2 with a random packing material (Refill-Tech, Italy) consisting of polypropylene rings with a nominal diameter of $5/8''$ and a surface area of $348 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$. The set-up was completed with a 10-L recirculation tank and the recirculation solution was intermittently fed into the bioreactor (15 min every 1.5 h) in a counter-current mode with respect to the air flow. The liquid velocity was set to 10 m h^{-1} . A nutrient solution ($21.65 \text{ g KNO}_3 \text{ L}^{-1}$, $4.6 \text{ g Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O L}^{-1}$, trace elements ($\mu\text{g L}^{-1}$): 12000 Ca, 1500 Fe, 2650 Mg, 605 Zn, 60 Co, 60 Mo, 55 Ni, 50 Cu, 45 B, 40 Mn, 8 I, 3 Se & 1 Cr; and vitamins ($\mu\text{g L}^{-1}$): 20 beta-Carotene, 70 B1, 70 B2, 95 B6, 10 B9, 0.1 B12, 3 C, 0.3 D, 500 E, 2 Biotin & 900 Niacin) was supplied into the recirculation tank using a peristaltic pump to maintain a supplied mass ratio of carbon to nitrogen of 35. The inoculum for both BTFs was an activated sludge obtained from a wastewater treatment plant located in Valencia (Spain). An inoculum volume of 0.5 L (TSS concentration of 3500 mg L^{-1}) was added to the recirculation tank and continuously flowed through the bed for 24 h.

The influence of IL and EBRT on the removal of isopropanol and microbial communities were analysed in three phases (A, B and C). Each phase was designed with a constant inlet concentration. In the phases A, B and C, it was adjusted to 1000, 500 and 250 mg C Nm^{-3} , respectively. For each phase, several IL step increases were carried out together with variations in the EBRTs of between 14 and 160 s (gas velocities between 258 and 23 m h^{-1}). Table 1 summarizes the experimental plan and the biomass sampling events. The experiments were planned to simulate typical industrial emissions; hence, an intermittent loading pattern was applied (16 h of feeding isopropanol per day, 5 days per week). During nights and weekends without isopropanol supply, the air flow rate was kept constant and the water trickling was stopped. The first three biomass samples (day 60 at phase A-II, 100 at phase B-II and 130 at phase C-I) corresponded to experiments with an IL of $35 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and a gradual reduction of the EBRT from 90 to 24 s.

In the last phase (D), the effects on the system re-start-up after a long period without isopropanol feeding was

evaluated to check the robustness of the process and the impact on the microbial community. Macroscopic changes such as RE recovery and microscopic changes such as the microbial ecology structure were evaluated. During the period from day 164 to day 217 (referred to here as the starvation period), the supply of isopropanol was stopped, the air flow rate was adjusted to achieve an EBRT of 60 s and the water trickling pattern was reduced to 15 min per day. On day 217, VOC feeding was restored using the same intermittent pattern applied before (16 h of feeding isopropanol per day, 5 days per week) and the trickling of water for 15 min every 4 h was set. In phase D-I, an IL of $35 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 60 s were established. A few days after isopropanol feeding was restored (on day 217), a new biomass sample was obtained on day 227 (at phase D-I). Finally, the IL was twice increased at phase D-II and two biomass samples (days 245 and 276) were collected. Results of the removal of both BTFs during phases A, B and C have been previously published by the authors on San-Valero et al.[24] A summary of these results is presented here in order to show the complete performance of both BTFs during the whole experimental period (from phases A to D). The performance is used to correlate him with the microbial communities analysed from biomass samples taken throughout the entire experimental period.

2.2. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

The FISH technique was carried out, adapting the procedure described by Amann et al.[25] The procedure included the following steps: sampling, fixation, hybridization with the respective probes for detecting the respective target sequences, image acquisition and analysis. The probes targeting general bacterial groups used in this work were: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* related to the Proteobacteria domain, *Firmicutes* (low G + C Gram-positive bacteria) and *Actinobacteria* (high G + C Gram-positive bacteria). These groups have been previously identified as the main ones involved in VOC removal.[26,27] *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Bacillus* and *Mycobacterium* were the targeted species monitored since previous studies have indicated that these species play an important role in VOC degradation.[28–32]

Table 1. Experimental plan for the removal of isopropanol under intermittent loading conditions.

	PHASE A			PHASE B			PHASE C		PHASE D	
	I	II	III	I	II	III	I	II	I	II
Days	0–48	49–69	70–90	91–97	98–104	105–125	126–132	133–163	217–228	229–300
Sampling event on day		60			100		130		227	245,276
Inlet concentration, mg C Nm^{-3}	1000	1000	1000	500	500	500	250	250	500	1000
IL, $\text{g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$	20	35	65	20	35	65	35	65	35	65
EBRT, s	160	90	50	90	50	25	24	14	60	50

EBRT, empty-bed residence times; IL, inlet load.

2.2.1. Sampling and fixation

Biomass samples from the bioreactors were taken from three sampling ports located at different heights of the packed bed of the reactor: 20, 62 and 105 cm. They were mixed at a 1:1:1 ratio (wt) and disaggregated with an Ultra-Turrax (IKA® T18 basic, Germany), resulting in one sample for each BTF. The samples were fixed using the procedure described by Amann et al.[25] According to the procedure, each sample was fixed with two methods: (1) to analyse Gram-negative cells where the sample was fixed with paraformaldehyde solution (4% in PBS); the sample was incubated at 4°C for 2 h. Then, the biomass was pelleted by centrifugation for 3 min at 7000 rpm, washed with PBS, pelleted again and finally re-suspended in PBS solution; (2) to analyse Gram-positive cells; the sample was centrifuged for 3 min at 7000 rpm and re-suspended with ethanol solution (96%).

2.2.2. Hybridization

In this study, a Cy5-labelled EUBmix as the general probe and Cy3-labelled specific probes (Thermo Fisher Scientific, Germany) were used. EUBmix consists of a 1:1:1 (vol) mixture of the probes EUB338, EUB338II and EUB338III. Fluorochromes Cy5 and Cy3 with different wavelengths for excitation and emission allow simultaneous microscopic observations. The oligonucleotide probes used in this study and the percentage of formamide used for each probe are summarized in Table 2.[33] Hybridization was performed at 46°C for 2 h. After this step, the slides were rinsed for 18 min at 48°C, dried and mounted. For mounting, an anti-fading product (VECTASHIELD®, ATOM S.A, Spain) was used to avoid the loss of fluorescence.

2.2.3. Image acquisition and analysis

Slides were examined using a Leica TCS SP confocal laser scanning microscope (CLSM, Leica Microsystems, Germany). The microscope is equipped with two He-Ne lasers with light emissions at 543 and 633 nm. Each image captured was formed with two pictures, one corresponding to EUBmix and the other to the specific probe. Five images were acquired for the negative control (without probes) and 30 for the stained samples (with specific and general probes). Specific probes were quantified as the proportion of EUBmix-labelled bacteria using image analysis based on the methodology developed by Jubany et al.[34] This method was implemented in the Matlab® software. First, the thresholds for general and specific probes were calculated as the minimum intensity value satisfying the condition: the proportion of pixels with intensity lower or equal to the threshold value in the negative control images is greater than or equal to a value of 99.9%. These thresholds were used to exclude the autofluorescence of the sample in the quantification procedure. The quantification of images for the stained samples was carried out as the sum of the pixels with intensity higher than the threshold intensity for the general and specific probes. Finally, the ratio of the sum of the pixels for the specific probe to that for the general probe was estimated.

2.3. DNA extraction and PCR amplification

DNA was extracted using a JETQUICK tissue DNA Spin kit (Genycell biotech, Spain) from the biomass samples taken on days 60, 100, 227 and 276 (phases A-II, B-II, D-I and D-II, respectively). DNA was stored at -20°C until analysis. The extracted DNA was used as

Table 2. List of oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Specificity	Sequence, 5'-3'	Formamide, %
EUB338 ^a	<i>Most Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50
EUB338-II ^a	<i>Bacteria not detected by EUB338</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50
EUB338-III ^a	<i>Bacteria not detected by EUB338</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50
ALF968	<i>α-Proteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20
BET42A	<i>β-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35
-	<i>Competitor for BET42A</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
GAM42A	<i>γ-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
-	<i>Competitor for GAM42A</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35
HGC69A	<i>Actinobacteria (high G + C Gram-positive bacteria)</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	25
-	<i>Competitor for HGC69A</i>	TATAGTTACGGCCCGCGT	25
LGC354A ^b	<i>Firmicutes (low G + C Gram-positive bacteria)</i>	TGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354B ^b	<i>Firmicutes (low G + C Gram-positive bacteria)</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354C ^b	<i>Firmicutes (low G + C Gram-positive bacteria)</i>	CCGAAGATTCCCTACTGC	35
PS56a	<i>Pseudomonas sp.</i>	GCTGGCCTAGCCTTC	0
Ppu56A	<i>P. putida</i>	GCTGGCCTAACCTTC	0
REX72	<i>Bacillus</i>	TGGGAGCAAGCTCCCAAAG	20
Myc657	<i>Mycobacterium</i>	AGTCTCCCCTGYAGTA	30

^aEUB338, EUB338-II and EUB338-III were used in the mixture EUB_{mix}.

^bLGC354A, LGC354B and LGC354C were used in the mixture LGC_{mix}.

the target DNA in PCR to amplify the 16S rRNA coding regions, using two universal primers for the bacterial domain, primer F357GC: 5' CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG3' and primer R518: 5'ATTACCGCGGCTGCTGG3'. A GC clamp was added to the forward primers to facilitate the DGGE. PCR was performed in 50- μ l reaction volume using a mixture containing 0.1 units/ μ l of Taq DNA polymerase, 3.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂ 32 mM (NH₄)₂SO₄, 134 mM Tris HCl and 0.2 μ M of each primer (EuroClone, Italy).

PCR was executed in a thermal cycler (LongGene Scientific Instruments, Hangzhou) using the temperature cycling conditions described by Muyzer and Ramsing.[17] It consisted of 20 cycles of: 94°C for 1 min, 65°C for 1 min, a gradual decrease in the temperature using 0.5°C increments until 55°C, followed by 72°C for 3 min. The PCRs followed with 10 cycles of: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 3 min. A final extension at 72°C for 7 min was undertaken as the final step.

2.4. DGGE analysis

Five μ l of the PCR product were separated on a 2% agarose gel at 100 V for 30 min to verify the correct amplification before DGGE. For DGGE analysis, the PCR product generated from each sample was separated on an 8% acrylamide gel using a linear denaturant gradient increasing from 35% to 60% using the KuroGel Verti 2020 DGGE System (VWR international Eurolab S.L.). DGGE was performed using 20 μ l of PCR product in 1 \times TAE buffer at 60°C with a sequence of 50 V for 5 min, 150 V for 120 min and 200 V for 60 min.

3. Results and discussion

3.1. BTF performance

The performances of the two biotrickling filters treating IPA emissions, BTF1 and BTF2, are presented in Figure 2a and 2b, respectively. The performance was evaluated in terms of

inlet load (IL), elimination capacity (EC) and removal efficiency (RE). Table 3 summarizes the performance of both BTFs on the days the biomass samples were taken. As can be observed in Figure 2, approximately two weeks after inoculation, the systems were able to achieve stable REs of around 80% (phase A-I, 160 s of EBRT and IL of 20 g C m⁻³ h⁻¹). A decrease in the EBRT to 90 and 50 s at phases A-II and

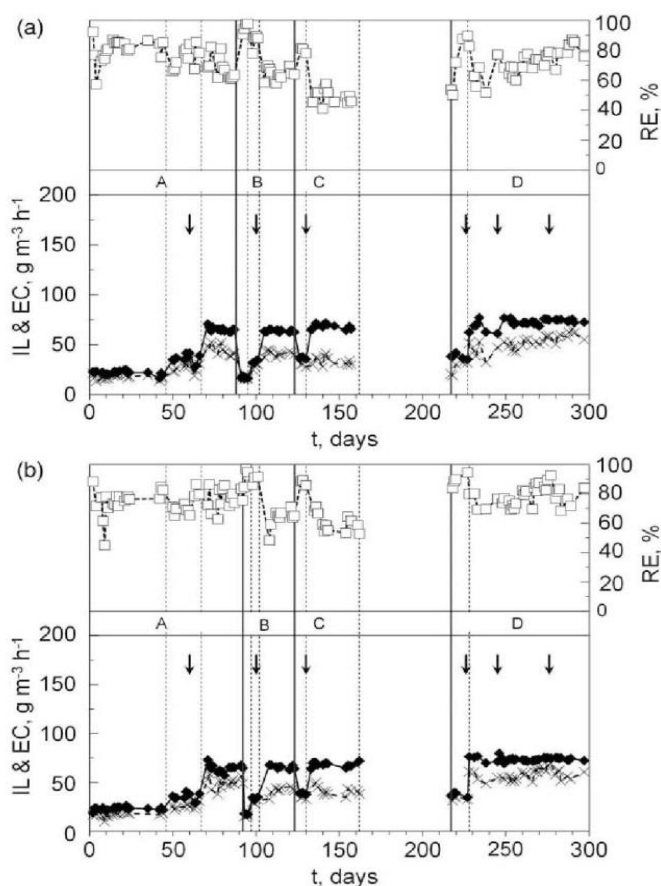


Figure 2. Performance of the BTFs in removing isopropanol, (a) BTF1 and (b) BTF2. Arrows represent the days when biomass samples were taken. (◆) Inlet Load, (×) Elimination Capacity and (□) Removal Efficiency.

Table 3. Operational and performance parameters of both BTFs on the sampling days.

Sampling day (Phase)	EBRT, s		Inlet concentration, mg C Nm ⁻³		IL, g C m ⁻³ h ⁻¹		RE, %	
	BTF1	BTF2	BTF1	BTF2	BTF1	BTF2	BTF1	BTF2
60 (A-II)	90	90	1021	1035	41.0	38.0	85.6	86.6
100 (B-II)	52	51	530	517	34.0	33.4	89.6	90.9
130 (C-I)	27	27	298	295	37.0	38.8	81.4	88.7
<i>Starvation period from day 164 to 217</i>								
227 (D-I)	59	60	632	630	35.3	34.5	89.7	94.6
245 (D-II)	48	49	898	1051	61.0	71.0	77.0	77.0
276 (D-II)	48	48	1091	1095	75.0	75.0	79.0	90.0

Note: EBRT, empty-bed residence time; IL, inlet load; RE, removal efficiency.

A-III, respectively, caused a decrease in RE for both BTFs with values varying from 60 to 85%. In phase B, the inlet concentration was set at 500 mg C Nm⁻³ and the EBRT was adjusted to 90, 50 and 25 s for phases B-I, B-II and B-III, respectively. REs greater than 90% were obtained in phases B-I and B-II, whereas in phase B-III, the RE dropped to values of 60–70%. In phase C, the inlet concentration was set at 250 mg C Nm⁻³ and the EBRT was adjusted to 24 and 14 s for phases C-I and C-II, respectively. In these phases with the most demanding operational conditions, the performances of the two systems were slightly different. For example, in phase C-I using an IL of 35 g C m⁻³ h⁻¹ and an EBRT of 24 s, RE values of around 80% and 88% were observed for BTF1 and BTF2, respectively. Prior to the starvation period, the minimum EBRT (14 s) was applied at phase C-II and the RE decreased to values of 49% and 60% for BTF1 and BTF2, respectively.

The starvation period took place from day 164 to day 217 to evaluate the re-start-up of the process after restoring VOC feeding. Macroscopic changes such as RE recovery and microscopic changes such as the microbial ecology structure were evaluated. On day 217, VOC feeding was restored using the same intermittent pattern applied before (16 h of feeding isopropanol per day, 5 days per week) and the trickling of water for 15 min every 4 h was set. In phase D-I, an IL of 35 g C m⁻³ h⁻¹ and an EBRT of 60 s were established. Ten days after restoring VOC feeding, both BTFs achieved REs as high as 90%, similar to those observed during phase B-II, demonstrating that the BTFs could handle long periods without VOC feeding. In the last phase (D-II) where the IL was twice increased to 65 g C m⁻³ h⁻¹, average RE values of 72% and 80% were reached in BTF1 and BTF2, respectively.

3.2. Monitoring of bacterial community by FISH

The monitoring of the bacterial community in the biofilm samples of both BTFs was carried out by FISH over the entire experimental period in which different operational conditions were tested (Table 1).

Figure 3 shows the evolution of the relative abundance of the general bacterial groups for the two BTFs, BTF1 (Figure 3a) and BTF2 (Figure 3b), on days 60, 100, 130, 227, 245 and 276. The results were expressed as the percentage of EUBmix-stained cells (hereafter defined as total bacteria). The total percentages of the target domains calculated as the sum of each general bacterial group are summarized in Table 4 for BTF1 and BTF2

Total percentage values ranged from 29.7 to 79.2% and from 69.4 to 88.1% for BTF1 and BTF2, respectively. It is worth noting that the higher value of the total identified bacterial groups was observed at the last phase in both BTFs (79.2% and 88.1% for BTF1 and BTF2, respectively). This could be explained by the specialization of the microbial community to groups and/or species more suitable for

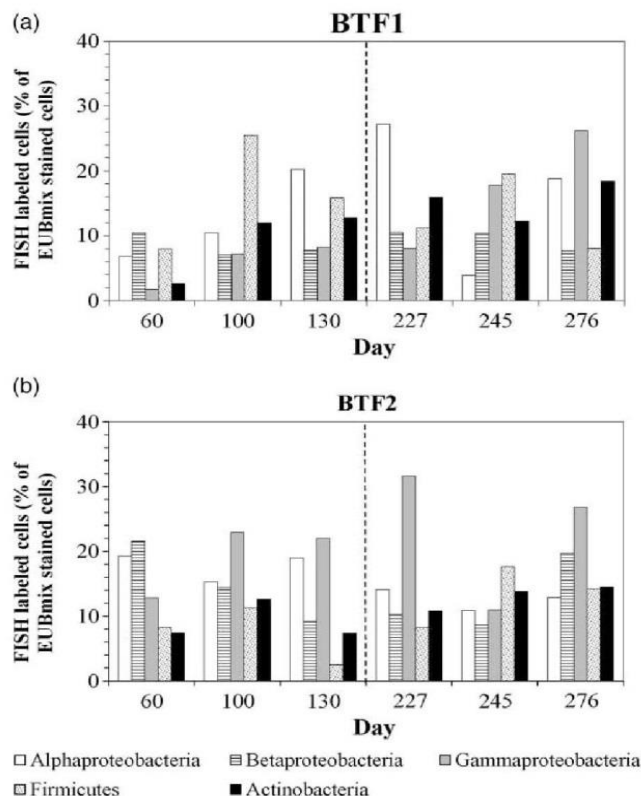


Figure 3. Time-dependent changes in bacterial community composition using general FISH probes. Results corresponding to (a) BTF1 and (b) BTF2.

Table 4. Total percentage values of the bacterial groups in both BTFs.

Sampling day (Phase)	Total percentage value	
	BTF1	BTF2
60 (A-II)	29.7	69.4
100 (B-II)	62.2	76.5
130 (C-I)	64.9	60.1
Starvation period from day 164–217		
227 (D-I)	72.9	76.1
245 (D-II)	63.9	61.9
276 (D-II)	79.2	88.1

degrading the pollutant (IPA) during the year of experimentation. Other authors have indicated that the development of highly diverse communities could be enhanced in environments with high resource availability.[35] For example, Álvarez-Hornos et al. studied microbial populations in pilot-scale biotrickling installed in a plastic coating factory to control complex emissions with highly variable VOC composition.[36] The authors reported high bacterial diversity and heterogeneity, with total percentages of the same bacterial groups as those in this study varying between 23% and 56% relative to the EUBmix counts, with no predominant groups.

Regarding the evolution of the general bacterial groups, their composition changed over time and was influenced by the operational conditions in both BTFs, although there were some patterns that could be considered. As seen in Figure 3, the Gram-negative bacteria identified (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*) were more abundant than the Gram-positive bacteria identified (*Firmicutes* and *Actinobacteria*). A deep examination of the results indicated different trends for each group. For example, members of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were the most fluctuating groups, with values ranging between 4% and 27% and 7% and 22%, respectively. *Firmicutes* and *Actinobacteria* groups presented a less oscillating behaviour, especially in BTF2 with an average value of 12% for both groups. The percentage of the *Gammaproteobacteria* group increased throughout the experimental period in both BTFs, being the most abundant group at the end of experiment with values of 26% and 27% for BTF1 and BTF2, respectively. This rise could be explained by the ability of *Gammaproteobacteria* species to degrade VOCs,[30–32,37,38] enabling them to develop better in environments rich in VOC. It should be noted that in BTF2, where greater RE and greater quantity of biomass attached to the packing (visual inspections during the tested period) were obtained in comparison with BTF1, the *Gammaproteobacteria* group was the most abundant in almost all samples, with values higher than 20%. As an example, Figure 4 shows a relatively high quantity of *Gammaproteobacteria* in BTF2 on day 276.

Regarding changes in certain bacterial species, Figure 5 represents their time-dependent changes in BTF1 (Figure 5a) and BTF2 (Figure 5b) on days 60, 100, 130, 227, 245 and 276. The total percentage of identified species calculated as the sum of *Pseudomonas* sp., *Bacillus* and *Mycobacterium* presented a pattern similar to that observed with the general bacterial groups. For example, from day 100 onwards (phase B-II), the total percentage of identified species in BTF2 was higher than that in BTF1, achieving an average value of 34.3% in comparison with 18.4%, respectively.

A detailed analysis of the species in both BTFs showed a slight variation for *Bacillus* with values ranging between 1.5% and 10.5%, whereas *Mycobacterium* presented a greater fluctuation with values between 0.7 and 16%, especially during the days after the starvation period when it displayed the highest values (16.0% and 14% for BTF1 and BTF2, respectively). This could be explained by the fact that *Mycobacterium* is better protected against stressful periods without substrates and nutrients, due to the characteristics of its cell membrane. Regarding *Pseudomonas* sp., a common species in environments rich in VOCs,[29–31] several issues can be highlighted. As seen in Figure 5, the observed percentage of *Pseudomonas* sp. was always higher than that of *Pseudomonas putida*. The samples from BTF2 presented *Pseudomonas* sp. as the predominant species,

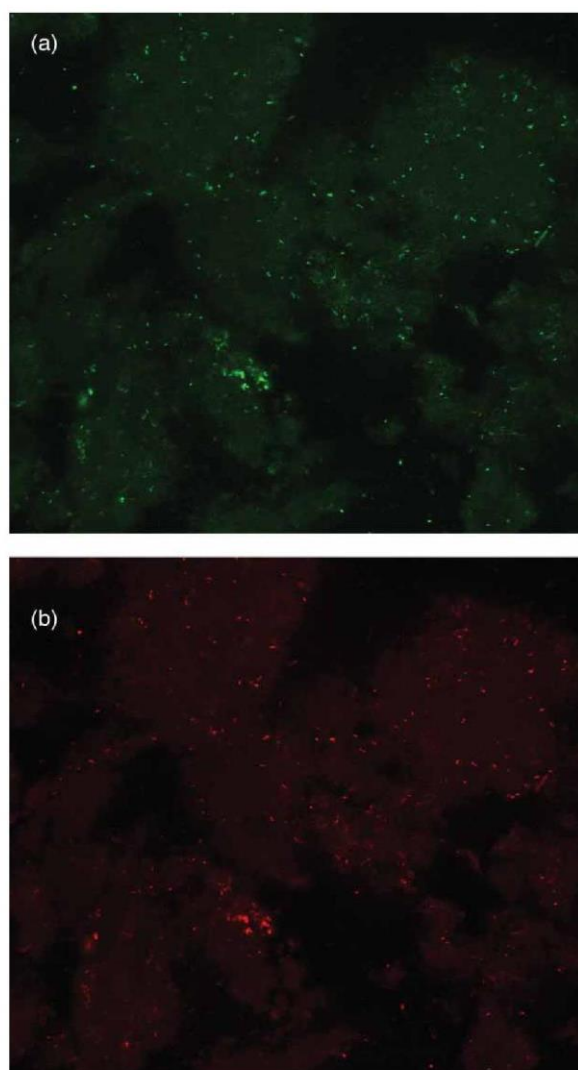


Figure 4. *Gammaproteobacteria* in BTF2 on day 276. (a) General probe and (b) specific probe.

with values ranging between 8% and 29%. In addition, these percentages were higher than those observed in BTF1, where *Pseudomonas* sp. showed a stable behaviour with an average value of 4.3%. These results agree with the bacterial evolution previously presented in Figure 3, where the abundance of *Gammaproteobacteria* in BTF2 was higher than that in BTF1. In fact, the most abundant group in BTF2 was *Gammaproteobacteria* and the most abundant species *Pseudomonas* sp. The differences between the ecological communities observed in the two BTFs could be attributed to different internal environment characteristics of the biofilm of each system. The use of two packing materials with different structure and surface area could elicit changes such as transfer to and diffusion into the biofilm of VOC, oxygen and nutrients or different degrees of biomass detachment, wetted area and distribution of irrigation. The oxygen mass transfer coefficients (k_{La}) of the packings have been estimated by San-Valero et al.[24] with a similar value for both materials of approximately 50 h^{-1} at a

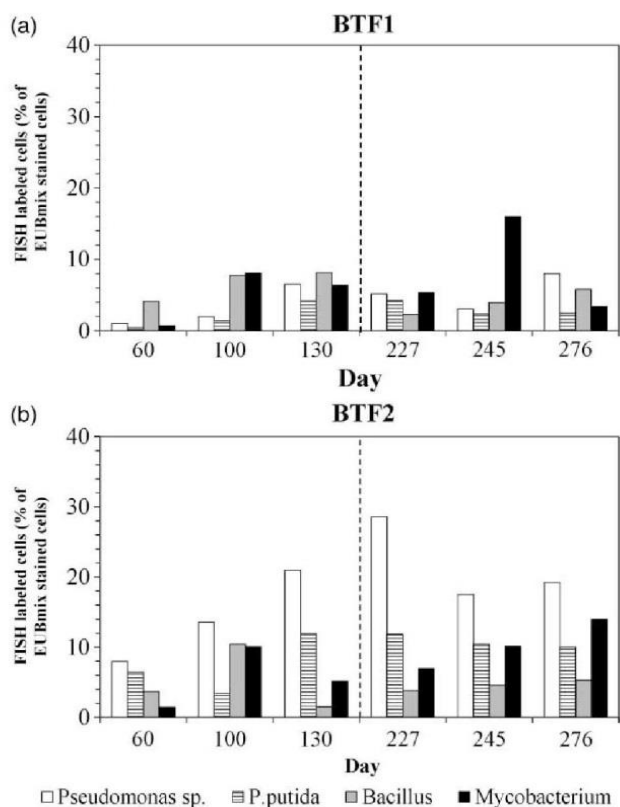


Figure 5. Time-dependent changes in bacterial community composition using specific FISH probes. Results corresponding to (a) BTF1 and (b) BTF2.

liquid velocity of 10 m h^{-1} and values of 125 and 175 h^{-1} for random and structured packing, respectively, when a liquid velocity of 30 m h^{-1} was used. All these changes at the microscopic scale affect the microbial community of the biofilm, which finally result in different behaviours at the macroscopic scale. In fact, BTF2, with a higher abundance of species belonging to *Gammaproteobacteria* such as *Pseudomonas* sp., produced greater REs than BTF1 (Table 3). For example, at phases C-I and D-II, RE values of 81.4 and 79% were observed for BTF1, and 88.7 and 90% for BTF2. It is worth noting that at the liquid velocity applied in the study, 10 m h^{-1} , the packing materials of both BTFs present a similar value of the k_{La} (50 h^{-1}). Therefore, the greater RE reached in BTF2 could be due to the higher population of these species, since the random packing (BTF2) does not present better mass-transfer properties. Changes in the performance of the system with changes in the microbial community show the importance of further studying the involved species during the removal process.

3.3. Monitoring of bacterial community by DGGE

In parallel to FISH analyses, DGGE was performed to compare the 16S rDNA fragments of bacteria in the samples collected from both BTFs on different operational days. DGGE band patterns for samples taken on days 60, 100,

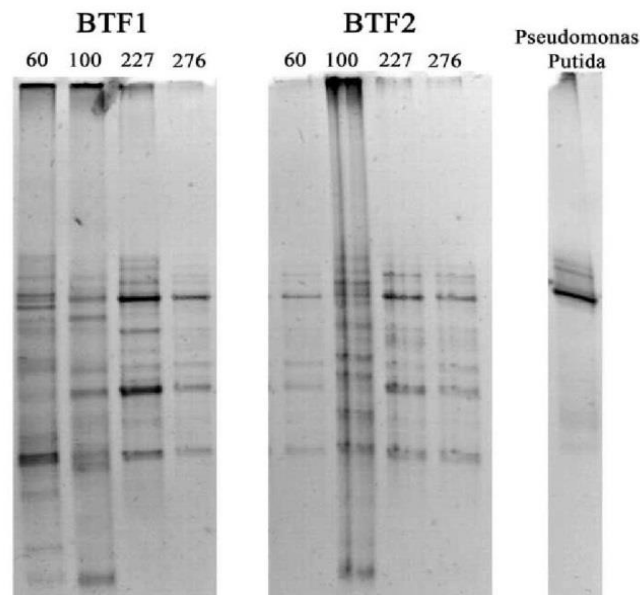


Figure 6. DGGE banding patterns of bacterial 16 S rRNA from samples on days 60, 100, 227 and 276 in (a) BTF1 and (b) BTF2. Sample of a culture enriched with *Pseudomonas putida* was also included.

227 and 276 are presented in Figure 6. The samples were also compared to a control sample of an enriched batch culture of *Pseudomonas putida*. Analysis of DGGE patterns revealed changes in the structure of the bacterial community during the experimental period. After 276 days of operation, there was a decrease in the number of bands in both BTFs, indicating lower diversity in the microbial community at the end of the experiment. The fact that this was also observed in the FISH analyses could be explained by the specialization of specific groups and/or species that are more suitable for degrading the pollutant. It should be noted that despite the difference in the bacterial community structure as revealed by the DGGE patterns, some bands appeared in all the samples analysed, indicating that several species could survive these conditions because of their ability to survive in environments rich in VOCs and/or participate in their degradation. As shown in Figure 6, one of these stable bands matched the culture enriched with *Pseudomonas putida*, corroborating the presence of this species in environments with VOCs.

4. Conclusions

Two biotrickling filters treating intermittent emissions contaminated with isopropanol were monitored over almost one year and the microbial communities were analysed by FISH and DGGE. Both BTFs were inoculated with the same inoculum, the same pollutant was removed by the two systems, and the same operational and maintenance conditions were applied, the only difference between the two being the type of packing material used. Under these conditions, the random packing material showed a slightly higher capacity

for removal. At the end of the experiment, the relative abundance of the *Gammaproteobacteria* group was observed to increase in both BTFs, with values of around 26%. This rise could be associated with the increase in the species belonging to this group such as *Pseudomonas* sp., predominant species in BTF2 with values between 8% and 29%, while in BTF1, it exhibited a stable trend with an average value of 4.3%. Moreover, DGGE analysis confirmed the presence of *Pseudomonas putida* in all the samples monitored, even in the less diverse communities observed at the end of the experiment. The differences in the microbial community of both BTFs could be linked to the difference in the performances of the systems. For example, BTF2 displayed a removal efficiency of 90% compared to the 79% shown by BTF1 at phase D-II. Furthermore, in BTF2, the percentage of the common species present in VOC-rich environments such as *Pseudomonas* sp. was twice as much as that observed in BTF1 (19.2% and 8%, respectively). Results show the importance of further studying the involved species during the removal process, e.g. future studies include the application of new molecular biological tools as next-generation sequencing methods.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/ under REA grant agreement n° 284949. Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CTM2010-15031/TECNO) and the Generalitat Valenciana (ACOMP/2012/209) are also acknowledged. We are also grateful for the FPU grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain).

References

- [1] Eurostat. Available from: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>, 2012.
- [2] European Commission. Guidance on VOC Substitution and Reduction for Activities Covered by the VOC Solvents Emissions Directive (Directive 1999/13/EC). Contract ENV/C.4/FRA/2007/001; 2009.
- [3] Wu G, Chabot J, Caron J, Heitz M. Biological elimination of volatile organic compounds from waste gases in a biofilter. *Water Air Soil Pollut.* 1998;101:69–78.
- [4] European Commission. IPPC reference document on best available techniques in surface treatment using organic solvents; 2007.
- [5] Paca J, Klápková E, Halecky M, Jones K, Webster TS. Interactions of hydrophobic and hydrophilic solvent component degradation in an air-phase biotrickling filter reactor. *Environ Prog.* 2006;25:365–372.
- [6] Martínez-Soria V, Gabaldón C, Peña-Roja JM, Palau J, Álvarez-Hornos FJ, Sempere F, Soriano C. Performance of a pilot-scale biotrickling filter in controlling the volatile organic compound emissions in a furniture manufacturing facility. *J Air Waste Manage Assoc.* 2009;59:998–1006.
- [7] Sempere F, Gabaldón C, Martínez-Soria V, Marzal P, Peña-roja JM, Álvarez-Hornos FJ. Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere.* 2008;73:1533–1539.
- [8] Cox HHJ, Sexton T, Shareefdeen ZM, Deshusses MA. Thermophilic biotrickling filtration of ethanol vapors. *Environ Sci Technol.* 2001;35:2612–2619.
- [9] Kim D, Cai Z, Sorial G. Behavior of trickle-bed air biofilter for toluene removal: effect of non-use periods. *Environ Prog.* 2005;24:155–161.
- [10] Morotti K, Ramirez AA, Jones JP, Heitz M. Analysis and comparison of biotreatment of air polluted with ethanol using biofiltration and biotrickling filtration. *Environ Technol.* 2011;32:1967–1973.
- [11] Garzón-Zúñiga MA, Lessard P, Buelna G. Determination of the hydraulic residence time in a trickling biofilter filled with organic matter. *Environ Technol.* 2003;24:605–614.
- [12] Baquet G, Joret JC, Rogalla F, Bourbigot MM. Biofilm start-up and control in aerated biofilter. *Environ Technol.* 1991;12:747–756.
- [13] Cox HHJ, Deshusses MA. Innovative experimental setup for the parallel operation of multiple bench scale biotrickling filters for waste air treatment. *Environ Technol.* 2000;21:427–435.
- [14] Chang K, Lu C. Biofiltration of isopropyl alcohol by a trickle-bed air biofilter. *Biodegradation.* 2003;14:9–18.
- [15] Krailas S, Pham Q. Macrokinetic determination and water movement in a downward flow biofilter for methanol removal. *Biochem Eng J.* 2002;10:103–113.
- [16] Popov V, Bezborodov A, Cavanagh M, Cross P. Evaluation of industrial biotrickling filter at the flexographic printing facility. *Environ Prog.* 2004;23:39–44.
- [17] Muyzer G, Ramsing N. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Sci Technol.* 1995;32:1–9.
- [18] Moter A, Gobel U. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2000;41:85–112.
- [19] Amouric A, Verhé F, Auria R, Casalat L. Study of a hexane-degrading consortium in a biofilter and in liquid culture: biodiversity, kinetics and characterization of degrading strains. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;55:239–247.
- [20] Prenafeta-Boldú FX, Guivernau M, Gallastegui G, Vinas M, de Hoog GS, Elías A. Fungal/bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas biofilters operated under xerophilic conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;80:722–734.
- [21] Khammar N, Malhautier L, Degrange V, Lensi R, Godon JJ, Fanlo JL. Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *J Appl Microbiol.* 2005;98:476–490.
- [22] Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, Lipski A. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ Microbiol.* 2003;5:183–201.
- [23] Cai Z, Kim D, Sorial G, Saikaly R, Zein M, Oerther D. Performance and microbial diversity of a trickle-bed air biofilter under interchanging contaminants. *Eng Life Sci.* 2006;6:37–42.
- [24] San-Valero P, Peña-Roja J, Sempere F, Gabaldón C. Biotrickling filtration of isopropanol under intermittent loading conditions. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012. doi:10.1007/s00449-012-0833-y
- [25] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59:143–169.

- [26] Barcon T, Alonso-Gutierrez J, Omil F. Molecular and physiological approaches to understand the ecology of methanol degradation during the biofiltration of air streams. *Chemosphere*. 2012;87:1179–1185.
- [27] Friedrich U, Naismith MM, Altendorf K, Lipski A. Community analysis of biofilters using fluorescence in situ hybridization including a new probe for the *Xanthomonas* branch of the class Proteobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:3547–3554.
- [28] Juteau P, Larocque R, Rho D, LeDuy A. Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;52:863–868.
- [29] Stoffels M, Amann R, Ludwig W, Hekmat D, Schleifer K. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:930–939.
- [30] Roy S, Gendron J, Delhomenie M, Bibeau L, Heitz M, Brzezinski R. *Pseudomonas putida* as the dominant toluene-degrading bacterial species during air decontamination by biofiltration. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61:366–373.
- [31] Iwanade A, Jang JH, Hirai M, Shoda M. Enhancement of styrene removal by *Pseudomonas sp.* SR-5 in mixed culture with a benzoic acid-degrading bacterium in biofilter. *Environ Technol*. 2005;26:941–950.
- [32] Park DW, Kim SS, Haam S, Ahn IS, Kim EB, Kim WS. Biodegradation of toluene by a lab-scale biofilter inoculated with *Pseudomonas putida* DK-1. *Environ Technol*. 2002;23:309–318.
- [33] Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. probeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D800–D804.
- [34] Jubany I, Lafuente J, Carrera J, Baeza JA. Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84:1140–1145.
- [35] Cabrol L, Malhautier L, Poly F, Lepeuple A, Fanlo J. Bacterial dynamics in steady-state biofilters: beyond functional stability. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;79:260–271.
- [36] Álvarez-Hornos FJ, Lafita C, Martínez-Soria V, Peña-Roja JM, Pérez MC, Gabaldón C. Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector. *Biochem Eng J*. 2011;58–59:154–161.
- [37] Mosqueda G, Ramos-Gonzalez M, Ramos J. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene*. 1999;232:69–76.
- [38] Krell T, Lacal J, Guazzaroni ME, Busch A, Silva-Jimenez H, Fillet S, Reyes-Darias JA, Muñoz-Martínez F, Rico-Jimenez M., García-Fontana C, Duque E, Segura A, Ramos JL. Responses of *Pseudomonas putida* to toxic aromatic carbon sources. *J Biotechnol*. 2012;160:25–32.

6. Abatement of styrene waste gas emission by biofilter and biotrickling filter: comparison of packing materials and inoculation procedures

Este trabajo está publicado en Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 99, 19-32. Springer Science+Business Media B.V. ha concedido el derecho de incluir este artículo científico en la presente tesis doctoral.

Abatement of styrene waste gas emission by biofilter and biotrickling filter: comparison of packing materials and inoculation procedures

M. C. Pérez · F. J. Álvarez-Hornos · K. Portune · C. Gabaldón

Received: 31 January 2014 / Revised: 10 April 2014 / Accepted: 11 April 2014 / Published online: 6 May 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The removal of styrene was studied using two biofilters packed with peat and coconut fibre (BF1-P and BF2-C, respectively) and one biotrickling filter (BTF) packed with plastic rings. Two inoculation procedures were applied: an enriched culture with strain *Pseudomonas putida* CECT 324 for BFs and activated sludge from a municipal wastewater treatment plant for the BTF. Inlet loads (ILs) between 10 and 45 g m⁻³ h⁻¹ and empty bed residence times (EBRTs) from 30 to 120 s were applied. At inlet concentrations ranging between 200 and 400 mg Nm⁻³, removal efficiencies between 70 % and 95 % were obtained in the three bioreactors. Maximum elimination capacities (ECs) of 81 and 39 g m⁻³ h⁻¹ were obtained for the BF1-P and BF2-C, respectively (IL of 173 g m⁻³ h⁻¹ and EBRT of 60 s in BF1-P; IL of 89 g m⁻³ h⁻¹ and EBRT of 90 s in BF2-C). A maximum EC of 52 g m⁻³ h⁻¹ was obtained for the BTF (IL of 116 g m⁻³ h⁻¹, EBRT of 45 s). Problems regarding high pressure drop appeared in the peat BF, whereas drying episodes occurred in the coconut fibre BF. DGGE revealed that the pure culture used for BF inoculation was not detected by day 105. Although two different inoculation procedures were applied, similar styrene removal at the end of the experiments was observed. The use as inoculum of activated sludge from municipal wastewater treatment plant appears a more feasible option.

Keywords Biofilter · Biotrickling filter · Inoculation procedures · Microflora · *Pseudomonas putida* · Styrene

M. C. Pérez · F. J. Álvarez-Hornos (✉) · K. Portune · C. Gabaldón
Research Group GI2AM, Department of Chemical Engineering,
Universitat de València, Av. de la Universitat s/n, 46100 Burjassot,
Spain
e-mail: francisco.j.alvarez@uv.es
URL: <http://www.uv.es/giam>

Introduction

Styrene is a volatile organic compound (VOC) classified as a hazardous air pollutant under the Clean Air Act Amendments of 1990 (USEPA 1994). It is predominantly emitted from industries producing polystyrene, styrene copolymers and polyester. Styrene contributes to tropospheric ozone formation (Derwent et al. 1996) and has been classified as a potential carcinogen in humans (IARC 1987).

Recently, biotechnologies have been developed as alternatives to conventional techniques to treat waste gas with high flow rates and relatively low VOC concentrations. Biotechnologies are cost-effective due to their low operational costs, low energy requirements and an absence of residual products requiring further treatment or disposal (Kennens et al. 2009). Among the available biological gas treatments, biofilters (BFs) and biotrickling filters (BTFs) are of particular interest. In BFs, the reactor is usually filled with organic packing materials. It is essential to choose the material with adequate physical and chemical properties, such as high surface area, long-term physical stability, low pressure drop, low cost, good moisture retention, pH buffering capacity, nutrients and appropriate adsorbing capacity (Shareefdeen and Singh 2005). In fact, a great variety of packing materials have been tested in BFs, such as peat, compost bark, and wood chips (Ivanpour et al. 2005; Malhautier et al. 2005). BTFs use an inert packing material and a liquid phase that trickles through the bed and provides nutrients to the biofilm. Because of their relatively small footprint, BTFs do not need much ground area, but do usually reach high pollutant removals (Kennens and Veiga 2013).

Several studies have proven the successful application of these biotechnologies for the removal of styrene from gas emissions, although the comparison of BFs and BTFs has not been evaluated. Arnold et al. (1997) investigated styrene removal in a peat BF (residence time of 81 s). Inlet

concentrations ranging between 50 and 1,200 mg m⁻³ were applied, and an average elimination capacity (EC) of 12 g m⁻³ h⁻¹ with a maximum of 30 g m⁻³ h⁻¹ was obtained. Dehghanzadeh et al. (2005) used a BF packed with yard waste compost mixed with shredded hard plastic and observed a maximum EC of 45 g m⁻³ h⁻¹ at an inlet load (IL) of 60 g m⁻³ h⁻¹ and an empty bed residence time (EBRT) of 120 s. Novak et al. (2008) reported a maximum EC of 11.3 g C m⁻³ h⁻¹ at an IL of 18.6 g C m⁻³ h⁻¹ in a BTF packed with polypropylene Pall rings working with an EBRT of 35 s.

Currently, more interest is aimed at opening the black box of biofiltration by unravelling the biodiversity–ecosystem function relationship (Cabrol and Malhautier 2011). In the case of the removal of styrene, the ability of the genus *Pseudomonas* for the degradation of this compound under aerobic conditions has been reported. Okamoto et al. (2003) tested the *Pseudomonas putida* strain ST201 in flask experiments, achieving complete styrene degradation after 48 h at concentrations up to 600 mg l⁻¹. Jang et al. (2004) used *Pseudomonas* sp. SR-5 as a styrene-degrading bacterium in two BFs packed with peat and a ceramic material, reporting maximum ECs of 236 and 81 g m⁻³ h⁻¹ for the peat and ceramic BF, respectively. Paca et al. (2001) observed the predominance of *Pseudomonas aeruginosa* strains working at pH above 5 in four perlite BFs at EBRTs varying from 6.5 s to 26 s and inlet concentrations from 200 to 1,000 mg m⁻³.

Among the inoculation procedures which were applied in the start-up of bioreactors treating styrene emissions, the use of two different inoculum sources has been used: enriched cultures with styrene-degrading strains (Okamoto et al. 2003; Jang et al. 2004; Kim et al. 2005) and activated sludge from wastewater treatment plants (WWTPs) (Juneson et al. 2001; Sempere et al. 2011). From an industrial point of view, the choice of activated sludge as an inoculum presents advantages due to the ease of implementation and lower operational costs.

The purpose of this work is to investigate the removal of styrene from air emissions by using two types of bioreactors and to compare both procedures of inoculation on the basis of their influence on the system performance and the evolution of the microbial community. For this purpose, the following objectives have been taken into consideration: (1) to evaluate the behaviour of one BF packed with peat, another with coconut fibre and one BTF packed with plastic rings. The bioreactors were operated at several EBRTs and at a range of inlet concentrations representative of emissions from industries producing polystyrene; and (2) to analyse the effect on the systems of using two sources of inoculum: an enriched culture of the strain *P. putida* CECT 324 in the BFs and activated sludge from a municipal WWTP in the BTF. To the best of our knowledge, this is the first work which includes a comparison of the performance and microflora of bioreactors inoculated with an enriched culture or with an activated sludge. The microbial community was studied by

fluorescence in situ hybridisation (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis.

Materials and methods

Inoculation procedures

The inoculation of the BFs was performed with 1 l of enriched culture of the strain *P. putida* CECT 324 (named here as inoculum 1). The following protocol was developed for the inoculum preparation: (1) the strain *P. putida* CECT 324 was supplied from the Spanish Type Culture Collection (CECT). This species was selected for the inoculation process since previous studies have reported that *P. putida* is suitable for degrading styrene (Okamoto et al. 2003). (2) The strain CECT 324 was grown in 50-ml sterile flasks containing 20 ml of nutrient Broth/Agar II medium (composition: 1 g l⁻¹ beef extract, 2 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ peptone, 5 g l⁻¹ NaCl, pH: 7.2) at 30 °C in a rotary shaker at 100 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). (3) After 1 week, 250 ml of the concentrated pure culture was introduced into one aerated batch reactor and diluted with 750 ml of nutrient Broth/Agar II medium. The batch reactor was aerated using non-sterile air and was continuously fed with styrene at a rate of 0.15 ml h⁻¹ for a period of 30 days.

The inoculation of the BTF was performed with 1 l of activated sludge (named here as inoculum 2) from a municipal WWTP located in Quart-Benager (Valencia, Spain), which was continuously recirculated over the bed for a period of 24 h.

BFs set-up and operational conditions

Two laboratory-scale BFs were operated in parallel. One BF (BF1-P) was packed with fibrous peat (ProEco Ambiente, Spain) and another (BF2-C) with coconut fibre (Pure Air Solutions, the Netherlands). The physical and chemical properties of these materials are shown in Table 1. The peat was acidic, so pH adjustment until neutral pH was achieved by using diluted sodium hydroxide solution prior to the start-up.

The schematic of the experimental set-up of the BFs is shown in Fig. 1a. Each BF was made from methacrylate, with a total length of 97 cm, an internal diameter of 13.6 cm (volume of 14 l) and was equipped with five sampling ports to measure VOC concentrations along the bed of the column, located at 0 (inlet port), 25, 50, 75 and 97 (outlet port) cm of column height. Four additional ports were used to extract packing material samples located at 20, 40, 60 and 80 cm. A 10-cm head space was used for the waste gas inlet and for water/nutrient feed, while a 10-cm bottom space was used for the treated air outlet and leachate. Prior to introduction into the BFs, the compressed, filtered and dry air was passed through

Table 1 Physical and chemical properties of packing materials

	Peat	Coconut fibre
pH	4.8	6.8
Water-holding capacity (%)	88.0	60.0
Bulk density (kg m ⁻³)	133.0	60.0
Organic matter content (%)	95.0	93.8
Specific surface area BET (m ² g ⁻¹)	13.4	0.9
Chemical analysis		
Carbon (%)	48.5	47.8
Hydrogen (%)	5.8	5.8
Oxygen (%)	40.0	42.8
Nitrogen (%)	0.6	0.1
Sulphur (%)	0.1	0.0
Flexiring rings		
Specific surface area (m ² m ⁻³)	207.0	
Void fraction (%)	92.0	
Bulk density (kg m ⁻³)	71.0	
Ring diameter (mm)	25.0	

the humidifier to assure a relative humidity value of at least 90 %. The air stream was contaminated with styrene by using a syringe pump (New Era; infusion/withdraw NE 1000 model, USA) and fed to the BFs through the top of the column flowing downwards into the bed. The gas flow rate was adjusted by a mass flow controller (Bronkhorst Hi-Tec, the Netherlands).

The macro- and micro-nutrients were incorporated by pouring 50 ml per day of a nutrient solution buffered at pH 7 (22.4 g KNO₃ l⁻¹, 2.4 g KH₂PO₄ l⁻¹, 0.4 g K₂HPO₄

l⁻¹, 0.9 g MgSO₄·7H₂O l⁻¹, and Ca, Fe, Zn, Co, Mn, Na, Ni, B, I, Se, Cr, Cu and vitamins at trace doses). The moisture content of the packing material was controlled by adding 50 and 150 ml per day of deionised water on top of the BF with peat and coconut fibre, respectively. This difference in the spraying volume was because peat has a higher water-holding capacity than coconut fibre — 88 % and 60 %, respectively.

The two BFs were operated in parallel under different operational conditions for more than 5 months under continuous loading. Operational conditions in BFs are shown in Table 2. During the first 3 months, the BFs were operated at EBRTs between 90 and 120 s and ILs between 12 and 24 g m⁻³ h⁻¹. After this period, four different stages (1–4) were performed. EBRTs were set at values of 45, 60 and 90 s, and inlet concentrations ranged between 250 and 1,300 mg Nm⁻³ (corresponding to ILs varying from 15 to 45 g m⁻³ h⁻¹, Table 2). In situ emissions from industries producing polystyrene were previously monitored and found to oscillate between 200 and 400 mg Nm⁻³. Therefore, the inlet concentrations tested on this work covered the typical values of the emissions coming from the industrial manufacturing of polystyrene. Each stage was carried out within a minimum period of 10 days.

BTF set-up and operational conditions

After ending the operation of the BFs, another experiment using a BTF was performed in order to compare the use of different bioreactors and inoculation procedures. The BTF was filled with polypropylene rings (Flexiring, Koch-Glitsch

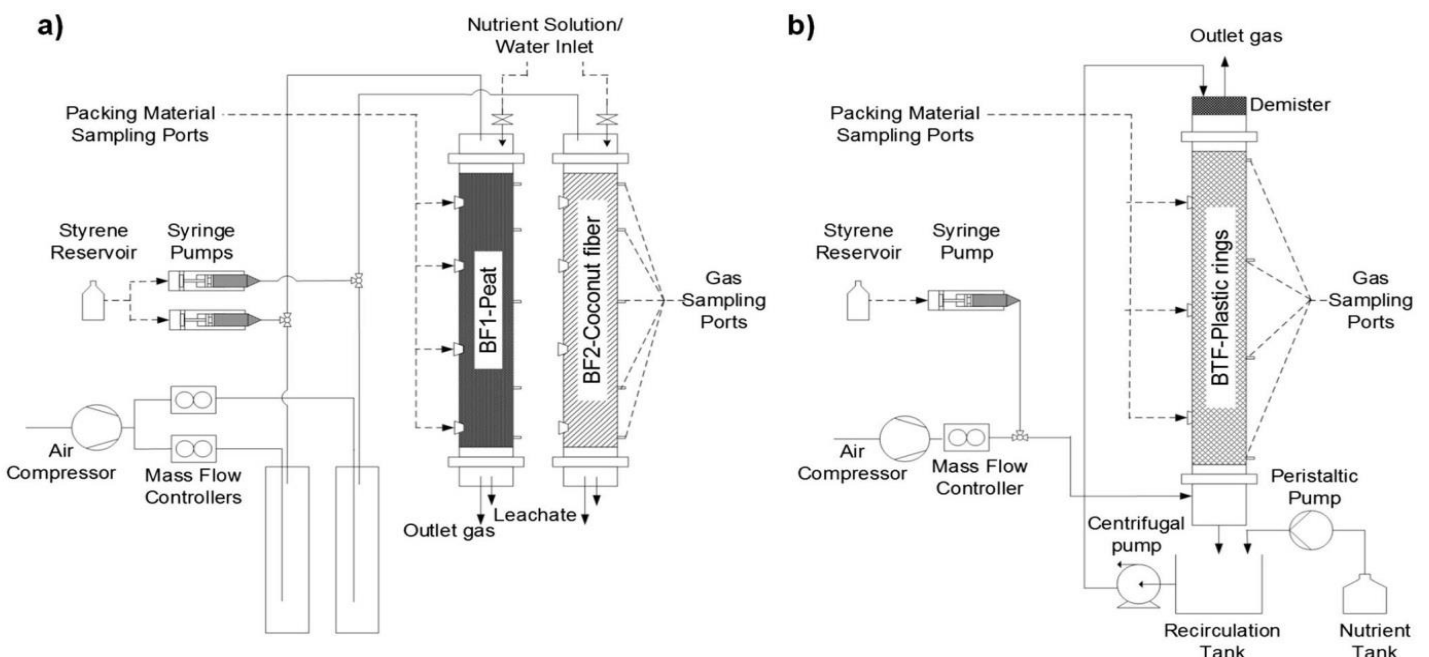


Fig. 1 Schematic of experimental set-up: **a** BFs system; **b** BTF system

Table 2 Operational conditions in both BFs and in BTF for the removal of styrene

Stages		Start-up	1	2	3	4	5	6
BF1	Day	0–84	84–122	122–138	138–152	152–162		
Peat	Inlet conc. (mg Nm ⁻³)	300–790	335	750	275	560		
	EBRT (s)	90–120	60	60	45	45		
	IL (g m ⁻³ h ⁻¹)	12–24	22	45	22	45		
BF2	Day	0–84	84–114	114–129	129–142	142–162		
Coconut fibre	Inlet conc. (mg Nm ⁻³)	300–790	335	375	550	1,125		
	EBRT (s)	90–120	60	90	90	90		
	IL (g m ⁻³ h ⁻¹)	12–24	22	15	22	45		
BTF	Day	0–20	20–45	45–67	67–87	87–109	109–133	133–155
Flexiring rings	Inlet conc. (mg Nm ⁻³)	200	300	375	468	350	475	180
	EBRT (s)	60	60	60	60	45	45	30
	IL (g m ⁻³ h ⁻¹)	12	18	22	28	28	38	22

B.V.B.A., Belgium) of 25 mm nominal diameter and a surface area of 207 m² m⁻³ whose physical characteristics are shown in Table 1. The schematic of the experimental set-up of the BTF is shown in Fig. 1b. The BTF was made from methacrylate (bed length of 123 cm, internal diameter of 14.4 cm, volume of 20 l). The BTF was equipped with four gas sampling ports (0 (inlet port), 44, 86, and 123 (outlet port) cm) and three media sampling ports (20, 63 and 105 cm). Similar equipment as the BFs was used to contaminate the air stream, which was introduced through the bottom of the column. A 3-l recirculation tank, partially renewed every week, was used to feed the recirculation solution into the bioreactor in counter-current mode with respect to the air flow using a centrifugal pump at 2.5–3 l min⁻¹ for 15 min every 2 h.

A nutrient solution buffered at pH 8 (9.7 g NH₄Cl l⁻¹, 0.9 g MgSO₄·7H₂O l⁻¹, 2.2 g (NH₄)₂HPO₄ l⁻¹, 0.5 g NaHCO₃ l⁻¹, 0.4 g NaOH l⁻¹, 0.6 g KCl l⁻¹ and Ca, Fe, Zn, Co, Mn, Na, Ni, B, I, Se, Cr, Cu and vitamins at trace doses) was supplied to the recirculation tank using a peristaltic pump. The nutrient solution flow rate was maintained at a mass ratio of carbon and nitrogen of 25 in order to assure that the nitrogen concentration in the recirculation solution was not limiting the biodegradation process, corresponding to a flow rate of nutrients between 32 and 160 ml day⁻¹.

The BTF was operated for more than 5 months under continuous loading. Operational conditions applied to the BTF are shown in Table 2. In the first 20 days, an EBRT of 60 s and an inlet concentration of 200 mg Nm⁻³ were applied. Afterwards, six different stages (1–6) were performed over 5 months. In the first three stages, an EBRT of 60 s and inlet concentrations ranging between 300 and 468 mg Nm⁻³ were applied (Table 2). At stages 4 and 5, the EBRT was decreased from 60 to 45 s. The maximum inlet concentration was applied (475 mg Nm⁻³) in stage 5. At stage 6, the EBRT was decreased to 30 s in order to evaluate the minimum EBRT that

allows high RE and stable performance. Each stage was carried out for a minimum period of 20 days.

Analytical methods

The styrene concentration was measured using a total hydrocarbon analyser (Nira Mercury 901; Spirax Sarco, Spain). The inlet and outlet gas streams were monitored daily while the intermediate ports were monitored at a minimum of two times for each stage. The response factor of the total hydrocarbon analyser was determined by gas chromatograph (model 7890; Agilent Technologies, USA) equipped with a 1-ml automated gas valve injection system, a flame ionisation detector and an Rtx[®]-VMS capillary column (30 m×0.25 mm×1.4 μm). The gas carrier was helium at a flow rate of 1.3 ml min⁻¹. The injector, oven and detector temperatures were 250 °C, 100 °C and 240 °C, respectively. The pressure drop was monitored at a minimum of once a week (KIMO, MP101 model, Spain). The CO₂ concentrations in the inlet and outlet gas streams were measured once a week using a CARBOCAP[®] carbon dioxide analyser (GM70 model; Vaisala, Finland).

The conductivity and pH of the leachate from BFs were determined daily (pH/Cond 340i; WTW, Germany) and the moisture content of the media was measured at a minimum of two times in each experimental stage using the dry weight method at two locations: at 20 cm from the inlet (top zone) and at 80 cm from the inlet (bottom zone). The conductivity and pH of the BTF recirculation solution were determined daily (pH/Cond 340i; WTW, Germany). In addition, the total organic carbon and inorganic carbon (TOC-V_{CHS}; Shimadzu, Japan), suspended solids (SS), volatile suspended solids (VSS) and NO₃⁻, NH₄⁺ and PO₄³⁻ concentrations were measured twice a week (Ionic Chromatograph 883 Basic IC Plus).

DNA isolation, PCR and DGGE

The presence of *P. putida* in both BFs was checked by DGGE analysis. DNA was isolated from the pure culture of *P. putida* CECT 324, from the enriched culture prior to inoculation (inoculum 1) and from the bed samples of each BF at 105, 142 and 156 days of operation. Bed samples (5 ml) were taken from the bottom port (located at 80 cm from the inlet) suspended in 15 ml sterile distilled water and disaggregated with an Ultra-Turrax (IKA® T18 basic, Germany). The DNA isolation was performed using a FastDNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals, Illkirch, France) and was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The extracted DNA was amplified by PCR using two universal primers targeting the 16S rRNA gene for eubacteria: primer F357GC containing a CG clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and primer R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). PCRs were performed in a thermal cycler (LongGene Scientific Instruments, Hangzhou) with a 50- μl reaction volume of a mixture containing final concentrations of 1.25 units of Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTPs, 2 mM Mg^{2+} and 0.5 μM of each primer (EuroClone, Italy). PCR conditions (Muyzer and Ramsing 1993) consisted of 20 cycles of: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, a touchdown annealing step of $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ increments from $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and followed by $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min. For DGGE analysis, 20 μl of PCR product generated from each sample was separated on an 8 % acrylamide gel running in a linear denaturant gradient increasing from 35 % to 60 % using a KuroGel Verti 2020 DGGE System (VWR international Eurolab S.L.). The gel was run at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min at 50 V, 120 min at 150 V and 60 min at 200 V.

Fluorescence in situ hybridisation

The FISH technique was carried out adapting the procedure described by Amann et al. (2001). Bed samples from the bottom port of both BFs at days 105, 142 and 156 were analysed. Biofilm samples taken from the bottom port (located at 20 cm from the inlet) and the top port (located at 105 cm from the inlet) from BTF at days 65 and 165 were analysed. Inoculum samples of the BFs (inoculum 1) and the BTF (inoculum 2) were analysed as well.

The samples (5 ml for the samples of the BFs, 1 ml for the BTF and the inoculum samples) were suspended in 15-ml sterile distilled water and disaggregated with an Ultra-Turrax (IKA® T18 basic, Germany). The samples were fixed using the procedure described by Amann et al. (2001). According to the procedure, Gram-negative cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and Gram-positive cells with ethanol. Oligonucleotide probes targeting the phylogenetic groups Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria were analysed. Furthermore, the

evolution of *Pseudomonas* sp. and *P. putida* was monitored. An equimolar mixture of EUBI, EUBII, and EUBIII probes were used to detect all eubacteria. Probes sequences and their formamide percentage are summarised in Table 3 (Loy et al. 2007). In the hybridisation, the general EUB_{mix} probe was labelled with Cy5, while taxonomic specific probes were labelled with Cy3 (Thermo Fisher Scientific, Germany). Hybridisation was performed at $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. After the hybridisation step, slides were rinsed for 18 min at $48\text{ }^{\circ}\text{C}$, dried, mounted and examined using a confocal laser scanning microscope (FV 1000 Olympus, Japan). Specific probes were quantified as a proportion of EUB_{mix}-labelled bacteria using image analysis based on the methodology developed by Jubany et al. (2009).

Results

BF performance

The performance of the two BFs treating styrene emissions, BF1-P packed with peat and BF2-C with coconut fibre is shown in Fig. 2. At day 0, each BF was inoculated with the enriched culture of *P. putida* CECT 324 (inoculum 1) whose SS concentration and percentage of VSS were 1.7 g l^{-1} and 71 %, respectively. Following inoculation, the bioreactors were operated during 84 days at mild conditions, corresponding to EBRTs between 90 and 120 s and inlet concentrations between 300 and 790 mg Nm^{-3} , in order to develop a suitable active biofilm on the surface of the packing material. BF1-P showed a gradual increase in the removal efficiency (RE) until reaching 99 % on day 60 (Fig. 2a). From this day, a progressive decrease in the removal of styrene occurred until day 64, from which REs fluctuated in $35\pm 8\%$. Pressure drop measurements in BF1-P showed a sudden increase on day 37 (Fig. 2c). The pressure drop rose from a value of 98 Pa m^{-1} (day 37) to 490 Pa m^{-1} (day 41), and reached a maximum value of 931 Pa m^{-1} on day 52 indicating compaction of the bed (Fig. 2c). BF2-C showed a gradual increase in the RE until reaching 95 % on day 52 (Fig. 2b). From days 53 to 84, RE oscillated in $78\pm 13\%$. No bed compaction was detected in BF2-C, the pressure drop was maintained in stable values as low as 10 Pa m^{-1} from days 1 to 84 (Fig. 2d).

After nearly 3 months of operation, an EBRT of 60 s and an average inlet concentration of $372\pm 14\text{ mg Nm}^{-3}$ were applied in both BFs (stage 1). During this stage, an average outlet concentration of $166\pm 15\text{ mg Nm}^{-3}$ (RE of 55 %) was observed in BF1-P from day 84 to day 110 (Fig. 2a). On day 110, the pressure drop retained values as high as 800 Pa m^{-1} (Fig. 2c), so the reactor was opened and the packing material was manually decompressed. Upon restoration of operation, the pressure drop decreased to 170 Pa m^{-1} (Fig. 2c) and the RE increased to a value of 95 %. From day 110, RE was kept at values higher than 95 % (average outlet concentration of $23\pm 9\text{ mg Nm}^{-3}$) until the

Table 3 List of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Specificity	Sequence (5'-3')	Formamide (%)
EUB338 ^a	Most bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0–50
EUB338-II ^a	Other bacteria not detected by EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0–50
EUB338-III ^a	Other bacteria not detected by EUB338	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0–50
ALF968	α-Proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20
BET42A	β-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	35
–	Competitor for BET42A	GCCTTCCCACATCGTTT	35
GAM42A	γ-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	20
–	Competitor for GAM42A	GCCTTCCCACATCGTTT	20
DELTA495A ^b	δ-Proteobacteria	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	35
DELTA495B ^b	δ-Proteobacteria	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	35
DELTA495C ^b	δ-Proteobacteria	AATTAGCCGGTGCTTCCT	35
–	Competitor for DELTA495A	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	35
–	Competitor for DELTA495B	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	35
–	Competitor for DELTA495C	AATTAGCCGGTGCTTCCT	35
HGC69A	Actinobacteria (high G + C gram positive bacteria)	TATAGTTACCACCGCCGT	25
–	Competitor for HGC69A	TATAGTTACGCGCCCGCT	25
LGC354A ^c	<i>Firmicutes</i> (low G + C gram positive bacteria)	TGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354B ^c	<i>Firmicutes</i> (low G + C gram positive bacteria)	CGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354C ^c	<i>Firmicutes</i> (low G + C gram positive bacteria)	CCGAAGATTCCCTACTGC	35
PS56a	<i>Pseudomonas</i> sp.	GCTGGCCTAGCCTTC	20
PPu56a	<i>Pseudomonas putida</i>	GCTGGCCTAACCTTC	20

^a EUB338, EUB338-II, EUB338-III were used in the mixture called EUB_{mix}

^b DELTA495A, DELTA495B, DELTA495C were used in the mixture called DELTA_{mix}

^c LGC354A, LGC354B, LGC354C were used in the mixture called LGC_{mix}

end of stage 1 (day 122). In the BF2-C, an outlet concentration of 106±20 mg Nm⁻³ (RE of 72 %) was observed for the whole stage 1 (Fig. 2b). The pressure drop in BF2-C was kept below 30 Pa m⁻¹ for the entire stage 1 (Fig. 2d).

Due to the different performances of both BFs at the end of stage 1 (with a higher RE for BF1-P than BF2-C), different values of EBRTs were chosen for stage 2. It was decided to lower the EBRT in BF1-P and increase it in BF2-C in order to determine the minimum EBRT that allows high efficiency in each system. In stage 2, BF1-P presented REs of ~70 % using inlet concentrations of 782±20 mg Nm⁻³ (EBRT of 60 s). BF2-C showed REs >90 % (outlet concentrations below 40 mg Nm⁻³) using lower inlet concentrations (368±15 mg Nm⁻³) and a higher EBRT (90 s).

In stage 3, the same IL (22 g m⁻³ h⁻¹) was applied in both BFs. The EBRT in BF1-P was decreased to 45 s and the inlet concentrations (282±18 mg Nm⁻³) were set to apply the same IL value as stage 1, obtaining outlet concentrations of 14±10 mg Nm⁻³ (RE of 95 %). The EBRT in BF2-C was maintained for 90 s and the inlet concentrations were increased to 585±18 mg Nm⁻³, reaching outlet concentrations

below 110 mg Nm⁻³ (RE ~80 %). At an IL of 22 g m⁻³ h⁻¹, BF1-P working at an EBRT of 45 s achieved higher REs than BF2-C working at twice the EBRT. In stage 4, a maximum IL of 45 g m⁻³ h⁻¹ was applied to both BFs maintaining the same EBRTs as in stage 3. The average inlet concentrations of 580±10 and 1,085±67 mg Nm⁻³ were applied in BF1-P and BF2-C, respectively. The RE decreased in both BFs: from 95 % to 62 % in BF1-P and from 80 % to 47 % in BF2-C. From day 148, pressure drops fluctuated between 637 and 784 Pa m⁻¹ (Fig. 2c) in BF1-P, indicating the presence of compaction problems in the peat bed. Maximum pressure drop in BF2-C was 59 Pa m⁻¹ (day 154, Fig. 2d).

In BF1-P, the moisture content was maintained at ~80 % for both sampling ports (top and bottom) when EBRTs greater than 60 s were applied (stages 1–2, average value of 80.6±3.1 %, Fig. 2c). On day 162, the moisture content decreased until 63 % in the top and 50 % in the bottom after 24 days working at 45 s of EBRT (Fig. 2c). In BF2-C, the average moisture content in the start-up period was 51.4±7.4 % and from day 84 the average moisture content was 66.6±6.5 % and 70.6±11.4 % in the top and bottom locations, respectively

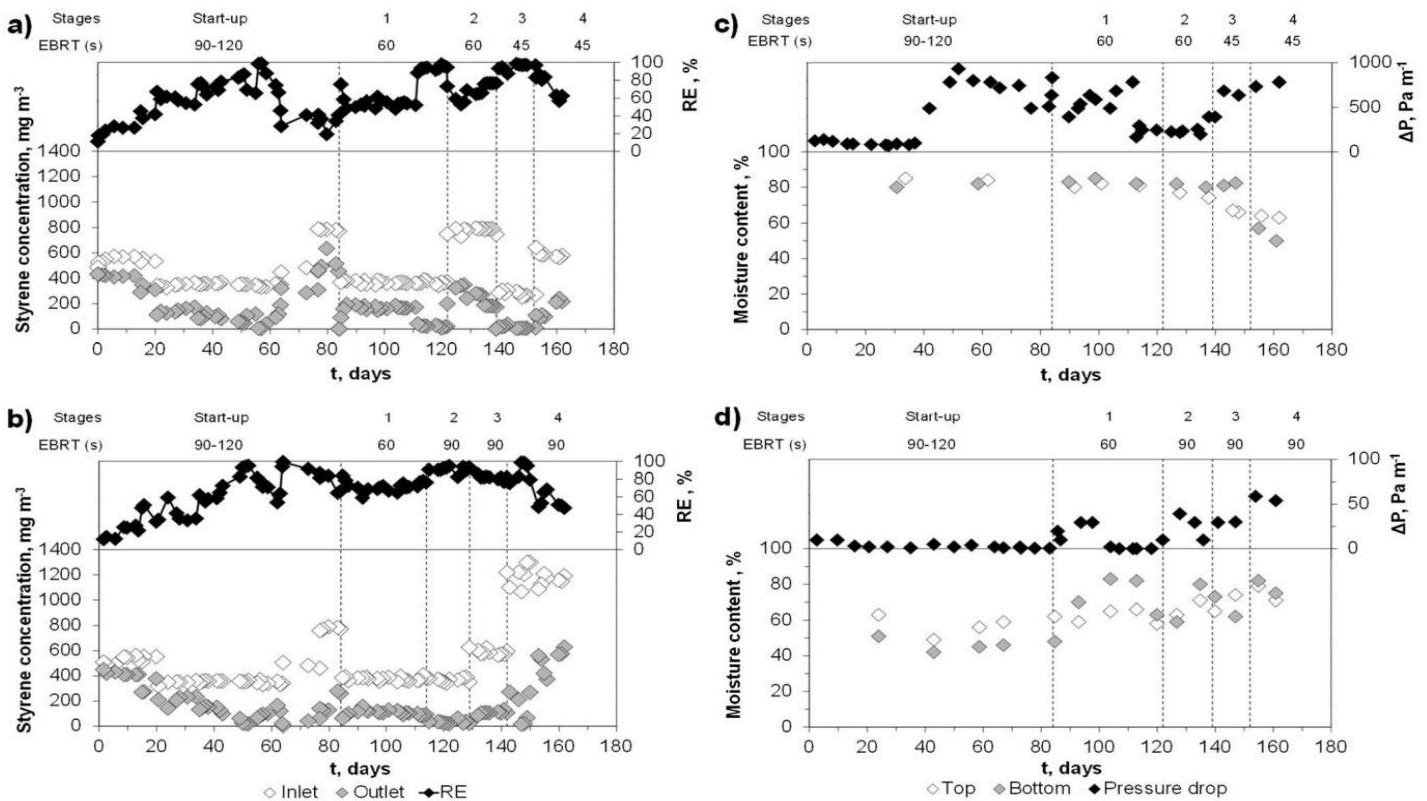


Fig. 2 Evolution of the RE (black diamond), inlet concentration (white diamond) and outlet concentration (grey diamond) in the BFs: **a** peat BF (BF1-P) and **b** coconut fibre BF (BF2-C). Evolution of pressure drop

(black diamond) and moisture content in the top (white diamond) and in the bottom (grey diamond) for the BFs: **c** peat BF (BF1-P) and **d** coconut fibre BF (BF2-C)

(Fig. 2d). The average pH of the leachate was 8.4 ± 0.5 and 8.8 ± 0.3 in BF1-P and BF2-C, respectively. The average conductivity of the leachate was 3.8 ± 1.9 and 6.2 ± 1.5 mS cm⁻¹ in BF1-P and BF2-C, respectively.

BTF performance

The performance of the BTF is shown in Fig. 3. At day 0, the BTF was inoculated with the activated sludge (inoculum 2), whose SS concentration and percentage of VSS were 7.3 g l⁻¹

and 78 %, respectively. During the first 20 days, the system was operated at styrene inlet concentrations of 216 ± 14 mg Nm⁻³ and an EBRT of 60 s. After the first week, the BTF was able to reach a RE of 94 % (Fig. 3a). In stage 1, the inlet concentration was raised to a value of 290 ± 12 mg Nm⁻³ and the RE was maintained at ~90 %. In stages 2 and 3, average inlet concentrations of 391 ± 13 and 444 ± 39 mg Nm⁻³ were applied, respectively. REs of ~75 % were obtained in both stages corresponding to average outlet concentrations of 99 ± 28 and 109 ± 40 mg Nm⁻³, respectively. It is worth noting that on day 70,

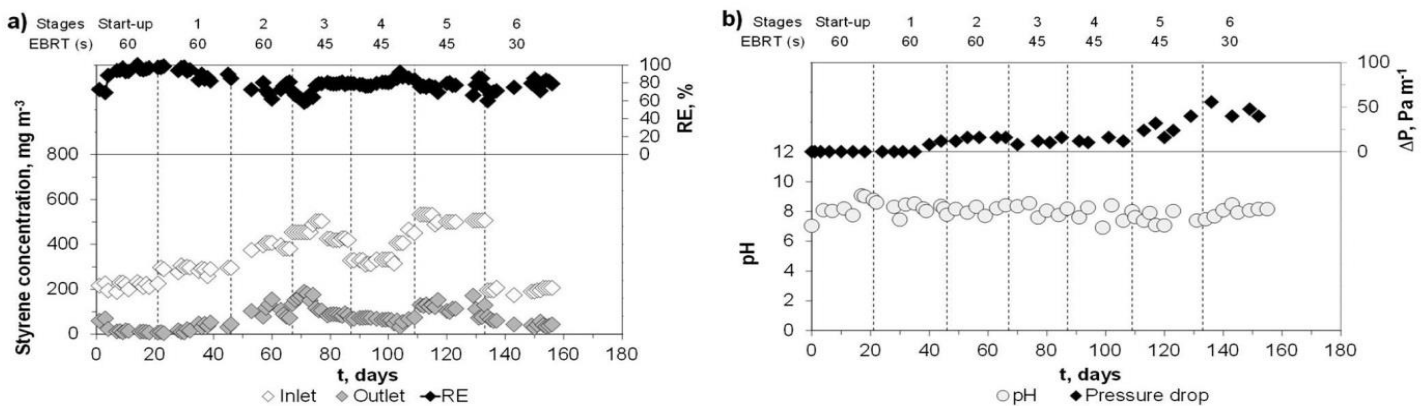


Fig. 3 **a** Evolution of the RE (black diamond), inlet concentration (white diamond) and outlet concentration (grey diamond) in the BTF. **b** Evolution of pressure drop (black diamond) and pH (black circle)

the RE dropped to 62 % because of the limitation of nutrients, since the phosphate concentration (PO_4^{3-}) in the recirculation tank was $<1 \text{ mg P l}^{-1}$ due to a maintenance failure. Afterwards, the phosphate concentration was kept $>30 \text{ mg P l}^{-1}$ for the rest of the experiment. The RE was successfully recovered to 77 % on day 75 (Fig. 3a). From stage 4, the EBRT was decreased to 45 s and average inlet concentrations of $355 \pm 50 \text{ mg Nm}^{-3}$ (stage 4) and $512 \pm 15 \text{ mg Nm}^{-3}$ (stage 5) were applied. Average outlet concentrations of 64 ± 10 and $115 \pm 25 \text{ mg Nm}^{-3}$ (REs about 80 %) were obtained for stages 4 and 5, respectively. In stage 6, the minimum tested EBRT was applied (30 s). The RE was 80 % with an average outlet concentration of $45 \pm 11 \text{ mg Nm}^{-3}$. The pressure drop was maintained in low values ranging between 1 and 60 Pa m^{-1} during the whole experimental period (Fig. 3b).

During the operation of the BTF, a liquid volume of 3 l was maintained in the recirculation tank with a weekly purge of 1.5 l. Average values of pH and conductivity were 8.1 ± 0.5 and $7.3 \pm 2.4 \text{ mS cm}^{-1}$ (Fig. 3b). Average values of ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-) and phosphate (PO_4^{3-}) concentrations were 24.6 ± 16.0 , 1.7 ± 2.9 and $121.5 \pm 80.2 \text{ mg l}^{-1}$, respectively. The average concentration of SS was $480 \pm 408 \text{ mg l}^{-1}$ with a percentage of VSS of $83 \pm 8 \%$. The average amount of total organic carbon was $146 \pm 59 \text{ mg C l}^{-1}$. In all cases, solvent removal with the purge represented less than 1 % of the total amount of added styrene during the week. Thus, the organic carbon in the purge was considered negligible for the evaluation of the BTF performance in terms of EC and RE.

Relationship between EC and IL

The relationships between EC and IL calculated from the inlet to each intermediate sampling port (first quarter, half and three quarter of the BFs and the first third, half and two third of the BTF) and for the whole volume of the bioreactors are plotted in Fig. 4. The three bioreactors performed near complete degradation with an IL of $40 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for the whole range of tested EBRT. Maximum ECs of 81 and $39 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ were obtained for BF1-P and BF2-C, respectively, with REs $\sim 45 \%$ (IL of $173 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ at EBRT of 60 s in BF1-P, Fig. 4a; IL of $89 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ at EBRT of 90 s in BF2-C, Fig. 4b). A maximum EC of $52 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ was obtained for BTF with a RE of 45 % (IL of $116 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, EBRT of 45 s; Fig. 4c). The comparison of the behaviour of the three reactors when working at an EBRT of 60 s and an IL of $\sim 75 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ indicates that BF1-P and BTF presented a similar value of EC $\sim 40 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4a,c) unlike BF2-C, which showed a lower EC of $\sim 30 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4b). By decreasing the EBRT to 45 s, both BF1-P and BTF resulted in similar values with ECs of $\sim 55 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for an IL $\sim 85 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4a,c).

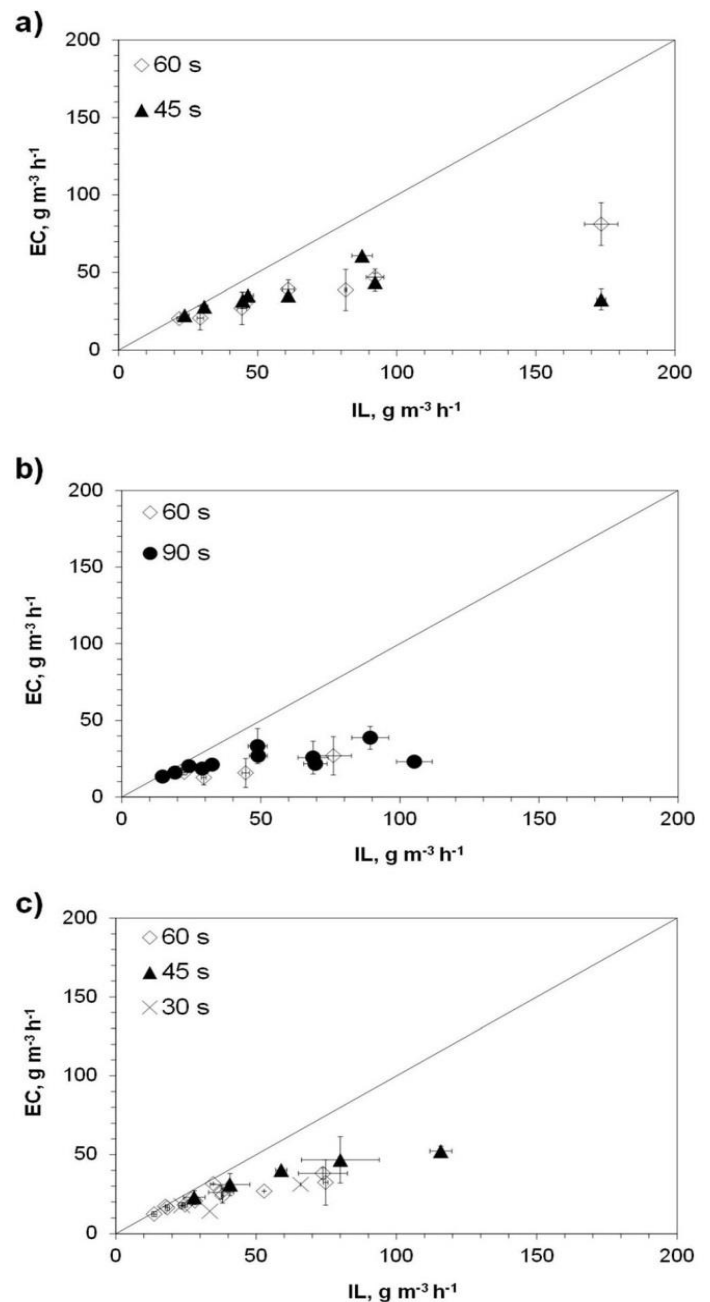


Fig. 4 EC vs. IL for different EBRT 30 s (\times), 45 s (black triangle), 60 s (white diamond) and 90 s (black circle): **a** peat BF (BF1-P), **b** coconut fibre BF (BF2-C) and **c** BTF

Carbon dioxide production

The evolution of CO_2 production (calculated for the whole bed volume) as a function of the EC is presented in Fig. 5 for the three bioreactors. A proportional ratio exists between EC and CO_2 production. Linear regressions for these data resulted in values of 2.57, 2.81 and $2.34 \text{ g CO}_2/\text{g styrene}$ in BF1-P (Fig. 5a), BF2-C

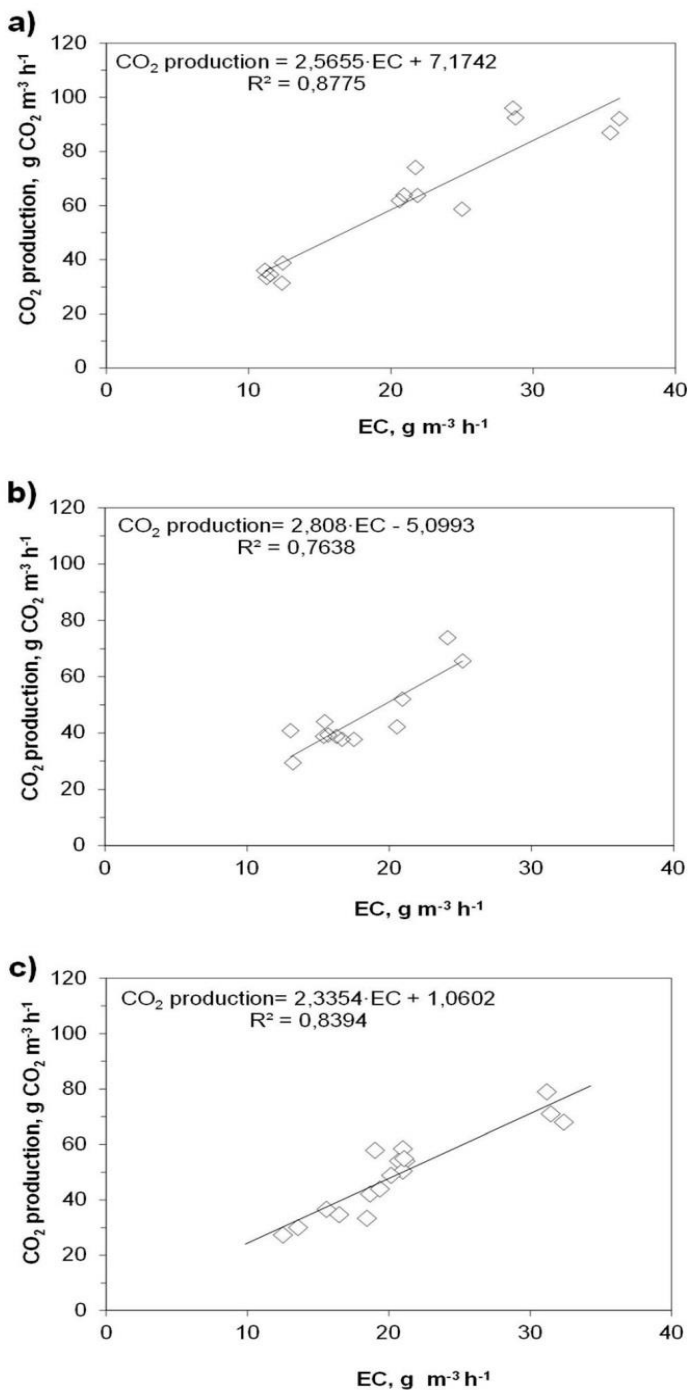
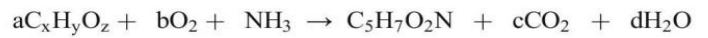


Fig. 5 Production of carbon dioxide vs. EC obtained during experimental period: **a** peat BF (BF1-P), **b** coconut fibre BF (BF2-C) and **c** BTF

(Fig. 5b) and BTF (Fig. 5c), respectively. These values are comparable to the ratio of 2.78 g CO₂/g styrene reported by Rene et al. (2010) by using a fungal monolith bioreactor.

Assuming a general biomass composition formula of C₅H₇O₂N, overall yield coefficients defined as g of dry

biomass synthesised per gram of substrate consumed can be determined from the biodegradation reaction balance:



resulting in values of 0.42, 0.30 and 0.54 g of dry biomass produced per g of styrene consumed for BF1-P, BF2-C and BTF, respectively. The greater yield coefficient observed in the BTF (0.54 g g⁻¹) indicates that a higher biomass growth occurred. This fact could be associated with the trickling liquid that allows better control of parameters such as pH and better distribution over the bed of nutrients and substrates.

Microbiological studies

Denaturing gradient gel electrophoresis

DGGE was applied in order to check the presence of *P. putida* in the BFs. Figure 6 shows the DGGE banding patterns of samples from: the pure culture (*P. putida* CECT 324), the enriched culture of strain CECT 324 prior to inoculation (inoculum 1) and the samples from BFs at days 105, 142 and 156 of operation. DGGE patterns showed three dominants bands for the pure culture (bands A, B and C; Fig. 6, lane 1). Similar band intensities of bands A, B and C, corresponding to *P. putida* CECT 324, were detected in the enriched culture sample (inoculum 1; Fig. 6, lane 2). In addition, two new bands D and E appeared in the inoculum 1 (Fig. 6, lane 2). In contrast bands corresponding to *P. putida* CECT 324 did not appear as a dominant species in the BF samples (Fig. 6, lanes

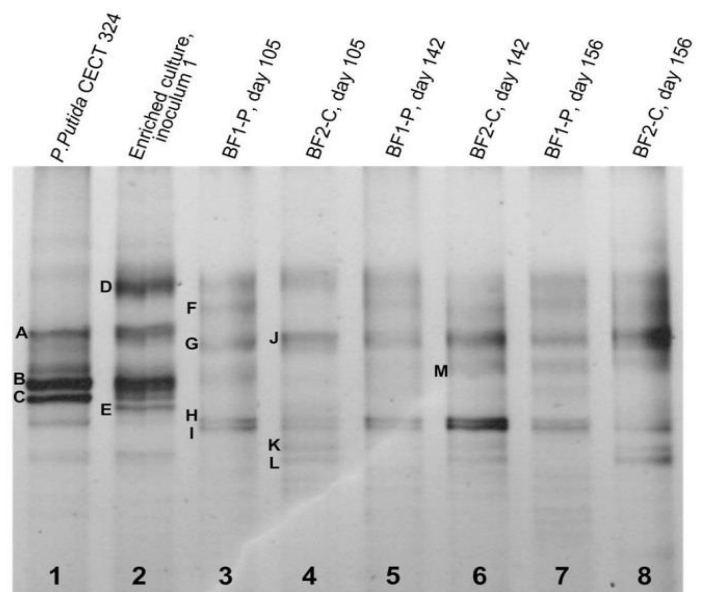


Fig. 6 DGGE image of the *Pseudomonas putida* strain CECT 324, the enriched culture with *P. putida* strain CECT 324 at day 0 (inoculum 1) and BF samples on days 105, 142 and 156 of the experimental period

3–8). BF samples contained multiple DGGE bands — some of them differed for each sample, although some common bands were detected. The bands D, G, H and I were observed for all BF1-P samples over the time period tested, while band J appeared by days 142 and 156 (Fig. 6, lanes 3, 5, and 7). Bands D, H, I, J, K, L were observed for all BF2-C samples, and relative intensities of the bands changed between different sampling times (Fig. 6, lanes 4, 6, and 8). For instance, bands H and I increased at day 142 (Fig. 6, lane 6) and decreased by day 156 (Fig. 6, lane 8). A new band M appeared by days 142 and 156 (Fig. 6, lanes 6 and 8) for BF2-C and by day 156 (Fig. 6, lane 7) for BF1-P. At the end of the experiment, both BFs presented five common dominant bands (D, H, I, J, M; Fig. 6, lanes 7 and 8).

Monitoring of the bacterial community by FISH

The monitoring of the bacterial community was carried out by FISH for the two inoculum and the two BFs: days 105 (stage 1), 142 (stage 3) and 156 (stage 4); and for the BTF: days 65 (stage 2, top and bottom zones) and 165 (stage 6, top and bottom zones). The total percentages of all target phyla were 76.5 and 98.4 % for inoculum 1 and inoculum 2, respectively (Fig. 7a,b,c). Total percentages of all target phyla ranged from 92.0 % to 96.6 %, 55.0 % to 64.9 %, and 88.8 % to 98.8 % for BF1-P, BF2-C, and BTF, respectively (Fig. 7a,b,c). In all samples, the phylum Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria) was more abundant than the phyla Firmicutes and Actinobacteria. Among bacterial groups from both inocula, members of the Gammaproteobacteria (inoculum 1: 30.6 % and inoculum 2: 37.1 %; Fig. 7a,c) followed by Alphaproteobacteria (inoculum 1: 25.8 % and inoculum 2: 20.5 %; Fig. 7a,c) were the most abundant groups. Inoculum 2 showed a higher proportion of Betaproteobacteria (14.4 %), Firmicutes (10.5 %) and Actinobacteria (10.6 %) (Fig. 7c). Regarding the evolution of the bacterial groups, their composition changed over time. For BF1-P, Alphaproteobacteria (32.5 %), and Gammaproteobacteria (22.4 %) were the most abundant groups on day 105, but they declined on day 142, during which more abundance of Actinobacteria (26.5 %) and Deltaproteobacteria (23.2 %) was observed (Fig. 7a). On day 156, Gammaproteobacteria (37.0 %) predominated among other phylogenetic groups. For BF2-C, Alphaproteobacteria (16.3 %) and Gammaproteobacteria (16.2 %) were the most abundant groups by day 105 (Fig. 7b). However, the abundance of Alphaproteobacteria (7.8 %) declined on day 142, and Gammaproteobacteria (17.5 %) and Betaproteobacteria, (13.1 %) were the most abundant groups. At the end of the experiment (day 156), there was a predominance of Gammaproteobacteria (20.4 %). For the BTF, Gammaproteobacteria (bottom: 41.7 %; top: 43.7 %) was the most abundant group on day 65, with slightly higher

values than in the inoculum 2 (Fig. 7c). As shown in Fig. 7c, a predominance of Gammaproteobacteria was maintained (bottom: 24.8 %; top: 30.6 %) till the end of the experiment (day 165), but with a lower relative abundance. Similar results in relative abundances of phylogenetic groups from the bottom and top of the BTF for each sampling day showed that the bacterial community was quite homogeneous along the BTF.

Regarding the relative abundance of *P. putida*, the enriched culture (inoculum 1) showed an abundance of 25.1 % (Fig. 7d), while the activated sludge from a municipal WWTP (inoculum 2) showed a percentage of 1.0 % (Fig. 7f). A different evolution of percentages of *P. putida* over time was observed for both inoculation procedures. In the BFs, the relative abundance of this species was lower than in the inoculum. For BF1-P the relative abundance was 14.7 %, 8.1 % and 24.8 % on days 105 (stage 1), 142 (stage 3) and 156 (stage 4), respectively (Fig. 7d). For BF2, a gradual decrease from a value of 25.1 % in the inoculum 1 to 9.2 % in stage 4 for BF2-C was observed (Fig. 7e). In BTF, the relative abundance of *P. putida* increased from a value of 1.0 % in the inoculum 2 to 14.1 % and 7.7 % in stage 6 in the bottom and top, respectively (Fig. 7f).

Discussion

Two inoculation procedures were compared on the basis of their influence on the performance and the microflora of two types of bioreactors (BF and BTF) in the removal of styrene from air emissions. A slow start-up was observed for the two BFs packed with peat and coconut fibre and inoculated with an enriched culture of *P. putida* CECT 324 (inoculum 1). The adaptation period lasted for 60 days (BF1-P) and 52 days (BF2-C) during which the styrene RE gradually increased from nearly zero removal up to 99 % for BF1-P and 95 % for BF2-C, respectively (Fig. 2a,b). Other authors have studied styrene removal by using BFs inoculated with activated sludge and reported shorter adaptation periods. Arnold et al. (1997) only needed 12 days to achieve 80 % RE with inlet concentrations ranging from 50 to 115 mg m⁻³ in a peat BF inoculated with enriched bacteria obtained from activated sludge of a petrochemical plant. Bina et al. (2004) observed that during a start-up period with inlet concentrations of 315 ± 51 mg Nm⁻³ and EBRT of 360 s, the RE attained 80 % at day 6 in a yard waste compost BF inoculated with activated sludge from municipal WWTP. The slower adaptation period in our work cannot be related to the different inlet concentration, both authors obtained adaptation periods shorter than 2 weeks by using lower or similar inlet concentrations than those used in the present work (540 mg Nm⁻³ for days 1 to 20 and 350 mg Nm⁻³ for days 21 to 60; Fig. 2a,b). It can be inferred that in spite of using a strain of *P. putida*

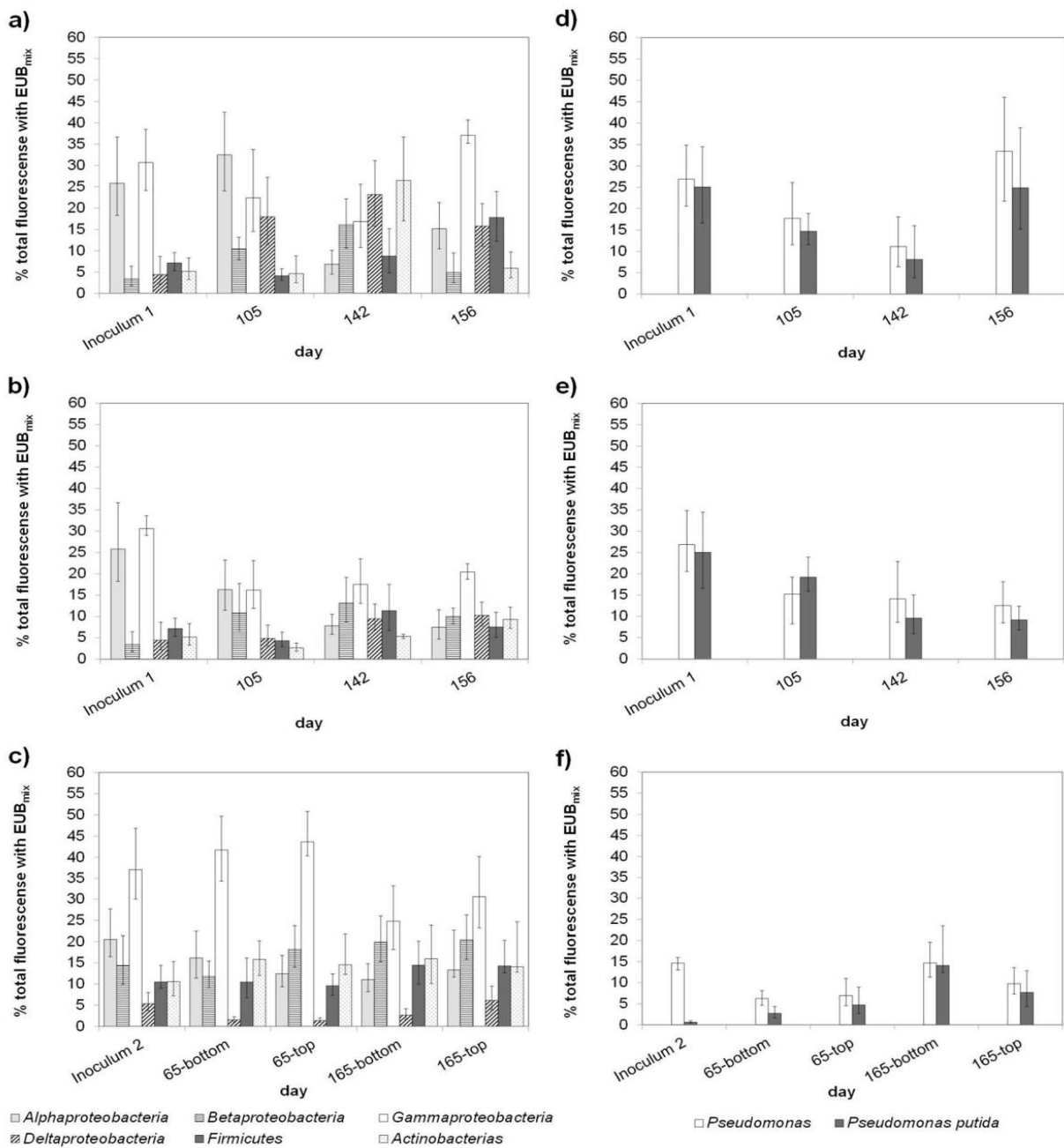


Fig. 7 Time-dependent changes in bacterial community. Results corresponding to general FISH probes in: **a** peat BF (BF1-P), **b** coconut fibre biofilter (BF2-C) and **c** BTF; and specific FISH probes in **d** peat BF

(BF1-P), **e** coconut fibre biofilter (BF2-C) and **f** BTF. Bars represent the upper and lower bounds of the error of the technique

cultivated during 30 days with styrene as a sole carbon source, this inoculation strategy resulted in longer adaptation periods in comparison with using inocula from activated sludge coming from petrochemical or from municipal WWTP. This fact was corroborated by comparing results of BFs and the BTF. In the BTF, a start-up period as short as 7 days was observed by using activated sludge from municipal WWTP as inoculum. The shortness of the adaptation period in comparison with that

obtained in the BFs could be associated to the high bacterial diversity of the activated sludge used as inoculum in BTF.

The results obtained in our study demonstrate that these two types of bioreactors have a good capacity to remove styrene gas emissions at the typical inlet concentrations of emissions from industries producing polystyrene. At inlet concentrations varying from 200 to 400 mg Nm⁻³, REs between 70 % and 95 % were obtained in the three bioreactors

(outlet emissions values ranged between 15 and 125 mg Nm⁻³), demonstrating its suitability as an end-of-pipe control technique.

The comparison of the performance of the two BFs indicates that BF1-P showed higher REs than those observed in BF2-C, even when the peat BF operated at half the value of EBRT than coconut BF. For example, at stage 3 for an IL of 22 g m⁻³ h⁻¹, BF1-P presented a RE of 95 % with an EBRT of 45 s and BF2-C showed an RE of 80 % with EBRT of 90 s. A maximum EC of 81 g m⁻³ h⁻¹ (RE of 45 %, Fig. 4a) was obtained in the peat BF at EBRTs of 60 s while a maximum EC of 39 g m⁻³ h⁻¹ (RE of 45 %, Fig. 4b) was achieved in the coconut fibre BF, but at a higher EBRT of 90 s. Juneson et al. (2001) reported ECs between 69 and 118 g m⁻³ h⁻¹ (REs ranged from 65 to 75 %) by using a BF packed with composted wood bark and yard waste working at EBRTs ranged between 30 and 60 s. Dehghanzadeh et al. (2005) observed maximum ECs of 39 and 27 g m⁻³ h⁻¹ (REs of 63 % and 43 %, respectively) for EBRTs of 60 and 30 s, in a BF packed with yard waste compost mixed with shredded hard plastics. Dion St-Pierre et al. (2009) obtained a maximum EC of 105 g m⁻³ h⁻¹ (RE of 80 %) at an EBRT of 55 s in a BF filled with inorganic media. The maximum EC obtained in the peat BF is included in the range reported by Juneson et al. (2001) and is slightly lower than the maximum EC observed by Dion St-Pierre et al. (2009). The coconut fibre BF, which had a lower maximum EC than the obtained in the peat one, presented a maximum EC similar as those reported by Dehghanzadeh et al. (2005), although in our study the BF with coconut media operated at higher EBRTs.

The EC of styrene differed for the two packing materials tested (peat and coconut fibre) due to their differences in chemical and physical properties. Peat has a higher specific surface area, 13.4 m² g⁻¹, and water holding capacity, 88 %, than coconut fibre, 0.9 m² g⁻¹ and 60 %, respectively. Higher specific surface area is favourable for biofilm growth, allowing higher ECs to be achieved. Although the peat BF achieved higher removal capacities than the coconut fibre BF, one of the main operational costs in a full scale bioreactor is the energy consumption in the blower related to the pressure drop in the bed. The main drawback of using peat media is the fast bed compaction problems which tended to lead to high pressure drops. In this study, compaction problems were detected during day 37, with an increase of 5-fold pressure drop by day 41 (from 98 to 490 Pa m⁻¹; Fig. 2c). Bed compaction in a laboratory-scale BF can be easily solved by opening the BF to decompress the bed (pressure drops decreased from 800 to 170 Pa m⁻¹ on day 110), but this maintenance strategy is difficult to implement on industrial full scale BFs. The industrial use of peat media would demand a careful control of water spraying and/or periodic turns to keep pressure drop controlled at low values. The coconut fibre did not show this compaction problem, pressure drop slightly increased with

time, but values were kept <59 Pa m⁻¹ for the whole experimental period. From the point of view of energy consumption, coconut fibre showed lower consumption and a more reliable performance, making it more suitable for industrial application. However, due to the low water holding capacity of the coconut fibre, BF2-C demanded a high water addition (150 ml/day) to avoid excessive drying.

The BTF presented a maximum EC of 52 g m⁻³ h⁻¹ (RE of 45 %) working at an EBRT of 45 s (Fig. 4c). Novak et al. (2008) reported a maximum EC of 11.3 g C m⁻³ h⁻¹ (RE of 61 %) in a BTF packed with polypropylene Pall rings working with an EBRT of 35 s. Sempere et al. (2011) obtained a maximum EC of 57.6 g m⁻³ h⁻¹ (RE of 88.3 %) at an EBRT of 60 s in a BTF packed with Flexiring. The maximum EC obtained for the BTF in this study is a 10 % lower than the maximum value observed by Sempere et al. (2011), but the EBRT in this study is lower. In terms of styrene removal, the BTF of this study showed a similar performance compared to the peat BF and a better performance than coconut fibre BF. Regarding pressure drop, values in the BTF were always kept below 59 Pa m⁻¹ (Fig. 3b). In terms of energy consumption, the BTF presented similar values of pressure drop as the coconut fibre BF and substantially lower than the peat BF. Moreover, BTF units can be cost-effective built in 8–10 m heights due to the low density and structural strength of the plastic packing materials while the usual bed height in BF units ranges from 1 to 2 m. This enables the construction of BTF units with smaller footprints than BF units. In conclusion, BTFs appear to be the optimal option, combining factors of styrene removal capacity, energy consumption and requirements of footprint.

From the results regarding styrene removal, similar styrene removals were obtained by using both an enriched culture of the strain *P. putida* CECT324 in a BF1-P and activated sludge from a WWTP in a BTF. Therefore, no advantage in using pure cultures for inoculation of bioreactors would be obtained. In addition, application of activated sludge for start-up of bioreactors in full scale would be practical and economical instead of using pure or enriched consortium (Bina et al. 2004).

The influence on the microflora of the two inoculation procedures was analysed by DGGE and FISH. Although three bands were observed for the pure culture *P. Putida* CECT324 in the DGGE gel, these multiple bands can be attributed to different alleles within the same strain. For example, the sequenced genome of the strain *P. putida* KT2440 revealed two alleles differing by only one nucleotide in the region amplified by DGGE which produced two bands (Bodilis et al. 2012). These authors pointed out that many *Pseudomonas* strains had at least two different 16S rRNA alleles. Further, heteroduplexes have been observed in DGGE gels as potential PCR artifacts, thereby producing false positive bands for pure bacterial isolates. The banding patterns

of DGGE for the enriched culture used for start-up of the BFs (inoculum 1) revealed that *P. Putida* CECT324 was preserved after 30 days of cultivation under non-sterile aerated conditions, but other species appeared to have contaminated the culture (two new dominant bands). This demonstrates that these other species could survive and grow in an environment with styrene as the sole carbon substrate. Although nutrient broth was used as the initial media for cultivation, only styrene was used as the carbon source during 30 days of cultivation. Among BFs samples, only one species from the inoculum survived in all samples, but the strain *P. Putida* CECT324 was not detected in further sampling time points. DGGE fingerprints for BFs indicate that they were colonized by complex communities that changed over time. As Cabrol et al. (2012) points out, in the case of organic packing material (already colonized by endogenous microflora), both the inoculation and the operating conditions are sufficient to induce substantial modifications of the endogenous community structure. These authors indicated that emergence of species which were not detected in the inoculum proceeded from (a) the inoculum wherein their abundance was below detection limit, or (b) the endogenous reservoir of the organic packing material, and/or (c) the polluted gaseous effluent. The bands appearing in only one of the BFs (F, G for BF1-P, and K, L for BF2-C, Fig. 6) could indicate origin from the packing material. The largest number of common bacterial populations in both BFs (bands D, H, I, J, M, Fig. 6), which occurred at the end of the experiment, could suggest that the origin of these species were in the inoculum or in the polluted gaseous effluent. The polluted gaseous effluent constituted itself a cross-inoculation mechanism between both BFs.

FISH results showed that the phylum *Proteobacteria* represented more than half of the total fluorescence obtained by the general eubacterial probes in every sample. It is worth noting that bacteria from the phylum *Proteobacteria* have previously been identified as the dominant phyla in BTFs degrading mixtures of VOCs including styrene (Lebrero et al. 2012; Li et al. 2012). Gammaproteobacteria was detected as a large fraction in all samples. In BFs, members of the other Proteobacterial classes (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria), Firmicutes and Actinobacteria showed variations of dominant phylogenetic groups over time between both BFs. This can be explained on the basis of the dynamic changes of the community structure related to the different packing material used in BF1-P and BF2-C and the variations in the operational conditions. Although FISH data showed a large percentage of *P. putida* in both BFs (ranging between 8.1 % and 24.8 %), DGGE revealed that *P. putida* CECT324 was not a dominant strain in the BFs since day 105

(after the acclimatisation period) till the end of the experiment. This suggests that other strains of *P. putida* proliferated in the BFs instead of the pure culture strain chosen for the start-up. Surprisingly by day 65, the BTF samples showed little differences in the relative predominance of the Proteobacterial classes (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria), Firmicutes and Actinobacteria with the activated sludge used as inoculum. The similarity in relative abundances of detected phylogenetic groups from the inoculum and samples from day 65 can be explained by the fact that the BTF was filled with plastic rings, which can be considered as a negligible source of endogenous microflora. This is a surprising result; large variations in the relative abundance of phylogenetic groups will be expected after 65 days of exposure to styrene. Although the activated sludge used as an inoculum of the BTF contains only 1 % of *P. putida* as detected by FISH, the percentage of this species increased over time, reaching values of 14.1 % (bottom) and 9.8 % (top). These values are within the range of the abundance of *P. putida* found in BFs. This demonstrates that *P. putida* can grow to substantial abundances in a styrene degrading environment, independently of the inoculum source and the packing material (organics or plastic).

Acknowledgments The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/ under REA grant agreement no. 284949. Financial support from Ministerio de Economía y Competitividad (Project CTM2010-15031/TECNO) and Generalitat Valenciana (PROMETEO/2013/053), Spain, is also acknowledged. M.C. Pérez acknowledges the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain for her FPU contract (AP2009-2645).

References

- Amann R, Fuchs BM, Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 12:231–236
- Arnold M, Reittu A, von Wright A, Martikainen PJ, Suihko M-L (1997) Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:738–744
- Bina B, Dehghanzadeh R, Pourmoghadas H, Kalantary A, Torkian A (2004) Removal of styrene from waste gas stream using a biofilter. *J Res Med Sci* 6:280–288
- Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L, Quillet L (2012) Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS ONE* 7(4):1–14
- Cabrol L, Malhautier L (2011) Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:837–849
- Cabrol L, Malhautier L, Poly F, Lepeuple AS, Fanlo JL (2012) Bacterial dynamics in steady-state biofilters: beyond functional stability. *FEMS Microbiol Ecol* 79:260–271

- Dehghanzadeh R, Torkian A, Bina B, Poormoghaddas H, Kalantary A (2005) Biodegradation of styrene laden waste gas stream using a compost-based biofilter. *Chemosphere* 60:434–439
- Derwent RG, Jenkin ME, Saunders SM (1996) Photochemical ozone creation potentials for a large number of reactive hydrocarbons under European conditions. *Atmos Environ* 30:181–199
- Dion St-Pierre MC, Avalos A, Heitz M (2009) Biofiltration of air contaminated by styrene vapors on inorganic filtering media: an experimental study. *J Air Waste Manag Assoc* 59:568–578
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Supplement 7. World Health Organization, Lyon, France
- Ivanpour R, Cox HHJ, Deshusses MA, Schroeder ED (2005) Literature review of air pollution control biofilters and biotrickling filters for odor and volatile organic compound removal. *Environ Prog* 24:254–267
- Jang JH, Hirai M, Shoda M (2004) Styrene degradation by *Pseudomonas* sp. SR-5 in biofilters with organic and inorganic packing materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:349–355
- Jubany I, Lafuente J, Carrera J, Baeza JA (2009) Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy. *J Chem Technol Biotechnol* 84:1140–1145
- Juneson C, Ward OP, Singh A (2001) Microbial treatment of a styrene-contaminated air stream in a biofilter with high elimination capacities. *J Ind Microbiol Biot* 26:196–202
- Kennes C, Veiga MC (2013) Biotrickling filters. In: Kennes C, Veiga MC (eds) *Air pollution prevention and control*, 1st edn. Wiley, United Kingdom, pp 121–138
- Kennes C, Rene ER, Veiga MC (2009) Bioprocesses for air pollution control. *J Chem Technol Biotechnol* 84:1419–1436
- Kim J, Ryu HW, Jung DJ, Cho KS (2005) Styrene degradation in a polyurethane biofilter inoculated with *Pseudomonas* sp. IS-3. *J Microbiol Biotechnol* 15:1207–1213
- Lebrero R, Rodriguez E, Estrada JM, Garcia-Encina PA, Muñoz R (2012) Odor abatement in biotrickling filters: effect of the EBRT on methyl mercaptan and hydrophobic VOCs removal. *Bioresour Technol* 109:38–45
- Li J, Ye G, Sun D, An T, Sun G, Liang S (2012) Performance of a biotrickling filter in the removal of waste gases containing low concentrations of mixed VOCs from a paint and coating plant. *Biodegradation* 23(1):177–187
- Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M (2007) probeBase — an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res* 35:D800–D804
- Malhautier L, Khammar N, Bayle S, Fanlo JL (2005) Biofiltration of volatile organic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:16–22
- Muyzer G, Ramsing N (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRN. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700
- Novak J, Paca J, Halecky M, Socco CR (2008) Styrene biofiltration in a trickle-bed reactor. *Braz Arch Biol Techn* 51(2):385–390
- Okamoto K, Izawa M, Yanase H (2003) Isolation and application of a styrene-degrading strain of *Pseudomonas putida* to biofiltration. *J Biosci Bioeng* 95:633–636
- Paca J, Koutsky B, Maryska M, Halecky M (2001) Styrene degradation along the bed height of perlite biofilter. *J Chem Technol Biotechnol* 76:873–878
- Rene ER, Lopez ME, Veiga MC, Kennes C (2010) Performance of a fungal monolith bioreactor for the removal of styrene from polluted air. *Bioresour Technol* 101:2608–2615
- Sempere F, Martinez-Soria V, Palau J, Penya-roja JM, San Valero P, Gabaldon C (2011) Effects of nitrogen source and empty bed residence time on the removal of styrene gaseous emissions by biotrickling filtration. *Bioproc Biosyst Eng* 34:859–867
- Shareefdeen Z, Singh A (2005) *Biotechnology for odor and air pollution control*. Springer, Heidelberg, Germany, p 131
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1994) OPPT fact sheets, styrene fact sheets: support document. US-EPA 749-F95-019a

7. Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

Este trabajo se encuentra en fase de revisión en New Biotechnology.

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

M.C. Pérez^a, F. J. Álvarez-Hornos^a, K.H. Engesser^b, D. Dobsław^b, C. Gabaldón^{a*}

^aResearch Group GI²AM, Department of Chemical Engineering, Universitat de València, Av. de la Universitat s/n, 46100, Burjassot, Spain

^bResearch group ALR, Department of Biological Waste Air Purification, Institute of Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Bandtäle 2, 70569, Stuttgart, Germany.

Abstract

The removal of 2-butoxyethanol from gaseous emissions was studied using two biotrickling filters (BTF1 and BTF2) packed with polyurethane foam. Two different inoculum sources were used: a pure culture of *Pseudomonas* sp. BOE200 (BTF1) and activated sludge from a municipal wastewater treatment plant (BTF2). The bioreactors were operated at inlet loads (ILs) of 130 and 195 g m⁻³ h⁻¹ and at empty bed residence time (EBRT) of 12.5 s. Under an IL of ~130 g m⁻³ h⁻¹, BTF1 presented higher elimination capacities (ECs) than BTF2, with average values of 106.1 ± 6.7 and 67.7 ± 7.5 g m⁻³ h⁻¹, respectively. However, differences in ECs between BTFs were decreased by reducing the irrigation intervals from 1 min every 12 min to 1 min every 2 h in BTF2. Average values of EC were 110.6 ± 25.0 and 89.6 ± 7.3 g m⁻³ h⁻¹ for BTF1 and BTF2, respectively, when working at an IL of ~195 g m⁻³ h⁻¹. Microbial analysis revealed a significant shift in biocoenosis in BTF1 inoculated with *Pseudomonas* sp. BOE200. At the end of the experiment, the species *Microbacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Mycobacterium* sp. were detected. In BTF2 inoculated with activated sludge, the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique showed a diverse microbial community including species that was able to use 2-butoxyethanol as its carbon source, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* as representative species. Although BTF1 inoculated with *Pseudomonas* sp. BOE200 showed better performance, the use of activated sludge as inoculum seems to be a more feasible option for the industrial application of this technology.

Keywords: volatile organic compound (VOC), biotrickling filter, inoculation procedures, polyurethane foam, *Pseudomonas* sp.

*Corresponding author: Gabaldón, C. (Carmen.Gabaldon@uv.es)

Introduction

2-Butoxyethanol is a volatile organic compound (VOC) of the glycol ether family that is emitted into the atmosphere due to its use as solvent, mainly during surface coating and cleaning activities. This compound is commonly used in industry based on its high water solubility (Henry's constant (H) = $1.6 \cdot 10^{-6}$ atm m³ mol⁻¹ at 25 °C) [1], chemical stability and low costs [2]. Aside from its beneficial uses, the exposure to 2-butoxyethanol can cause adverse effects, such as irritation of the nose and eyes, headache, vomiting, dyspnoea, hypotension, declining levels of haemoglobin, haematuria and metabolic acidosis [3]. In addition, VOCs are of significant environmental concern since they are involved in the tropospheric ozone formation. These facts have led to reinforcement of environmental regulations in Europe (2010/75/EU) [4], and thus, treatment technologies are required.

The removal of VOCs from waste air emissions through biological processes provides a cost-effective and environmentally friendly alternative to conventional treatment methods [5]. Biological processes utilise microbial metabolic reactions for cleaning of contaminated air, converting the pollutants mainly to carbon dioxide, water and biomass. In the case of biotrickling filters (BTFs), which involve a trickling liquid for the nutrient supply and the pH control, the microorganisms are attached on the surface of an inert packing material. Among the synthetic materials that have been tested as packing materials in BTFs, polyurethane foam is one of the purposed materials [6,7] since it offers high mechanical strength, resistant to attack from organic solvents and microbes, easy handling, good regeneration ability, and especially very low cost [8].

The effectiveness of the BTF processes in the reduction of VOC emissions has been widely demonstrated from the laboratory up to an industrial scale [9–11]. However, the removal of 2-butoxyethanol using biotechnologies has not yet been reported. Several studies have proven the successful application of the biofiltration process for other compounds with high solubility in water and characterised by low Henry's constants ($H < 0.01$). Morotti et al. [12] analysed a BTF packed with plexiglas cylinders for treating ethanol emissions. A maximum elimination capacity (EC) of $46 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ was achieved for an inlet concentration of 1.1 g m^{-3} and an empty bed residence time (EBRT) of 66 s. San-Valero et al. [13] analysed two BTFs for the treatment of isopropanol using two packing materials: a plastic cross-flow structured packing material and a random packing material consisting of polypropylene rings. A maximum EC of $51 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ was obtained for an inlet load (IL) of $65 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 50 s. Popov et al. [14] reported an industrial BTF application for treating a mixture of soluble VOCs, mainly methylated spirits, at a flexographic printing facility. The BTF was operated under an IL of $280 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 14 s, achieving an average removal efficiency (RE) of 89%.

The start-up procedure of bioreactors can be carried out by use of different inoculum sources. From an economic point of view, the use of activated sludge from wastewater treatment plants (WWTP) [15,16] is preferred due to advantages, including ease of implementation and lower operational costs. The use of pure cultures as inoculum sources is also applicable [17,18] due to shorter start-up periods and the prevention of emissions of potentially pathogenic germs.

Comparative studies in the performance of bioreactors using different inoculum sources are still scarce. In our previous research, two inoculation procedures were compared regarding the removal of styrene in two types of bioreactors by using an enriched culture of the strain *Pseudomonas putida* CECT 324 activated sludge [19]. Working at an EBRT of 60 s and an IL of 75 g m⁻³ h⁻¹, the bioreactors presented similar EC values of ~40 g m⁻³ h⁻¹. An et al. [20] compared the removal of ethanethiol in two BTFs using different inoculum sources: a pure culture of the strain *Lysinibacillus sphaericus* RG-1 and a commercially available biocoenosis named B350. Working at an EBRT of 83 s, the BTF inoculated with the RG-1 strain showed a higher performance than the BTF inoculated with B350, achieving maximum ECs of 38.4 and 25.8 g m⁻³ h⁻¹, respectively. Li et al. [21] investigated the removal of toluene and compared two BTFs inoculated with different strains, *Bacillus cereus* S1 and *Bacillus cereus* S2. Working at an EBRT of 66.5 s, maximum ECs of 300.5 and 228.9 g m⁻³ h⁻¹ were achieved for the BTF inoculated with the S1 and S2 strains, respectively.

Extensive efforts have been made to optimise the BTF process from a design and operational perspective. However, biological information about the structure and dynamics of their microbial communities are still required for a better understanding of the relationship between microbial diversity and the performance of the bioreactor. Biological molecular tools, such as fluorescence in situ hybridisation (FISH) [22,23], polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) [24,25], cloning and sequencing [26,27] and pyrosequencing [28,29], have been applied in the field of biofiltration. For example, Álvarez-Hornos et al. [30] evaluated the dynamics of the microbial population using the FISH technique

in a BTF pilot unit for the treatment of exhaust gases of a plastic coating facility. The pilot unit was inoculated with activated sludge and changes in the bacterial community were observed. The *Betaproteobacteria* group was the most abundant group detected in the inoculum source (relative abundance of 20%). However, after 3 months of operation, the abundance of this group dropped to 8.9 ± 3.0%. Wan et al. [31] analysed the bacterial community by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in a BTF adapted with the biocoenosis B350 described above to remove trimethylamine (TMA) from waste air. Although the bacterial community was clearly sensitive to the TMA, a new bacterial community was established in the BTF. Among the 28 initial species in the inoculum source B350, more than 21 species could be detected in a stable state with dominance of six species, namely uncultured bacterium clone PPSB-U1 (EU138870), Cday32-37 (HQ011776), (FJ406571), (FM956738), K37 (EU834755) and G30-48 (HQ132203).

The aim of the present study was to investigate the process performance of two BTFs packed with polyurethane foam using different inoculation procedures and microbial community structures in the removal of gaseous emissions of butoxyethanol. For this purpose, the following objectives have been taken into consideration: (1) To evaluate the performance in terms of EC and RE of the two BTFs working both at an EBRT of 12.5 s and under ILs of 130 and 195 g m⁻³ h⁻¹. The two bioreactors, which were built with the same relative dimensions, were packed by using the same packing material: polyurethane foam with 10 pores per inch (PPI) and operated in different laboratories under similar hydraulic conditions. (2) To analyse the influence of two inoculum sources on the performance of the process: a pure culture of the strain *Pseudomonas* sp. BOE200 and an activated sludge from a municipal

WWTP were used. The shift in the microbial community was analysed by PCR-DGGE, sequencing of 16S rRNA and by plating methods. To the best of our knowledge, this is the first study regarding 2-butoxyethanol biodegradation from gaseous emissions.

Materials and Methods

BTF set-ups and operational conditions

The treatment of 2-butoxyethanol was carried out in two BTFs under counterflow conditions which were built keeping the same relative dimensions. The first experiment, with a bioreactor named BTF1, was carried out in the Department of Biological Waste Air Purification of the University of Stuttgart (Germany) by using a pure culture of the strain *Pseudomonas* sp. BOE200 as the inoculum source. The second experiment, with a bioreactor named BTF2, was carried out in the Department of Chemical Engineering of the University of Valencia (Spain) by using an activated sludge from a municipal WWTP as the inoculum source. Both bioreactors were packed with polyurethane foam with 10 PPI (BTF1: EMW filtertechnik, Germany; BTF2: Modisprem, Spain). The packing material presents a specific surface of $400 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$, a void fraction of 96% and a bulk density of 23 kg m^{-3} .

The schematic of the set-up for both biotrickling filters is shown in Fig. 1. BTF1 was built using a cylindrical PVC module with a total bed length of 100 cm and an internal diameter of 15 cm. The bioreactor was equipped with two sampling ports (gas and biomass) located at 0 cm (inlet port) and 100 cm (outlet port). The 2-butoxyethanol was initially dosed and evaporated in an air flow of $0.4 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ by a diaphragm metering pump (STEPDOS[®] 03, KNF, Switzerland) and then

remixed with an air flow of a compressor resulting in a total volume flow of $5.0 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. A 15-L recirculation tank (ratio of tank volume to reactor volume = 0.8), partially renewed every week, was used to feed the recirculation solution into the bioreactor in counter-current mode with respect to the air flow using a diaphragm metering pump (Vario HM15-PP, ProMinent GmbH, Germany) at 3.25 L min^{-1} (liquid velocity of 11 m h^{-1}) with a frequency of 5 s every 1 min. In the case of the pH adjustment of the recirculation solution, a sodium hydroxide solution (NaOH 1 M) was used. A commercial fertiliser solution (7% N, 3% P_2O_5 , 5% K_2O ; CMI, Germany) was supplied to the recirculation tank (50 mL per week).

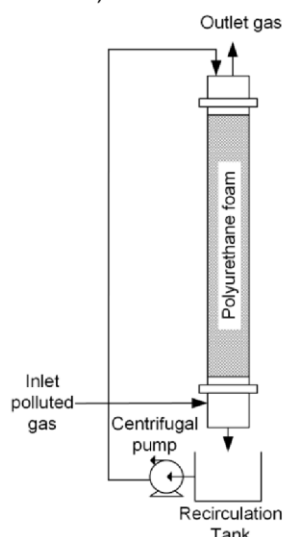


Fig. 1 Schematic BTFs set-up.

After ending the operation of BTF1, another experiment operating the other bioreactor (BTF2) was performed using a different inoculum source. BTF2 was built using a cylindrical PVC module with a total bed length of 70 cm and an internal diameter of 10.5 cm. Thus, despite being different systems, the same ratio of length to diameter (6.7) was used in both bioreactors. The bioreactor was equipped with two gas-sampling ports [0 cm (inlet port) and 70 cm (outlet port)] and two biomass-sampling ports [30 cm (bottom port) and 70 cm (top port)]. The air stream was contaminated using a syringe pump (New Era, infusion/withdraw NE 1000 model, USA) and fed to the bioreactor through the bottom of the column with a gas flow rate of $1.75 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. A 5-L recirculation tank (ratio of tank volume to reactor volume = 0.8), partially renewed every week, was used to feed the recirculation solution through the top of the bioreactor using a diaphragm metering pump (Sigma/2, ProMinent Gugal S.A, Spain) at 1.6 L min^{-1} (liquid velocity of 11 m h^{-1}). Two spraying frequencies were used: a) 1 min every 12 min, and b) 1 min every 2 h. For pH adjustment of the recirculation solution, a sodium hydroxide solution (NaOH 0.1 M) was used. A nutrient solution buffered at pH 8 was also supplied to the recirculation tank (20 mL per day) containing (g L^{-1}): NH_4Cl , 9.7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2.2; NaHCO_3 , 0.5; NaOH, 0.4 g; KCl, 0.6; yeast extract 0.01; and Ca, Fe, Zn, Co, Mn, Na, Ni, B, I, Se, Cr, Cu and vitamins at trace doses.

The operational period of each BTF was 100 days using the same operational and hydraulic conditions: two 2-butoxyethanol loads (130 and $195 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) working at an EBRT of 12.5 s and at a liquid velocity of 11 m h^{-1} . Operational conditions applied to the BTFs are presented in Table 1.

Table 1 Operational conditions of BTFs.

Stages	1	2
Day	0–41	42–100
Inlet concentration, mg Nm^{-3}	450	680
EBRT, s	12.5	12.5
IL, $\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$	130	195

In the first 41 days (stage 1), an EBRT of 12.5 s and an inlet concentration of 450 mg Nm^{-3} were applied. Afterwards, in stage 2, the inlet concentration was raised until to 680 mg Nm^{-3} at the same EBRT. The weekly purge was set in both systems at 20% of the volume of the recirculation solution. The solvent removal with the purge represented less than 4% of the amount of 2-butoxyethanol that was fed during the whole week. Therefore, the organic carbon removed with the purge was considered negligible for the evaluation of the BTF performance in terms of EC and RE.

Inoculation source

The inoculation of BTF1 was performed with 1 L of a pure culture of the strain *Pseudomonas* sp. BOE200, which was formerly isolated by Woiski from an industrial-scale bioscrubber [32]. The bacterial strain was cultivated in 1 L of liquid mineral medium (MM) containing (g L^{-1}): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.50; KH_2PO_4 , 1.00; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.00; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05g; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{FeH}_4\text{N}$, 0.01; trace minerals solution, 1 mL [consisting of (g L^{-1}): H_3BO_3 , 0.30; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.20; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.10; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01] and 2-butoxyethanol as the carbon source. The pH of the MM was maintained at 7.1. Incubation took place in 3-L conical flasks placed on a rotatory shaker (150 rpm) at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and with 7.5 mM 2-butoxyethanol. The culture was fed again at day 5 with ~67% of the initial VOC loading.

After 7 days, 1 L of the pure culture was used as the inoculum of BTF1.

The inoculation of BTF2 was performed with 1 L of activated sludge from a municipal WWTP located in Paterna (Valencia, Spain), without any previous adaptation of the sludge to the pollutant.

Analytical methods

The analytical methods employed for monitoring the performance of the bioreactors, as well as the microbial techniques utilised for the analysis of the bacterial community, were carried out with the established techniques of both laboratories. The concentration of 2-butoxyethanol was measured using a flame ionization detector (BTF1: Multi-FID 100, Hartmann & Braun, Germany; BTF2: Nira Mercury 901 total hydrocarbon analyzer Spirax Sarco, Spain). Adequate time intervals of at least 4 h were used for the generation of average values of the outlet concentrations. The pressure losses of both bioreactors (BTF1: AMS 4711-0050 model, AMSYS, Germany; BTF2: MP101 model, KIMO, Spain) and the pH (BTF1: pH Checker, HANNA, Germany; BTF2: pH/Cond 340i, WTW, Germany) of the recirculation solution were monitored at least twice per week. The concentrations of nitrate, ammonium and phosphate were determined weekly either by use of colorimetric kits according to the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [33] in the case of BTF1 or by using an ionic chromatograph (Ionic Chromatograph 883 Basic IC Plus) in the case of BTF2. The suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) of the inoculum sources were measured according to the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [33].

Microbial community analysis in BTF1

The analysis of the microbial community of BTF1 was carried out by plating methods on day 100, corresponding to the end of the experiment. Samples of biomass (2 mL) were taken out of the sampling ports at the top of the column and from the recirculation tank and were scattered either on MM plates with 2-butoxyethanol (15 μL per plate), in order to evaluate the use of 2-butoxyethanol as carbon source by strains, or on nutrient broth plates (NB) as non-selective media. The composition of NB plates (g L^{-1}) was: beef extract, 3.0; peptone, 5.0; agar, 16.0. The pH of the NB was adjusted to 7.0. Incubation took place at 30 °C for 1 week. Single colonies grown under these conditions were transferred to new plates for subsequent DNA isolation and sequencing of 16S rRNA.

DNA isolation was performed by mechanical extraction using 0.1 mm zirconia-silica beads for five cycles of 60 s of extraction time in a Bead-Beater (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) with inter-cyclic cooling of the samples on ice. The supernatant was transferred to a new tube and was stored at -20 °C until analysis. 16S rRNA genes were amplified by PCR using the bacteria-specific primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and the universal primer 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). PCRs were performed in a thermal cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich) with a 50- μL reaction volume containing final concentrations of 1 unit of Taq DNA polymerase, 0.25 mM dNTPs, 2.5 mM Mg^{2+} and 1 μM of each primer (Biomaster GmbH, Windeck, Germany). PCR conditions consisted of 30 cycles of: 94 °C for 0.5 min, 58.5 °C for 1 min, and followed by 72 °C for 1 min.

The PCR reactions followed with 10 cycles of: 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 3 min. A final extension at 72 °C for 8 min was undertaken as the final step. The amplicon was purified using the GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) with pure water as solvent, and the products were sequenced by GATC Biotech AG (Köln, Germany).

Microbial community analysis in BTF2

The evolution of the microbial population in BTF2 was analysed by DGGE on days 0 (inoculum), 40, 60, 80 and 100. In addition, the growth of strains able to use 2-butoxyethanol as carbon source was examined by plating methods using solid MM on day 100, corresponding to the end of the experiment. Samples (2 mL) were taken out of the sampling ports at 30 cm (bottom port) and 70 cm (top port) of the column, as well as out of the recirculation tank.

DNA was extracted with the PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) using the manufacturer's protocol. The isolated DNA was stored at -20 °C until analysis. 16S rRNA genes were amplified by PCR using the two universal primers F357GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3') and R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). PCRs were performed in a thermal cycler (LongGene Scientific Instruments, Hangzhou) with a 50-µL reaction volume of a mixture containing final concentrations of 1.25 units of Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTPs, 2 mM Mg²⁺ and 0.5 µM of each primer (EuroClone, Italy). PCR conditions consisted of 20 cycles of: 94 °C for 1 min, 65 °C for 1 min, a touchdown annealing step of 0.5 °C increments from 65 °C to 55 °C

The alignment editing was implemented using MEGA version 6.06 software and the results were compared with those available from theNCBI GenBank database using BLAST software.

for 1 min, followed by 72 °C for 3 min. Subsequent PCR reactions followed with 10 cycles of: 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 3 min. A final extension at 72 °C for 7 min was undertaken as the final step. For DGGE analysis, 10–20 µL of PCR product generated from each sample were separated on an 8% acrylamide gel running in a linear denaturing gradient (30%–50%) using a KuroGel Verti 2020 DGGE System (VWR International Eurolab S.L., Spain). The gel was run at 60 °C for 5 min at 50 V, 120 min at 150 V and 60 min at 200 V. The DGGE gel was visualised in the MiniBIS Pro system (DNR Bio-Imaging System Ltd., Spain).

Predominant DGGE bands were excised in a UV-transilluminator (ECX-20M, Vilber Lourmat, Spain) with a sterile sharp scalpel. Bands were resuspended in microcentrifuge tubes with 30 µL of sterilised Mili-Q water, and stored at 4 °C overnight. After centrifugation, the supernatant was used as the template for PCR amplification of the 16S rRNA genes. PCR was performed using the primers F357GC and R518 in a 50-µL reaction volume containing 1 unit of Taq DNA polymerase, 0.25 mM dNTPs, 2.5 mM Mg²⁺ and 0.25 µM of each primer (Integrated DNA Technologies, Spain). The PCR used the same protocol described previously for the DGGE.

The PCR product was purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Barcelona, Spain) and, then, was sequenced by using an automated DNA analyser (3730 KL DNA analyzer, Applied Biosystems, Spain).

Results and Discussion

BTF performance

The performance of both BTFs treating 2-butoxyethanol is shown in Fig. 2 from day 20 to 100. The inlet and outlet concentrations during the process time, as well as the RE, are presented in Fig. 2a (BTF1) and in Fig. 2b (BTF2). The inoculation of each bioreactor was conducted at day 0 by using 1 L of the inoculum source. The concentration of SS and percentage of VSS were 4.3 g L^{-1} and 84% in the case of the pure culture of strain *Pseudomonas* sp. BOE200 (BTF1) and 2.8 g L^{-1} and 81% in the case of the activated sludge (BTF2). From day 0 to 41 (stage 1), the bioreactors were operated at a low EBRT of 12.5 s and average inlet concentrations of 450.1 ± 10.3 and $474.4 \pm 12.1 \text{ mg Nm}^{-3}$ (IL $\sim 130 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) in BTF1 and BTF2, respectively. From day 20 onwards, the RE in BTF1 was kept at values $>79\%$ (average outlet concentration of $77.2 \pm 18.4 \text{ mg Nm}^{-3}$, Fig. 2a) whereas the RE in BTF2 fluctuated around $54.1 \pm 6.7\%$ (average outlet concentration of $218.0 \pm 34.8 \text{ mg Nm}^{-3}$, Fig. 2b).

The alignment editing was implemented using MEGA version 6.06 software and the results were compared with those available from the NCBI GenBank database using BLAST software.

After 41 days of operation the IL was increased to $\sim 195 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ at constant EBRT of 12.5 s, corresponding to average inlet concentrations of 699.2 ± 78.0 and $741.9 \pm 12.2 \text{ mg Nm}^{-3}$ in BTF1 and BTF2, respectively. The response of BTF1 to this change was a progressive decrease in the RE, reaching 35% on day 67 and subsequently oscillating around $55.2 \pm 9.3\%$ until the end of the experiment, corresponding with an average outlet concentration of $313.0 \pm 70.4 \text{ mg Nm}^{-3}$. In BTF2, a progressive deterioration of the RE was observed, reaching a value of 21.5% on day 69. At that moment, it was decided to decrease the spraying frequency by a factor of 10 (from 1 min every 12 min to 1 min every 2 h) in order to evaluate the influence of the spraying frequency on the performance of the bioreactor. Working with the new spraying frequency, the RE suddenly increased to 50% on day 71 and was stable at $47.1 \pm 3.9\%$ afterwards until the end of the experiment (average outlet concentration of $392.9 \pm 32.0 \text{ mg Nm}^{-3}$).

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

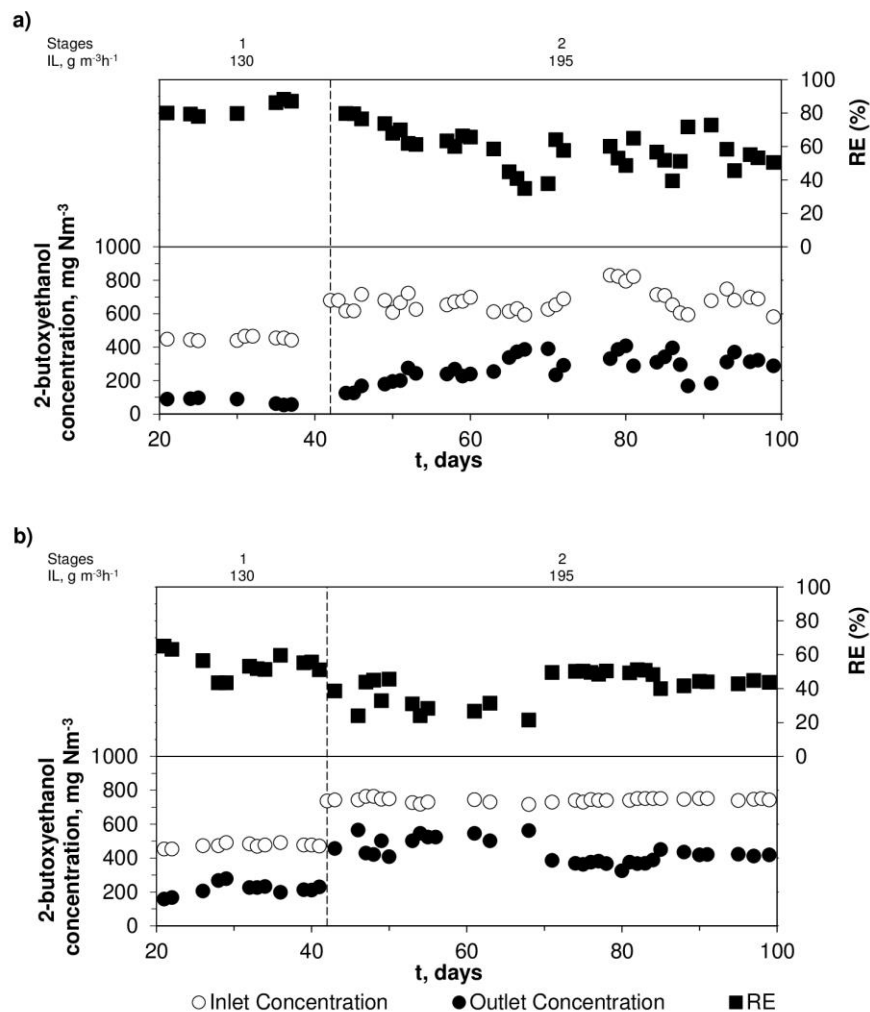


Fig. 2 Evolution of the RE (■), inlet concentration (○) and outlet concentration (●) in the BTFs: a) BTF1 and b) BTF2.

The effect of the spraying frequency on the outlet concentration in BTF2 is presented in Fig. 3 where representative examples of 8-h emission time intervals for both spraying frequency are plotted. Fig. 3a shows an example of outlet emissions on day 53 at high spraying frequency, while Fig. 3b shows emissions on day 80 under low spraying conditions. Both figures directly show the correlation between spraying conditions and high outlet concentrations due to a high loading capacity of 2-butoxyethanol in the aqueous phase and subsequent desorption of

the VOC out of the liquid phase. Thus, the decrease in the trickling conditions directly causes a reduction in the number of outlet emission peaks and thus average outlet concentration. As a consequence, 8 h-average values dropped by 35 % from 502 to 325 mg Nm⁻³. The outlet concentration decreases from the concentration of the peak (550 mg Nm⁻³) to 250 mg Nm⁻³ during low spraying conditions (Fig. 3b), while the outlet concentration slightly declined to 450 mg Nm⁻³ under high spraying conditions (Fig. 3a).

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

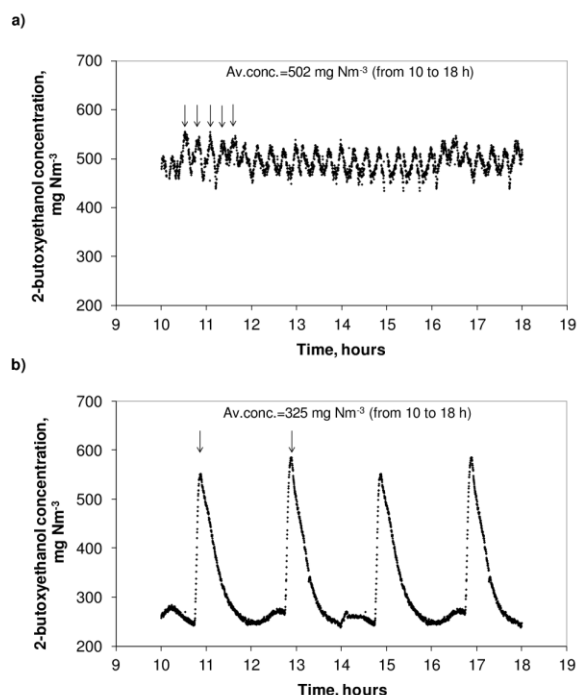


Fig. 3 Influence of the spraying frequency on the outlet pattern emission: **a)** spraying for 1 min every 12 min (day 53); **b)** spraying for 1 min every 2 h (day 80).

The reduction of average daily emission levels via reduced spraying frequencies was previously reported by San-Valero et al. [13] in a BTF treating isopropanol emissions, a solvent with high solubility in water ($H = 8.1 \cdot 10^{-6} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$) [1].

The authors obtained a decrease in the outlet concentration from 86 to 59 mg C Nm^{-3} when the spraying frequency was changed from 15 min every 1.5 h to 15 min every 3 h. In this study, the decrease in the spraying frequency of BTF2 resulted in 2-butoxyethanol removal that was slightly lower than that obtained in BTF1 ($55.2 \pm 9.3\%$ in BTF1 and $47.1 \pm 3.9\%$ in BTF2). Although the spraying frequency was reduced by tenfold, no drying of the packing material was observed. Thus, the results presented here indicate that a minimisation of the spraying frequency for the removal of compounds with high water solubility is a key parameter to achieve low emissions.

The monitoring of additional parameters of both BTFs is summarised in Table 2. The pH value was kept at normal values (between 7 and 8). Nitrate, ammonium and phosphate in the recirculation tank were kept at appropriate concentrations to make sure that nutrients were not limiting the bioprocesses. The pressure drop was maintained at low values ($<5 \text{ Pa m}^{-1}$) in both reactors during the 100 days of operation. In fact, biomass clogging problems were not observed over this operational period.

Table 2 Parameters of trickling water in BTFs.

	BTF1				BTF2			
	Stage 1		Stage 2		Stage 1		Stage 2	
	Aver.	SD	Aver.	SD	Aver.	SD	Aver.	SD
pH	7.9	0.3	7.6	0.3	7.1	0.3	7.2	0.4
N-NO ₃ , mg L ⁻¹	0.5	0.2	7.3	4.7	16.7	5.5	10.3	7.9
N-NH ₄ , mg L ⁻¹	26.7	11.3	45.9	27.6	60.2	20.1	99.5	23.1
P-PO ₄ , mg L ⁻¹	30.3	12.2	51.7	30.0	66.7	48.3	43.9	15.1
Pressure drop, Pa m ⁻¹	4.1	3.6	4.8	2.2	4.5	7.1	4.7	8.2

Relationship between EC and IL

The relationship between IL and EC, calculated for the whole volume of each bioreactor, is presented in Fig. 4 based on the experimental data of the last three operational weeks. In the case of BTF1, an average EC of $106.1 \pm 6.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of $82.6 \pm 4.5\%$) was obtained for the lower IL $\sim 130 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (stage 1). An increase in the IL to $\sim 195 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (stage 2) caused a smooth improvement in the EC level, with an average value of $110.6 \pm 25.0 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of $55.4 \pm 10.1\%$), and culminated in a maximum EC of $154.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of 65.0%) for an IL of $237.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. In the case of BTF2, due to the high influence of the spraying frequency on the performance, the EC was increased from $67.7 \pm 7.5 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of $54.1 \pm 6.0\%$) for the IL of $\sim 130 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ to $89.6 \pm 7.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of $45.4 \pm 3.6\%$) for the IL of $\sim 195 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. The comparison of the two inoculation procedures of both bioreactors, which in spite of being different systems kept the same relative dimensions and hydraulic conditions, pointed out that the BTF inoculated with the pure culture of a 2-butoxyethanol degrader showed slightly better removal efficiencies than the system with activated sludge without previous adaptation. Nevertheless, activated sludge is preferable due to its ease of implementation and the reduction of operational costs in future industrial applications.

Woiski [32] identified 2-butoxyacetic acid, n-butanol and butanoic acid as central intermediates of the biodegradation of 2-butoxyethanol by *Pseudomonas* sp. BOE200. However, no data related to the biodegradation of 2-butoxyethanol in a bioreactor for treatment of waste air have been previously published in the literature.

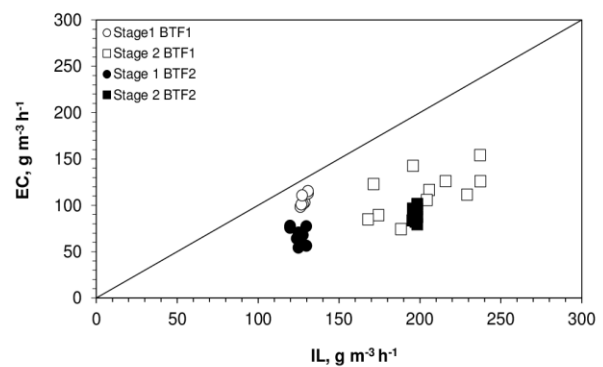


Fig. 4 EC versus IL in BTF1 and BTF2. Stage 1 BTF1 (○); stage 2 BTF1 (□); stage 1 BTF2 (●); stage 2 BTF2 (■).

An attempt to compare the data of this work with those previously reported for other compounds with high water solubility has been carried out. For example, Pielech-Przybylska et al. [17] investigated the biodegradation of acetone in a trickle-bed biofilter inoculated with two strains: *Pseudomonas cepacia* and *Acinetobacter baumannii*. A maximum EC of $95.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE of 99%) was achieved at an IL of $97.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 75 s. Chang and Lu investigated a biotrickling filter for the removal of isopropanol and acetone mixtures inoculated with activated sludge [34]. Working at an IL of $80 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 20 s, ECs between 60 and 80 (RE > 75%) were achieved. San-Valero et al. [13] studied a BTF with activated sludge as inoculum for the removal of isopropanol, and achieved an EC $\sim 40 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE $\sim 60\%$) under an IL of $65 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an EBRT of 14 s.

Isolation and identification of the strains in BTF1

Plating methods were applied in BTF1 in order to identify strains present in the bioreactor at the end of the experiment (day 100). The MM was used as selective media in order to isolate strains able to use 2-butoxyethanol as carbon source, and NB was used as non-selective media to identify further strains. From the MM, a unique strain with 100% sequence similarity to *Pseudomonas* sp. B1_64 was isolated. This result shows the presence of *Pseudomonas* species which were used in the BTF1 inoculation after more than 3 months of operation. Previous studies have pointed out that *Pseudomonas* is one of the typical bacterial species found in biofilms from bioreactors treating VOC emissions [35,36].

Six different strains were isolated in NB medium and their nucleotide sequences were determined. The analysis indicated that these strains have 99–100% sequence similarity with *Microbacterium* sp. 111H3b, *Chryseobacterium* sp. CHKOV-5M, *Acinetobacter* sp. Ooi24, *Pseudomonas* sp.

B1_64, *Sphingobacterium* sp. P031 and *Mycobacterium* sp. SWH-M4. Table 3 shows the accession numbers, similarities to related GenBank sequences and the phylum and class for each strain. The presence of at least six species after 100 days of operation indicates the evolution of a complex microbial biocoenosis consisting of primary degraders of 2-butoxyethanol, such as *Pseudomonas* sp. BOE200, and other non-biodegrading bacteria in the biofilm during VOC degradation. The presence of these other species can be explained by the non-sterile operational conditions in the bioreactor.

In fact, microbial communities in technical ecosystems can adapt and change their composition in accordance with variable physicochemical operational conditions [28]. The bacterial diversity observed in the biofiltration studies may be explained by the resource availability and by the large numbers of saprophytic microorganisms dominating the bioreactor and consuming cellular products or extrapolymeric substances [37].

Table 3 Accession numbers in GenBank, levels of similarity and corresponding phylogenetic groups of the strains identified and isolated by plating methods in BTF1.

Closest organism in GenBank (accession No.)	Similarity (%) ^a	Phylogenetic group ^b
<i>Microbacterium</i> sp. 111H3b (KJ744028)	99	Actinobacteria/ Actinobacteridae
<i>Chryseobacterium</i> sp. CHKOV-5M (KF499317)	100	Bacteroidetes/ Flavobacteria
<i>Acinetobacter</i> sp. Ooi24 (AB933637)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
<i>Pseudomonas</i> sp. B1_64 (KC306412)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
<i>Sphingobacterium</i> sp. P031 (KC252768)	99	Bacteroidetes/ Sphingobacteria
<i>Mycobacterium</i> sp. SWH-M4 (KJ729254)	100	Actinobacteria/ Actinobacteridae

^aSequences were matched with the closest relative from the GenBank database.

^bPhylum/class.

DGGE profile, sequencing and analysis of 16S ribosomal DNA in BTF2

DGGE was applied in BTF2 in order to monitor microbial population evolution. Fig. 5a shows the DGGE banding patterns of samples from days 0 (inoculum), 40, 60 and 80. The spatial distribution of the bacterial community along the reactor was studied by including samples from the bottom port (30 cm) and the top port (70 cm). Additionally, samples from the recirculation tank were also analysed in parallel. Fig. 5b shows the DGGE profile for the samples taken at the end of the experiment (day 100) from: the top port of the bioreactor, a MM plate cultivated with a sample from the recirculation solution and a MM plate cultivated with a sample from the top port. The samples from the MM plates allowed the identification of bands that matched with species able to use 2-butoxyethanol.

The predominant bands of the native samples (named with numbers in Fig. 5a) of the DGGE profile from day 40 to 80 were excised and sequenced. DGGE band designation, accession numbers, similarities to related GenBank sequences and the phylum and class of each strain are summarised in Table 4. The corresponding sequences exhibited a similarity of >96% with: *Pseudomonas aeruginosa* (band 1), *Pseudomonas putida* (band 2), *Sphingobacterium mizutaii* (band 3), *Lactobacillus brantae* (band 4), *Lactobacillus curvatus* (band 5), *Pedobacter koreensis* (band 6), *Marivirga tractuosa* (band 7), *Rubrobacter naiadicus* (band 8) and *Acidovorax avenae* (band 9).

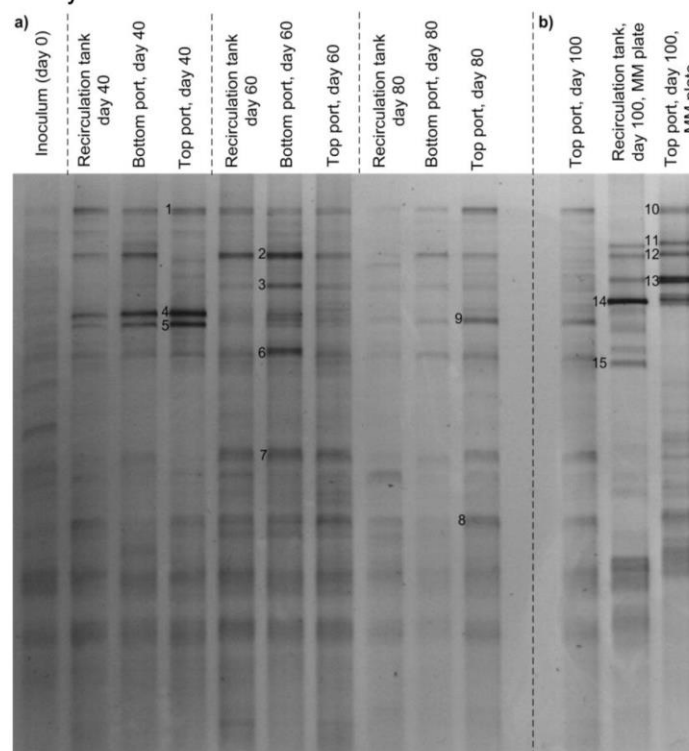


Fig. 5 DGGE profiles from samples of the BTF2. **a)** Samples at days 40, 60 and 80 from the recirculation solution, bottom and top port, **b)** Samples at day 100 from the top port, a MM plate cultivated with a sample from the recirculation solution and a MM plate cultivated with a sample from the top port.

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

Table 4 DGGE band designation, accession numbers in GenBank and levels of similarity to related organisms according to Fig. 5a.

DGGE band	Closest organism in GenBank (accession No.)	Similarity (%) ^a	Phylogenetic group ^b
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SNP0614 (NR_118644.1)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
2	<i>Pseudomonas putida</i> F1 strain F1 (NR_074739.1)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
3	<i>Sphingobacterium mizutaii</i> strain NBRC 14946 (NR_113705.1)	99	Bacteroidetes/ Sphingobacteria
4	<i>Lactobacillus brantae</i> strain SL1108 (NR_125575.1)	100	Firmicutes/ Bacilli
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> (DQ336384.1)	100	Firmicutes/ Bacilli
6	<i>Pedobacter koreensis</i> strain NBRC 101153 (NR_113980.1)	100	Bacteroidetes/ Sphingobacteria
7	<i>Marivirga tractuosa</i> strain DSM 4126 (NR_074493.1)	95	Bacteroidetes/ Cytophagia
8	<i>Rubrobacter naiadicus</i> strain RG-3 (NR_125704.1)	96	Actinobacteria/ Rubrobacteridae
9	<i>Acidovorax avenae</i> strain ATCC 19860 (NR_102856.1)	100	Proteobacteria; Betaproteobacteria

^aSequences were matched with the closest relative from the GenBank database.

^bPhylum/class.

Table 5 DGGE band designation, accession numbers in GenBank and levels of similarity to related organisms according to Fig. 5b.

DGGE band	Closest organism in GenBank (accession No.)	Similarity (%) ^a	Phylogenetic group ^b
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SNP0614 (NR_118644.1)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
11	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain NBRC 13111 (NR_113606.1)	100	Proteobacteria/ Betaproteobacteria
12	<i>Pseudomonas putida</i> F1 strain F1 (NR_074739.1)	100	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria
13	<i>Alcaligenes aquatilis</i> strain LMG 22996 (NR_104977.1)	100	Proteobacteria/ Betaproteobacteria
14	<i>Bacillus flexus</i> strain NBRC 15715 (NR_113800.1)	100	Firmicutes/ Bacilli
15	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i> strain Ca7 (NR_118455.1)	100	Firmicutes/ Bacilli

^aSequences were matched with the closest relative from the GenBank database.

^bPhylum/class.

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

The dominant bands of the samples from the MM plates on day 100 were also excised and sequenced (named with numbers in Fig. 5b). Table 5 summarises the DGGE band designation, accession numbers and the phylum and class of each strain. These bands belong to species that present the ability to use 2-butoxyethanol as carbon source. The corresponding sequences of bands exhibited a high level of similarity (100%) with: *Pseudomonas aeruginosa* strain SNP0614 (band 10), *Alcaligenes faecalis* strain NBRC 13111 (band 11), *Pseudomonas putida* F1 strain F1 (band 12), *Alcaligenes aquatilis* strain LMG 22996 (band 13), *Bacillus flexus* strain NBRC 15715 (band 14) and *Fictibacillus phosphorivorans* strain Ca7 (band 15).

The DGGE profile of BTF2 revealed patterns in the composition of the bacterial community. Several bands that appear in the inoculum (activated sludge) disappeared on day 40, while other bands, such as band 6, were conserved during the whole experiment. In contrast, the majority of bands appearing from days 40 to 100, such as bands 1, 2, 4, 5 and 8, were not found in the original inoculum. As a consequence, the bacterial community from days 40 to 100 was composed of species that were either dominant in the original inoculum or of low relevance. Several authors have previously described the divergence between the original inoculum and the microbial community developed in a technical system after an acclimatisation period [38,39]. The bacterial classes, including the species involved in the removal of 2-butoxyethanol from day 40, such as *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* or *Sphingobacteria*, have been found in bacterial communities previously analysed for the treatment of VOCs emissions [23,40–42].

As can be seen in Fig. 5a, two bands (band 1 and 2) detected in BTF2 match species able to use 2-butoxyethanol as carbon source (band 10 and 12). Bands 1 and 10 belong to the species *Pseudomonas aeruginosa* and bands 2 and 12 to the species *Pseudomonas putida*. The bands 1 and 2, associated with the *Pseudomonas* species, appeared in the BTF on day 40 despite not being detected in the inoculum source. The capability of *Pseudomonas* species to degrade VOCs and to emerge in bioreactors has been demonstrated previously, even though *Pseudomonas* sp. was not used as an inoculum of the bioreactors [19,43,44]. The results suggest that *Pseudomonas* species can easily proliferate in a 2-butoxyethanol-degrading environment, independently of whether they were found in the inoculum or not.

Regarding the operational changes carried out in the bioreactor, the increase in the IL on day 42 (from 130 to 195 g m⁻³ h⁻¹) caused slight changes in the DGGE profile between days 40 and 60. As can be seen in Fig. 5a bands 4 and 5 tended to disappear after day 40, but new bands (bands 3 and 7) appeared on day 60. Bands 1 and 2 corresponding to *Pseudomonas* species, presented the highest intensity at day 60. Although the bacterial community showed smooth shifts during the days 40 to 60, no significant changes in the performance of the bioreactor were observed. Interestingly, the change in the spraying frequency on day 69 had no effect on the DGGE profiles between days 60 and 80. Thus, the improvement in the performance of the bioreactor from day 69 onwards was related to the physical phenomena involved in the decrease of the spraying frequency in the case of VOCs with high water solubility, such as 2-butoxyethanol.

The analysis of the DGGE profile shows a similar banding pattern along the filter bed and the recirculation tank, thus indicating a homogeneous bacterial composition caused by the recirculation solution. This fact has previously been observed [45]. In contrast, conventional biofilters usually present a stratification of bacterial communities along the filter height [37,46] due to the use of a low flow rate of nutrient solution, which is usually sprayed infrequently (e.g. once per day), among other factors.

Conclusions

With the exception of Woiski [32], the aerobic biodegradation of 2-butoxyethanol by biotrickling filtration has not been reported previously. Two different BTFs, which were built with the same relative dimensions, worked at the same operation and hydraulic conditions. The systems were started with different inoculum sources, a pure culture of *Pseudomonas* sp. BOE200 (BTF1) as a 2-butoxyethanol-degrading strain and activated sludge (BTF2), and operated for 100 days. Despite using different inoculum sources, similar ECs were achieved with values of 110.6 and 89.6 g m⁻³ h⁻¹ for BTF1 and BTF2, respectively, at an IL of 195 g m⁻³ h⁻¹.

The outcomes of the microbial analysis in each bioreactor indicated that a complex bacterial community was developed throughout the experimental time and it was different from that observed in the inoculum sources. In the case of BTF1, different strains were identified after 100 days with *Pseudomonas* sp. as the only 2-butoxyethanol degrading-strain.

This study shows that two different microbial communities developed from two different inoculum sources were able to remove similar quantities of 2-butoxyethanol, demonstrating the irrelevance of the origin of the inoculum. Therefore, the use of activated sludge without prior acclimation (the most simple inoculation procedure) is an advantageous strategy for industrial applications.

In the case of BTF2, 2-butoxyethanol-degrading strains, such as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, were observed from day 40 onwards, despite the fact that these species were not identified as predominant in the inoculum source, confirming the large degradation potential of *Pseudomonas* species.

Acknowledgements

*This project received funding from the Ministerio de Economía y Competitividad (Project CTM2010-15031/TECNO) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2013/053), Spain. M.C. Pérez acknowledges the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain for her FPU contract (AP2009-2645). We would like to thank Dr. Kevin Portune for his assistance in the microbiological tests at the University of Valencia. Finally, we would also like to thank the staff of the Department of Biological Waste Air Purification of the University of Stuttgart, especially Christine Woiski for pre-isolation of the strain *Pseudomonas* sp. BOE200 and for allowing us to use this strain.*

References

- 1 Chemist, A. (2001) ChemSpider SyntheticPages. <http://cssp.chemspider.com>
- 2 Fischer, A. and Hahn, C. (2005) Biotic and abiotic degradation behaviour of ethylene glycol monomethyl ether (EGME). *Water. Res.* 39, 2002–2007
- 3 National Toxicology Program (NTP) (2000) Toxicology and carcinogenesis studies of 2-butoxyethanol (CAS No. 111-76-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). Technical report series 484, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Bethesda, Maryland
- 4 Council Directive 2010/75/EU of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention and control). 17.12.2010. *Official Journal of European Union*.
- 5 Delhomenie, M.C. and Heitz, M. (2005) Biofiltration of air: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 53–72
- 6 Moe, W. and Irvine, R. (2000) Polyurethane foam medium for biofiltration. I: Characterization. *J. Environ. Eng.* 126, 815–825
- 7 He, Z. et al. (2009) Comparative study of the eliminating of waste gas containing toluene in twin biotrickling filters packed with molecular sieve and polyurethane foam. *J. Hazard. Mater.* 167, 275–281
- 8 Zhou, L. et al. (2010) Synthesis and characterization of novel magnetic Fe₃O₄/polyurethane foam composite applied to the carrier of immobilized microorganisms for wastewater treatment. *Res. Chem. Intermed.* 36, 277–288
- 9 Cai, Z. et al. (2004) Evaluation of trickle-bed air biofilter performance for MEK removal. *J. Hazard. Mater.* B114, 153–158
- 10 Mathur, A.K. and Majumder, C.B. (2008) Biofiltration and kinetic aspects of a biotrickling filter for the removal of paint solvent mixture laden air stream. *J. Hazard. Mater.* 152, 1027–1036
- 11 López, M.E. et al. (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
- 12 Morotti, K. et al. (2011) Analysis and comparison of biotreatment of air polluted with ethanol using biofiltration and biotrickling filtration. *Environ. Technol.* 33, 1967–1973
- 13 San-Valero, P. et al. (2013) Biotrickling filtration of isopropanol under intermittent loading conditions. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 36, 975–984
- 14 Popov, V.O. et al. (2004) Evaluation of industrial biotrickling filter at the flexographic printing facility. *Environ. Prog.* 23, 39–44
- 15 Sempere, F. et al. (2008) Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere.* 73, 1533–1539
- 16 Li, J. et al. (2012) Performance of a biotrickling filter in the removal of waste gases containing low concentrations of mixed VOCs from a paint and coating plant. *Biodegradation.* 23, 177–187
- 17 Pielech-Przybylska, K. (2006) Acetone biodegradation in a trickle-bed biofilter. *Int. Biodeter. Biodegr.* 57, 200–206
- 18 Avalos-Ramírez, A. et al. (2009) Control of methanol vapours in a biotrickling filter: performance analysis and experimental determination of partition coefficient. *Bioresour. Technol.* 100, 1573–1581
- 19 Pérez, M.C. et al. (2014) Abatement of styrene waste gas emission by biofilter and biotrickling filter: comparison of packing materials and inoculation procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 19–32
- 20 An, T. (2010) Comparison of the removal of ethanethiol in twin-biotrickling filters inoculated with strain RG-1 and B350 mixed microorganisms. *J. Hazard. Mater.* 183, 372–380
- 21 Li, G. et al. (2008) Comparative study of the elimination of toluene vapours in twin biotrickling filters using two microorganisms *Bacillus cereus* S1 and S2. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1019–1026
- 22 Maestre, J.P. et al. (2010) Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere.* 80, 872–880
- 23 Kristiansen, A. et al. (2011) Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 344–352
- 24 Okunishi, S. et al. (2012) Transformation of microflora during degradation of gaseous toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE. *J. Air. Waste. Manag. Assoc.* 62, 748–757

Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam

- 25 Yu, J. et al. (2014) Degradation of dichloromethane by an isolated strain *Pandoraea pnomenusa* and its performance in a biotrickling filter. *J. Environ. Sci.* 26, 1108–1117
- 26 Barcon, T. et al. (2012) Molecular and physiological approaches to understand the ecology of methanol degradation during the biofiltration of air streams. *Chemosphere.* 87, 1179–1185
- 27 Zehraoui, A. et al. (2014) Impact of alternate use of methanol on n-hexane biofiltration and microbial community structure diversity. *Biochem. Eng. J.* 85, 110–118
- 28 Portune, K. et al. (2014) Investigating bacterial populations in styrene-degrading biofilters by 16s rDNA tag pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-014-5868-3
- 29 Jianming, Y. et al. (2014) Dichloromethane removal and microbial variations in a combination of UV pretreatment and biotrickling filtration. *J. Hazar. Mater.* 268, 14–22
- 30 Álvarez-Hornos, F.J. et al. (2011) Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector. *Biochem. Eng. J.* 58–59, 154–161
- 31 Wan, S., et al. (2011) Purification of waste gas containing high concentration trimethylamine in biotrickling filter inoculated with B350 mixed microorganisms. *Biores. Technol.* 102, 6757–6760
- 32 Woiski, C. (2010) Der Abbau von 2-Butoxyethanol und dessen biotechnologische Anwendung in einem Biowäscher. Diplomarbeit. Universität Stuttgart
- 33 Clesceri, L.S. et al. (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington
- 34 Chang, K.S. and Lu, C. (2003) Biofiltration of isopropyl alcohol and acetone mixtures by a trickle-bed air biofilter. *Biodegradation.* 14, 9–18
- 35 Roy, S. et al. (2003) *Pseudomonas putida* as the dominant toluene-degrading bacterial species during air decontamination by biofiltration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 366–373
- 36 Paca, J. et al. (2001) Styrene degradation along the bed height of perlite biofilter. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 873–878
- 37 Cabrol, L. and Malhautier, L. (2011) Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 837–849
- 38 Steele, J.A. et al. (2005) Structure of microbial communities in ethanol biofilters. *Chem. Eng. J.* 113, 135–143
- 39 Babbitt, C.W. et al. (2009) Methanol removal efficiency and bacterial diversity of an activated carbon biofilter. *Bioresour. Technol.* 100, 6207–6216
- 40 Doble, M. and Kumar, A. (2005) Gaseous pollutants and volatile organics, in *Biotreatment of industrial effluents*, ed. by Elsevier Butterworth-Heinemann, Burlington, USA, pp. 301–310
- 41 Cho, K.S., et al. (2007) Thermophilic biofiltration of benzene and toluene. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(12), 1976–1982
- 42 Ralebitso-Senior, T.K. et al. (2012) Waste gas biofiltration: advances and limitations of current approaches in microbiology. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8542–8573
- 43 Zare, H. et al. (2012) Biofiltration of ethyl acetate by *Pseudomonas putida* immobilized on walnut shell. *Bioresour. Technol.* 123, 419–423
- 44 Zhao, L. et al. (2014) A demonstration of biofiltration for VOC removal in petrochemical industries. *Environ. Sci. Process. Impacts.* DOI 10.1039/c3em00524k
- 45 Tresse, O. et al. (2002) Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 585–590
- 46 Khammar, N. et al. (2005) Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *J. Appl. Microbiol.* 98, 476–490

8. Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector

Este trabajo está publicado en Biochemical Engineering Journal, vol. 58-59, 154-161. Elsevier B.V. ha concedido el derecho de incluir este artículo científico en la presente tesis doctoral.



Evaluation of a pilot-scale biotrickling filter as a VOC control technology for the plastic coating sector

F.J. Álvarez-Hornos, C. Lafita, V. Martínez-Soria, J.M. Peña-Roja, M.C. Pérez, C. Gabaldón*

Research Group GPAM, Department of Chemical Engineering, Universitat de València, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Received in revised form 1 August 2011

Accepted 10 September 2011

Available online 17 September 2011

Keywords:

Biodegradation

Biofilters

Fluorescence in situ hybridisation

Volatile organic compounds

ABSTRACT

The performance and feasibility of a biotrickling filter (BTF) pilot unit for the treatment of exhaust gases from two robotic spray paint booths at a plastic coating facility were investigated. The volatile organic compound (VOC) concentrations in the emissions of the exhaust gases from the paint booths were relatively stable, although the VOC composition depended on the applied solvent-paint formulation in the booths. The pilot plant was operated for one year at empty bed residence times (EBRTs) ranging from 30 to 93 s. The performance of the system was affected by the solvent-paint formulations. An EBRT between 30 and 40 s was enough to meet legal requirements for products containing more than 60% biodegradable compounds, whereas a minimum EBRT of 80 s was required for emissions mainly composed of hydrophobic VOCs. The dynamics of the microbial population was carried out by fluorescence in situ hybridisation (FISH), indicating a high microbial diversity with composition changes associated with the solvent-paint used. The feasibility of the BTF was evaluated, showing that this technology is economically and environmentally competitive in comparison with thermal treatment technology.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The plastic coating sector covers activities in which continuous coating films are applied with the aim of adding special effects and/or required properties to the plastic components. In fact, the automotive industry consumes approximately 75% of the solvent-based paint used for this sector [1]. In the side mirrors manufacturing, volatile organic compound (VOC) emissions characterised by high flow rates and low and dynamically variable VOC concentrations occur during the coating and drying steps. In this context, new European VOC emission limits have been established in the VOC Solvent Emissions Directive for this sector (Council Directive 1999/12/EC), therefore, abatement technologies are required. Among the available technologies, biological treatment has been included as an end-of-pipe technique for waste gas abatement in installations for the surface treatment of substances using organic solvents [2].

Vapour phase biotechnologies are based on the capability of microorganisms to utilise their metabolism to transform organic pollutants into less toxic compounds. Among biotreatments, the biotrickling filter (BTF) works by passing air through inert packing material while a liquid stream is re-circulated over the bed.

A biofilm is developed on the packing surface and the nutrients are supplied by the liquid phase, allowing for greater pH control and yielding a more stable operation in comparison with biofilters. These characteristics, along with a larger air-liquid surface area, lead to higher VOC removal rates than those obtained with conventional biofilters [3]. From biofiltration studies at laboratory scale dealing with the removal of VOC mixtures from paint application [4-8] can be derived that the performance of biotechnologies relies on the chemical composition of the solvent paints, which usually contain a mixture of easily biodegradable and recalcitrant organic compounds. Literature data indicate that additional testing is required to demonstrate the robustness of the technology. In this sense, pilot/full-scale studies at industrial sites give practical information of the performance of the process under fluctuating and oscillating emissions related to the manufacturing working plan. These studies are still scarce [9,10], further information to assess the BTFs in real situations is demanded.

Although extensive efforts have been made to optimise BTFs from a design and operation perspective, BTFs still lacked in detailed biological information about the structure and dynamics of their microbial communities. Biological molecular tools such as fluorescence in situ hybridisation (FISH) [11-14], denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [15,16] and cloning and sequencing of ribosomal RNA genes [17,18] are being applied for evaluating changes of microbial population.

The purpose of this work was to assess the feasibility of a pilot-scale biotrickling filter as an environmentally friendly

* Corresponding author. Tel.: +34 963543331; fax: +34 963544898.

E-mail address: carmen.gabaldon@uv.es (C. Gabaldón).

URL: <http://www.uv.es/giam> (C. Gabaldón).

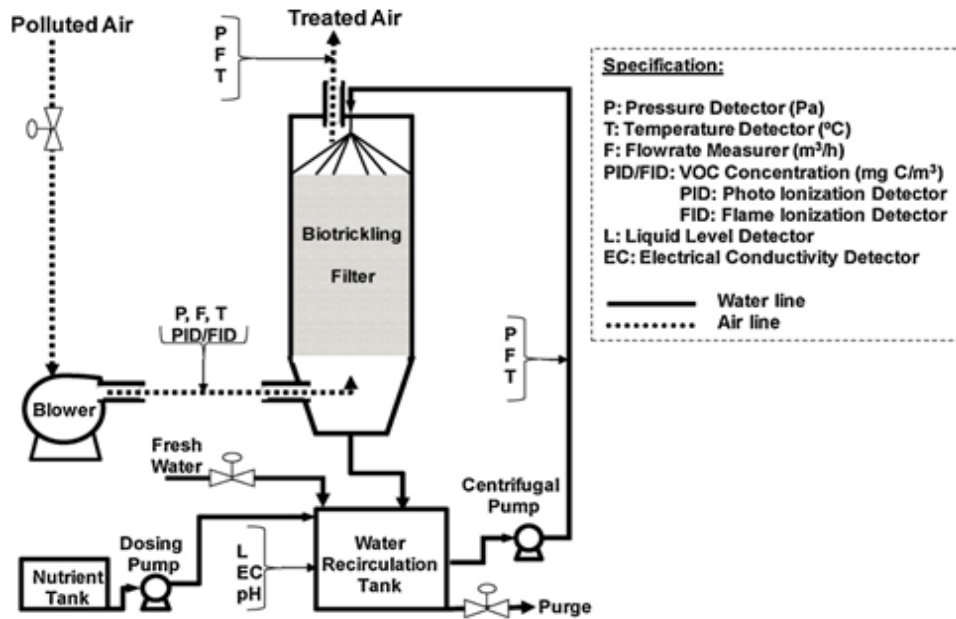


Fig. 1. Scheme and layout of the pilot-scale BTF.

biotechnology in the VOC control of exhaust gases from spray paint booths at a plastic coating facility (located in Soria, Spain). The following objectives were taken into account: (1) to determine the minimum empty bed residence time (EBRT) value that enabled legal regulations to be met, (2) to evaluate the influence of the VOC composition of waste gases in the removal efficiency, (3) to carry out a feasibility study of BTF technology using the experimental results, and (4) to determine the dynamics of the microbial populations using the FISH technique.

2. Materials and methods

2.1. Pilot-scale system

The pilot-scale BTF plant was supplied by Pure Air Solutions B.V. (The Netherlands). The scheme and layout of the pilot BTF is presented in Fig. 1. The biological reactor, a column with a volume of 0.75 m³, was randomly filled with two inches of nominal diameter FlexiringTM propylene rings (Koch-Glitsch B.V.B.A., Belgium), with a 93% void fraction. The bioreactor was operated in counter-current mode. VOC-polluted air from the factory was introduced below the column at a daily flow rate varying from 29 to 90 m³ h⁻¹. Recirculated water was poured on the top of the filter media at a flow rate of 1.2 m³ h⁻¹ and the spraying frequency was fixed at 20 min per h. The trickled water was collected in a 0.4 m³ recirculation tank. The liquid level of this tank was controlled, so that fresh water was added when the level of water decreased as a consequence of evaporation. Recycled water was fully drained and replaced with fresh water once a month. A nutrient dosing system composed of a 100 L nutrient vessel and a dosing pump was set up in the pilot unit. The nutrient solution (pH = 7, urea (6.5 g L⁻¹), Na₃PO₄·12H₂O (7.4 g L⁻¹), CaCl₂ (12.7 mg L⁻¹), Fe₂(SO₄)₃ (4.8 mg L⁻¹), ZnSO₄·7H₂O (0.2 mg L⁻¹), CoCl₂·6H₂O (0.2 mg L⁻¹), MnCl₂·4H₂O (0.1 mg L⁻¹), Na₂MoO₄·2H₂O (0.1 mg L⁻¹), NiSO₄·6H₂O (0.1 mg L⁻¹) and H₃BO₃ (0.2 mg L⁻¹)) was added to the recirculation tank at a maximum rate of 0.15 L h⁻¹ in order to achieve a C_{loaded}/N_{supplied} mass ratio above 30–40. The system was equipped with a programmable logic controller, and a set of sensors and devices enabled control and monitoring of the plant via modem communication.

The experiments presented in this study were carried out in two consecutive phases related to VOC control of exhaust gases from two different robotic spray paint booths of the plastic coating facility. In this factory, side mirrors for cars are coated in three serial robotic spray booths (primer, base coat and clear coat layers). From the three existing sources of VOC emissions, the clear coat and the base coat spray booths were selected as the foci for this work. In phase I, the gaseous emissions from the clear coat spray booth was piped to the pilot plant over a period of 7 months. In phase II, the base coat booth exhaust gases were conducted to the pilot plant for 6 months. The emissions from these booths contained a mixture of oxygenated and aromatic compounds coming from the formulation of the product applied in the process (a mixture of a specific coat with its thinner). In each phase, the pilot-scale unit was operated at EBRTs between 30 and 93 s (air flows between 29 and 90 m³ h⁻¹) in order to determine the minimum EBRT values that enables legal regulations to be met (emission limit value (ELV): an average value of 75 mg C Nm⁻³ for all valid readings, with none of the hourly averages exceeding the ELV by more than a factor of 1.5).

The pilot-scale biotrickling system was inoculated with activated sludge from a municipal Wastewater Treatment Plant, WWTP, (located in Soria, Spain) without further acclimation, in order to simulate operational protocols at an industrial site. An inoculum volume of 100 L was added to the recirculation tank and continuously flowed through the bed for 72 h.

The EBRT(s) and removal efficiency, RE (%) were determined using the relationships between the inlet VOC concentration, C_{in} (g C Nm⁻³), the outlet VOC concentration, C_{out} (g C Nm⁻³), the gas flow rate, Q (Nm³ h⁻¹), and the reactor volume, V (m³), as follows:

$$EBRT = \frac{V}{Q} \quad (1)$$

$$RE = 100 \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \right) \quad (2)$$

2.2. Analytical techniques

Inlet and outlet gas temperatures, inlet and outlet total VOC concentrations (measured using two photo ionisation detectors,

Table 1

List of oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Specificity	Sequence (5'–3')	Formamide (%)	References
EUB338 ^a	Most Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0–50	[19]
EUB338-II ^a	Other Bacteria not detected by EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0–50	[19]
EUB338-III ^a	Other Bacteria not detected by EUB338	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0–50	[19]
ALF968	α -Proteobacteria	GGTAAGGTCTCGCGCTT	20	[19]
BET42A	β -Proteobacteria	GCCTTCCCACCTCGTTT	35	[19]
–	Competitor for BET42A	GCCTTCCCACATCGTTT	35	[19]
GAM42A	γ -Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	35	[19]
–	Competitor for GAM42A	GCCTTCCCACCTCGTTT	35	[19]
HGC69A	Actinobacteria (high G + C Gram positive bacteria)	TATAGTTACCCACCCCGT	25	[19]
–	Competitor for HGC69A	TATAGTTACCCGCGCCGT	25	[19]
LGC354A ^b	Firmicutes (low G + C Gram positive bacteria)	TGGAAGATCCCTACTGC	35	[19]
LGC354B ^b	Firmicutes (low G + C Gram positive bacteria)	CGGAAGATCCCTACTGC	35	[19]
LGC354C ^b	Firmicutes (low G + C Gram positive bacteria)	CCGAAGATCCCTACTGC	35	[19]

^a EUB338, EUB338-II, EUB338-III were used in the mixture called EUB_{mix}.^b LGC354A, LGC354B, LGC354C were used in the mixture called LGC_{mix}.

or PIDs), air flow, the pressure drop between the gas inlet and the outlet of the media bed, tank levels, and the conductivity, pH and temperature of the trickling solution were continuously monitored. Samples of the recirculated water were collected to analyse COD, TOC (TOC-V_{CSH} model, Shimadzu, Japan), suspended solids and nitrogen and phosphorus content. A total hydrocarbon analyser (Nira Mercury model 901, Spirax-Sarco, Spain) was periodically used to check and calibrate the PID sensors. The response of the total hydrocarbon analyser was calibrated using a standard mixture of propane (1473 mg C Nm⁻³) in nitrogen gas (Carburos Metálicos, Spain). The identification and quantification of the main VOCs presented in the emissions and solvents used in the two robotic spray booths were carried out by GC–MS. Analyses were conducted using a mass spectrometer (5973N model, Agilent Technologies, USA) and a gas chromatograph (6890N model, Agilent Technologies, USA) equipped with a HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.26 μ m, Agilent Technologies, USA). The gas carrier was helium at a flow-rate of 4.4 cm³ min⁻¹. The injector temperature was 250 °C. The oven temperature was initially set at 60 °C and held at that temperature for 5 min after injection. Next, the temperature was raised from 60 °C to 180 °C at a heating rate of 3 °C min⁻¹. Then, it was increased to 300 °C at 20 °C min⁻¹. This maximum temperature was held for 20 min prior to cooling down to 60 °C. Compound identification was based on their fragmentation patterns and by comparison of their mass spectra with the NIST database V2.0 and the Wiley mass spectral library.

2.3. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)

The FISH technique was carried out following the procedure described by Maestre et al. [14], with a Cy5-labelled EUB_{mix} probe for most bacteria and Cy3-labelled specific probes (Thermo Fisher Scientific, Germany). Table 1 lists the oligonucleotide probes used in this study. Biofilm samples were taken from the packing material of the BTF pilot unit and were homogenised using an IKA ultra-turrax T15. Afterwards, the samples were fixed by using the procedure described by Amann et al. [20]. Hybridisation was performed at 46 °C for 2 h with formamide according to the details specified in Table 1 for each probe. Slides were examined by using a Leica TCS SP confocal laser scanning microscope (CLSM, Leica Microsystems, Germany). Specific probes were quantified as a proportion of EUB_{mix} labelled bacteria using image analysis with the methodology developed by Jubany et al. [21].

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of emissions from the spray paint booths

The industrial site operates full-time, 24 h a day, from 6:00 am on Monday to 6:00 am on Saturday, with shut down periods on weekends. The gas flow rates exiting the spray booth systems were approximately 35 000 Nm³ h⁻¹ for the clear coat booth and 45 000 Nm³ h⁻¹ for the base coat booth. The daily average emission temperatures of the outlet emissions varied between 8 and 33 °C throughout the experimental period due to ambient temperature changes between the winter and summer seasons. The VOC concentrations at the two foci were relatively stable during working hours, with hourly average values ranging from 100 to 450 mg C Nm⁻³. The daily average VOC concentrations for the clear coat and the base coat booths were 235 ± 57 mg C Nm⁻³ and 153 ± 38 mg C Nm⁻³, respectively. Two typical VOC concentration emission patterns from both booth systems over one working day are shown in Fig. 2. As can be observed, due to the inlet hourly average VOC concentrations exceeded the ELV by a factor greater than 1.5 (maximum hourly legal limits), treatment of booth emissions may be required at both foci.

During the entire test period, the industrial facility used three different product formulations in the clear coat booth (named here as A, B and C) and one product formulation in the base coat booth (named here as D), each of which consisted of a mixture of a specific coat with its thinner, resulting in differences in the VOC compositions for the waste gas from the spray booths. The product formulations used by the facility during the experimental period in both spray booths are summarised in Table 2. As can be observed, products A and B contained oxygenated compounds such as butyl acetate, butyl glycol acetate and methyl acetate (>70%) and the solvent naphtha including small proportions of aromatic compounds (xylenes and ethylbenzene). Product C was mainly composed of hydrophobic and relatively recalcitrant substances (~60%) with a high proportion of heavy aromatics, and a water soluble compound fraction of only 40% (mainly n-butyl acetate). Product D was similar in chemical composition to products A and B, with a water soluble and readily biodegradable substances fraction of 60%.

3.2. Pilot unit performance

After inoculation (day 0), the pilot plant was connected to the clear coat focus for 7 months (phase I). During the first days of operation, a relatively low level of VOC removal was observed (RE <20% for Product C). However, a progressive increase in removal

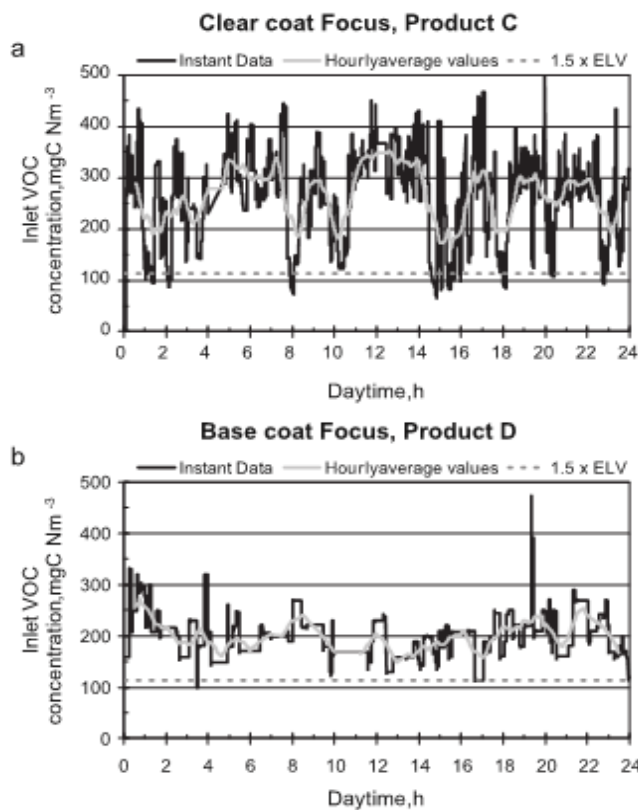


Fig. 2. Typical instant and hourly average VOC concentration emission patterns in the studied foci: clear coat focus, phase I (a), and base coat focus, phase II (b). The discontinuous line represents a factor of 1.5 times the ELV.

efficiency was achieved until stable performance of the pilot plant in the first month, with RE ~50% (Product C, EBRT=50 s), due to the fact that biofilm was being developed on the packing material. This fact can be observed in Fig. 3, where the inlet and outlet hourly average VOC concentrations obtained at days 5 and 30 of operation are plotted. Martínez-Soria et al. [9] reported RE values higher than 70% a few days after starting up a BTF pilot plant installed in a furniture manufacturing facility by using pre-adapted biomass. The length of time it took to reach stable performance

can be attributed to the variability in concentrations along with the intermittent pattern associated with weekend shutdowns, as both factors slowed down the start-up process. Product C contains a high proportion of hydrophobic aromatic and relatively recalcitrant substances (~60%), and the absence of biomass adapted to these compounds, since the inoculum was an activated sludge from a municipal WWTP, could also have prolonged the start-up period.

During the next six months, phase I, periodic changes in the VOC composition of the exhaust gases from the clear coat spray booth took place. These changes were associated with the different products applied in this booth (Product A, B or C). The air flow rate through the pilot plant was periodically adjusted to values ranging from 33 to 90 m³ h⁻¹, corresponding to EBRTs between 30 and 80 s, in order to determine the minimum EBRT values that enable legal regulations to be met for each solvent-based paint product. The performance of the pilot unit was dramatically affected by the formulation of the product used in the coating process. The inlet and outlet hourly average VOC concentrations obtained during a typical day of operation working with the minimum EBRT that allows legal compliance for products A and C are plotted in Fig. 4a and b, respectively. For product A, which is mainly composed of readily biodegradable VOCs (>70%), the system was able to meet legal regulations working with an EBRT as low as 30 s (daily average outlet VOC concentration of 56 mg C Nm⁻³). For product B, similar results were obtained. However, for product C, an EBRT of 80 s was necessary to achieve similar RE as with products A and B, increasing the required size of the industrial scale bioreactor by more than twice in order to ensure the adequate removal of the slowly biodegradable compounds. It is worth noting that the Christmas holidays took place at the end of the second month of operation of the pilot unit. VOCs were not fed into the bioreactor, and air flow, water trickling and nutrients were maintained at reduced levels. The former levels of efficiency were restored almost as soon as normal operation was re-established, showing the robustness of the biological technology (data not shown here).

In the seventh month of operation, a change in the pilot unit from the clear coat focus to the base coat focus was conducted. Then, the pilot unit was operated at different EBRTs ranging from 45 to 93 s for 6 months (phase II). In this focus, product D was applied in the coating process. Fig. 4c represents the inlet and outlet hourly average VOC concentrations obtained during a typical day of operation working with an EBRT of 45 s. For this focus, an EBRT value of 45 s was shown enough to meet legal compliance (daily average outlet VOC concentration of 37 mg C Nm⁻³).

Table 2
Product formulations used for the clear coat and base coat foci during the experimental period.

Products clear coat focus	Clear coat (70 wt%)	Thinner (30 wt%)
A	Xylenes 10–25% n-Butyl acetate 10–25% 2-Methoxy-1-methylethyl acetate 10–25% Isobutyl acetate 10–25%	n-Butyl acetate 100%
B	Butyl glycol acetate 25–50% Naphtha, light aromatic 10–25% Naphtha, heavy aromatic 2.5–10% 1,2,4-Trimethyl benzene 2.5–10%	n-Butyl acetate 25–50% Butyl glycol acetate 10–25% 1,2,4-Trimethyl benzene 2.5–10% Naphtha, light aromatic 2.5–10% Xylenes 2.5–10%
C	n-Butyl acetate 25–50% Xylenes 25–50% N-methylpyrrolidinone 2.5–10% Ethylbenzene 1–2.5%	Naphtha, heavy aromatic 75–100% Naphthalene 2.5–10% 2-Butoxy ethanol 2.5–10% Cumene 1–2.5%
Product base coat focus	Base coat (70 wt%)	Thinner (30 wt%)
D	n-Butyl acetate 25–50% Xylenes 25–50% 1-Butanol 2.5–10%	Naphtha, light aromatic 25–50% n-Butyl acetate 10–25% Butyl glycol acetate 10–25% Ethylene glycol monobutyl ether 2.5–10%

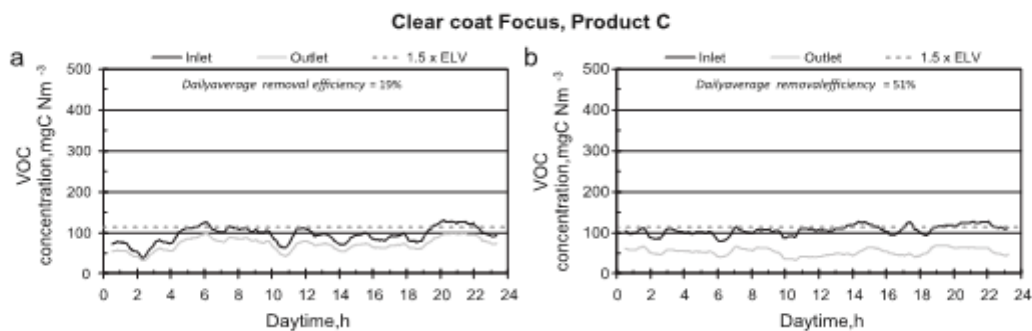


Fig. 3. Hourly averages of inlet and outlet VOC concentrations after 5 (a) and 30 days from pilot unit inoculation (b). The discontinuous line represents a factor of 1.5 times the ELV.

The outlet versus the inlet VOC hourly average concentration for typical days at three different EBRTs for both selected foci are represented in Fig. 5. The products used in the clear coat booth, product A, and C have been plotted in Fig. 5a and b, respectively. Product D used in the base coat booth has been presented in Fig. 5c. As can be observed, for product A the system was able to meet legal regulations working with the three EBRTs, with average daily values of the outlet emissions of 20, 23, 50 and 69 mgC Nm⁻³, for 80, 65, 45 and 30 s of EBRT, respectively. For product B, similar results were observed. With product C, the regulatory limit was only reached working at an EBRT of 80 s. The daily average outlet VOC concentration values were 22, 93, 115 and 118 mgC Nm⁻³, working at 80, 65, 45 and 30 s of EBRT, respectively. For product D, the bioreactor performance was not significantly affected by the decrease in the EBRT, achieving daily average values of the outlet emissions of 13, 37 and 43 mgC Nm⁻³, for 80, 65 and 45 s of EBRT, respectively. As a conclusion, the minimum EBRT values that would allow legal regulations to be met is 30 s for all the coating products used in the tested factory, except for product C that requires a minimum EBRT of 80 s owing to its composition. Taking into account the great

similarity between results obtained for product A and D at EBRTs of 45, 60 and 80 s, it could be derived that an EBRT of 30 s could be also high enough to ensure the outlet gas concentrations below the emission legal limit are reached when emissions coming from the application of product D are treated.

The performance of the BTF pilot unit during the entire test period for both selected foci and for each product formulation used in the coating process is summarised in Fig. 6, where average daily data are presented. The variations of the RE versus the applied EBRT are shown in Fig. 6a and b for the clear coat and base coat foci, respectively. Regarding the clear coat focus, for products A and B, the RE was not significantly affected (RE values were between 85 and 95%) when the pilot unit was operated with EBRTs ranging between 45 and 80 s. However, RE slightly dropped to approximately 70% when the EBRT decreased to 30 s. Still, the lowest EBRT (30 s) was enough to maintain outlet VOC concentrations below the legal limits (75 mgC Nm⁻³), despite the observed decreased in RE. These results are comparable to those obtained by Webster et al. [10] that installed a 0.47 m³-volume BTF pilot unit to treat off-gases from two spray paint booths, achieving RE higher than 70%

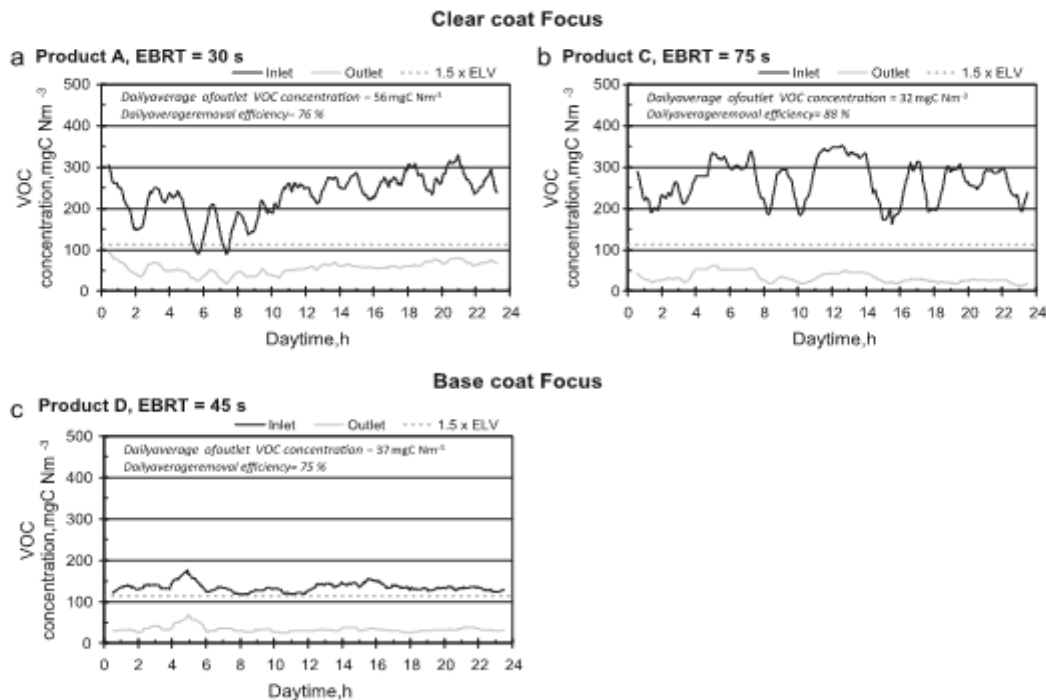


Fig. 4. Daily monitoring of the pilot unit working with the minimum EBRT that allows legal compliance for clear coat focus using product A (a) and product C (b), and for base coat focus (c). The discontinuous line represents a factor of 1.5 times the ELV.

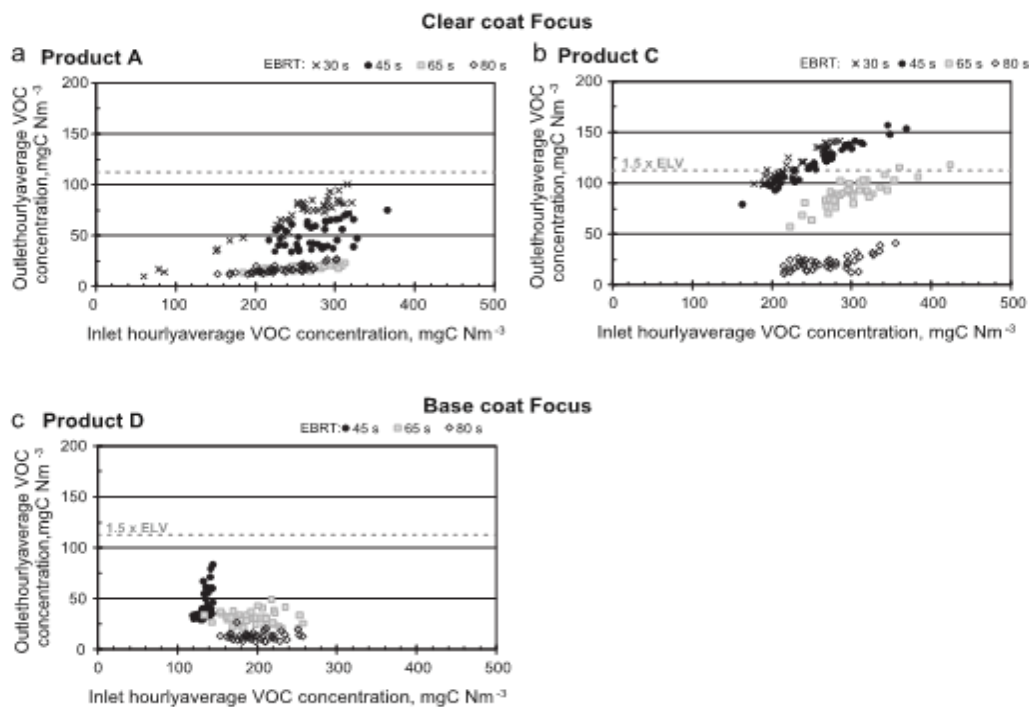


Fig. 5. Outlet vs. inlet hourly average VOC concentration at three EBRTs for clear coat focus using product A and B (a) and product C (b), and for base coat focus (c). The discontinuous line represents a factor of 1.5 times the ELV.

working at an EBRT between 11 and 39 s for methyl ethyl ketone, methyl isobutyl ketone, o-xylene, m-xylene, p-xylene and n-butyl acetate. For product C, a linear relationship existed between the applied EBRT and the obtained RE. In this case the system performed

worse compared to the results obtained for products A and B. For example, at an EBRT of 60 s, the pilot unit achieved a RE ~70% for product C and a value of 90% for products A and B, indicating that a higher content of aromatic and hydrophobic compounds was associated with worse performance of the BTF. In the base coat focus, the results show behaviour between those obtained in the clear coat focus for products A, B and C. For example, at an EBRT of 60 s the pilot unit reached a RE ~80% for product D and a value of 90% for products A and B, the slight difference could be attributed to the lower content of biodegradable compounds in product D (~60%) in comparison with the content of products A and B (>70%).

The pressure drop was low (<60 Pa m⁻¹) for the entire test period, indicating that the short-term starvation periods over weekends combined with the relatively low VOC inlet load (~25 g C m⁻³ h⁻¹) avoided clogging episodes in the reactor. The soluble COD values in the trickling solution ranged between 200 and 400 mg COD L⁻¹, corresponding to TOC analysis varying from 70 to 190 mg C L⁻¹. From mass balances, the quantity of carbon monthly purged is negligible, less than 1% of the inlet organic carbon fed to the pilot unit. The pH and conductivity values ranged between 6.5 and 7.5 and between 1.1 and 2.0 mS cm⁻¹, respectively.

3.3. Dynamics of the bacterial community using FISH

Fluorescence in situ hybridisation was applied to samples taken from the BTF pilot unit throughout the year of experimentation, covering the two studied foci and the different solvent-paint products. This is the first study in which FISH technique is applied in a real system with variable and complex emissions in the VOC removal sector. In addition, FISH analysis of the inoculum (coming from a municipal WWTP) was also carried out. Fig. 7 shows the changes in bacterial community composition with time using domain to class-specific FISH probes such as the Proteobacteria domain (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria* (high G + C Gram positive bacteria) and

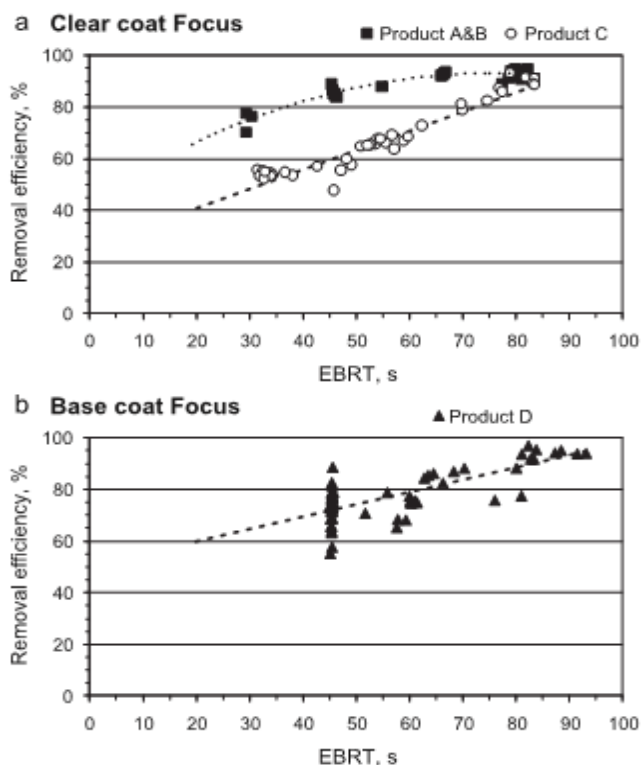


Fig. 6. Summary of pilot unit performance during the entire experimental period: clear coat focus (a) and base coat focus (b).

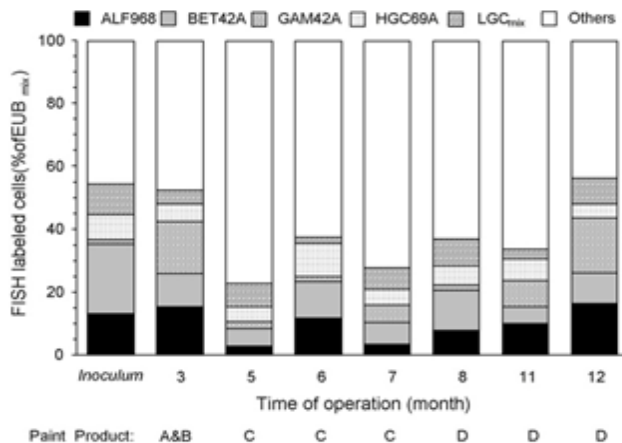


Fig. 7. Time-dependent changes in bacterial community composition using domain-specific FISH probes. All values are presented as percentage of EUB338_{mix} stained cells.

Firmicutes (low G + C Gram positive bacteria). The results have been expressed as the percentage of EUB_{mix} stained cells (hereafter defined as total bacteria). As can be observed in Fig. 7, a high bacterial diversity and heterogeneity was obtained during the entire test period, since the total percentages of the target domains varied between 23% and 56% relative to the EUB_{mix} counts with no any predominant domain. The great heterogeneity and high diversity can be explained taking into account two factors: the complex and variable emission composition and the selected inoculum (activated sludge). There are no others literature references related to microbial communities monitoring from BTF applied in the coating sector. In the odour removal field, Ho et al. [13] studied the microbial populations in a biofilter packed with granular activated carbon, reporting a high bacterial diversity with total percentage values ranged from 10% to 50% for the same target domains as those used in this study.

Although the community composition changed over time, there were some patterns, which could be considered. Changes in the bacterial community in comparison with the initial inoculum community were observed, depending on time but especially on the different VOC emission composition associated with the paint-solvent products used in each spray booth. Therefore, the change in the paint formulation did not only affect the pilot unit's performance but also affected the microbial population composition. When products A, B and D (similar chemical composition) were used, no significant differences were observed in the microbial populations. For example, members of the *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* were the most abundant groups with values of 15% and 17%, respectively, at the third month (products A&B) and values of 16% and 18%, respectively, at the twelfth month (product D). However, the microbial population composition was significantly different when product C was used. In this case, all target groups decreased their importance, for example, the highest obtained values for *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* were 11 and 6%, respectively. Finally, values for members of the *Betaproteobacteria* group were stable, with an average value of $8.9 \pm 3.0\%$. Additional FISH analysis was carried out to identify the dominant species within the *Betaproteobacteria* group. This analysis indicated that the most abundant species in the former group was associated to the *Pseudomonas* sp. genus (PS56A probe, GCTG-GCCTAGCCTTC [19]). This genus has been identified as the main bacteria related to the biodegradation of aromatic compounds in biofiltration [22].

3.4. Feasibility study

The economic feasibility of biotrickling filter technology for the control of VOC emissions from the coating sector was carried out. In this study, the treatment of the total air emissions coming from the two robotic spray paint booths was considered. The BTF was sized assuming the use of products A and B in the clear coat booth and product D in the base coat booth. The industrial-scale BTF design was based on the modular VOCUSTM technology developed by Pure Air Solutions B.V. (The Netherlands). Sizing calculations were based on a flow rate of $80\,000\text{ Nm}^3\text{ h}^{-1}$ and a VOC concentration of 220 mg C Nm^{-3} of the waste gas as a result of the mixture of both focus emissions. Under these conditions, a RE value higher than 65% is necessary to comply with legal regulations. The EBRT was selected from the experimental results of the pilot unit (Fig. 6). The estimations for the total capital investment (TCI) and the total annualised cost (TAC) are summarised in Table 3. The feasibility results are presented in terms of annual cost per volumetric air flow of the waste stream ($\text{€}/(\text{Nm}^3\text{ h}^{-1})^{-1}$). The TCI was supplied by Pure Air Solutions. The TAC includes the annual operating costs and the annualised capital investment cost, assuming that the equipment would have a 10 years amortization. The operating costs in terms of nutrients, power (25 kW), fresh water and waste management have been included. The natural gas consumption to keep the inlet air temperature above 12°C during the winter months has been considered as well.

A comparison with the annual costs of a regenerative thermal oxidiser (RTO) combined with a zeolite rotor as a pre-concentrator step is also included in Table 3. The installation of a zeolite rotor concentrator has a substantial impact on the capital cost of the system, but reduces the consumption of natural gas with a net positive impact on the viability of the thermal treatment option for highly diluted emissions of VOCs. The estimation of the TCI and operating costs were derived from the budget of the industrial facility. The RTO was designed in order to achieve an outlet VOC concentration value of 50 mg C Nm^{-3} . The operating costs include those incurred by the consumption of natural gas, electricity and zeolite reposition. It was estimated that a minimum annual of $145\,000\text{ Nm}^{-3}$ of natural gas would be necessary. The electricity power required was approximately of 220 kW, mainly due to the pressure drop caused by the zeolite bed of the rotor concentrator. The lifetime of the zeolite was established at five years.

The feasibility results show that the TCI of the biological system in treating waste gas emissions mainly composed of biodegradable

Table 3

Comparison of the estimated cost of the biotrickling filter option with the zeolite rotor plus RTO configuration.

Biotrickling filter technology	
Design parameters	
EBRT, s	34
Total bioreactor volume, m ³	750
Total bioreactor footprint, m ²	100
Number of units	10
Cost estimation, €	
Total capital investment (TCI) ^a	600 000
Total annualised cost (TAC)	130 000
TCI/(Nm ³ h ⁻¹)	7.50
TAC/(Nm ³ h ⁻¹)	1.63
Zeolite rotor + RTO	
Cost estimation, €	
TCI ^b	600 000
TAC ^b	196 000
TCI/(Nm ³ h ⁻¹)	7.50
TAC/(Nm ³ h ⁻¹)	2.45

^a Supplied by Pure Air Solutions B.V. (The Netherlands).

^b Estimated from data supplied by the industrial facility.

compounds is comparatively similar to the cost estimated for the thermal option. However, the TAC per volumetric air flow ($\text{€}1.63(\text{Nm}^3 \text{h}^{-1})^{-1}$) is significantly lower than that estimated for the RTO system ($\text{€}2.45(\text{Nm}^3 \text{h}^{-1})^{-1}$) because of the much lower operational costs for the biotrickling filter. For source emissions from the clear coat booth composed of hydrophobic compounds (product C), the authors estimated similar operating costs to those obtained for biodegradable compounds [23], however, the TCI was two-fold higher, resulting in an increase in the total annualised cost of approximately of 45%.

Biological treatment could be an attractive alternative in the near future as an air pollution control technology in the plastic coating sector. The abiotic system is an energy-intensive control technology, with the added disadvantage that it emits greenhouse gases and NO_x emissions, along with the financial risks associated with the fluctuating costs of energy. In this sense, an estimation of the production of CO_2 ($\text{kg CO}_2 \text{h}^{-1}$) has been carried out for the RTO system and BTF technology, where a biomass yield coefficient of 0.3 g C g C^{-1} was assumed. For the RTO system, CO_2 emissions values of 53 and $50 \text{ kg CO}_2 \text{h}^{-1}$ were estimated for the contribution of natural gas and VOC oxidation, respectively. For the BTF technology, a total CO_2 emission of $35 \text{ kg CO}_2 \text{h}^{-1}$ was determined, resulting in a 66% reduction in relation to the total CO_2 emissions from the RTO system. Boswell et al. [24] reported in the control of VOC emissions from a panel board press that greenhouse gas emissions can be reduced by 60–80% by replacing a conventional thermal oxidiser (RTO) with a biotreatment system.

4. Conclusions

Biological removal of VOCs from exhaust gases from two robotic spray paint booths at an industrial plastic coating facility were studied for one year. The suitability, robustness and competitiveness for BTF in VOC abatement have been shown. The emissions from the clear coat and the base coat foci were quite stable in terms of VOC concentration, but significant differences in the chemical composition related to the solvent-paint product applied in the paint booths were observed. The minimum EBRT values that allowed for meeting legal regulations depended mainly on the chemical composition of the emissions. For products A, B and D (mainly composed of biodegradable compounds) the minimum EBRT should be between 30 and 40 s, however, a minimum EBRT of 80 s is needed for product C (with a high proportion of hydrophobic compounds). Therefore, the treatment of emissions composed of slowly biodegradable compounds requires a reactor more than twice the size of a reactor treating emissions of oxygenated compounds. The results show that the total annualised cost for the BTF is low in comparison with thermal treatment technology. In addition, a reduction of 66% in relation to the total CO_2 emissions from the RTO system is estimated. From a microbiological point of view, FISH analysis indicates that the microbial population composition depends on the solvent-paint applied in the booths, members of the *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* groups were the most abundant when products A, B and D were used.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain, research projects CTM2010–15031 and TRA2009.0135) is acknowledged. F.J. Álvarez-Hornos acknowledges the Ministerio de Educación, Spain (post-doctoral contract, Programa Nacional de Movilidad de Recursos Humanos del Plan Nacional de I+D+i 2008–2011). Carlos Lafita thanks Generalitat Valenciana, Valencia (research contract CI10–100). M.C. Pérez thanks Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (FPU Grant). The authors would like to give

special thanks to Pure Air Solutions and FICOMIRROR, SA (Ficosa International Group) for their consistent collaboration and support.

References

- [1] European Commission, Guidance on VOC Substitution and Reduction for Activities Covered by the VOC Solvents Emissions Directive (Directive 1999/13/EC), Contract ENV/C.4/FRA/2007/001, 2009.
- [2] European Commission, IPPC Reference Document on Best Available Techniques in Surface Treatment Using Organic Solvents, Sevilla, 2007.
- [3] M. Koutinas, L.G. Peeva, A.G. Livingston, An attempt to compare the performance of bioscrubbers and biotrickling filters for degradation of ethyl acetate in gas streams, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1252–1260.
- [4] J. Paca, E. Klápková, M. Halecky, K. Jones, T.S. Webster, Interactions of hydrophobic and hydrophilic solvent component degradation in an air-phase biotrickling filter reactor, *Environ. Prog.* 25 (2006) 365–372.
- [5] B. Qi, W.M. Moe, K.A. Kinney, Treatment of paint spray booth off-gases in a fungal biofilter, *J. Environ. Eng. ASCE* 131 (2005) 180–189.
- [6] W.M. Moe, B. Qi, Biofilter treatment of volatile organic compound emissions from reformulated paint: complex mixtures; intermittent operation; and startup, *J. Air Waste Manage. Assoc.* 55 (2005) 950–960.
- [7] T. Higuchi, Y. Morita, R. Minato, Biofiltration of the exhaust gas contaminated by six VOC compounds for testing the feasibility of its application to a painting process, in: Proceedings of the 2010 Duke–UAM Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, Washington, October 28–29, 2010, pp. 273–278.
- [8] A.K. Mathur, C.B. Majumder, Biofiltration, kinetic aspects of a biotrickling filter for the removal of paint solvent mixture laden air stream, *J. Hazard. Mater.* 152 (2008) 1027–1036.
- [9] V. Martínez-Soria, C. Gabaldón, J.M. Peña-Roja, J. Palau, F.J. Álvarez-Hornos, F. Sempere, C. Soriano, Performance of a pilot-scale biotrickling filter in controlling the volatile organic compound emissions in a furniture manufacturing facility, *J. Air Waste Manage. Assoc.* 59 (2009) 998–1006.
- [10] T.S. Webster, A.P. Togna, W.J. Guarini, L. McKnight, Application of a biological trickling filter reactor to treat volatile organic compound emissions from a spray paint booth operation, *Met. Finish.* 97 (1999) 20–26.
- [11] U. Friedrich, M.M. Naismith, K. Altendorf, A. Lipski, Community analysis of biofilters using fluorescence in situ hybridization including a new probe for the xanthomonas branch of the class proteobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3547–3554.
- [12] U. Friedrich, H. Van Langenhove, K. Altendorf, A. Lipski, Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 183–201.
- [13] K. Ho, Y. Chung, Y. Lin, C. Tseng, Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system, *J. Hazard. Mater.* 152 (2008) 580–588.
- [14] J.P. Maestre, R. Rovira, F.J. Álvarez-Hornos, M. Fortuny, J. Lafuente, X. Gamisans, D. Gabriel, Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach, *Chemosphere* 80 (2010) 872–880.
- [15] S. Borin, M. Marzorati, L. Brusetti, M. Zilli, H. Cherif, A. Hassen, A. Converti, C. Sorlini, D. Daffonchio, Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air, *Biodegradation* 17 (2006) 79–89.
- [16] R. Lebrero, E. Rodríguez, M. Martín, P.A. García-Encina, R. Muñoz, H_2S VOC abatement robustness in biofilters and air diffusion bioreactors: a comparative study, *Water Res.* 44 (2010) 3905–3914.
- [17] S. Roy, J. Gendron, M.C. Delhomenie, L. Bibeau, M. Heitz, R. Brzezinski, Pseudomonas putida as the dominant toluene-degrading bacterial species during air decontamination by biofiltration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (2003) 366–373.
- [18] N. Khammar, L. Malhautier, V. Degrange, R. Lensi, J.J. Godon, J.L. Fanlo, Link between spatial structure in microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters, *J. Appl. Microbiol.* 98 (2005) 476–490.
- [19] A. Loy, F. Maixner, M. Wagner, M. Horn, probeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) D800–D804.
- [20] R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer, Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 143–169.
- [21] I. Jubany, J. Lafuente, J. Carrera, J.A. Baeza, Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 1140–1145.
- [22] M. Veiga, M. Fraga, L. Amor, C. Kennes, Biofilter performance and characterization of a biocatalyst degrading alkylbenzene gases, *Biodegradation* 10 (1999) 169–176, 176.
- [23] F.J. Álvarez-Hornos, V. Martínez-Soria, J.M. Peña-Roja, C. Lafita, P. Marzal, C. Gabaldón, Pilot-scale evaluation of a biotrickling filter as a VOC control technology for plastic coating facilities in the automotive sector, in: Proceedings of the 2010 Duke–UAM Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, Washington, October 28–29, 2010, pp. 7–14.
- [24] J. Boswell, Clearing the air: the use of bio-oxidation for industrial air emissions control, *Eng. Wood J. Fall* (2009) 26–28.

9. Evolution of bacterial community in a full-scale biotrickling filter by fluorescence in situ hybridization (FISH)

Este trabajo está publicado en Procedia Engineering, vol. 42, 666-671. Este artículo está disponible en acceso abierto en Sciverse ScienceDirect. Elsevier B.V. ha concedido el derecho de incluir este artículo científico en la presente tesis doctoral.



20th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012
25 – 29 August 2012, Prague, Czech Republic

Evolution of bacterial community in a full-scale biotrickling filter by fluorescence in situ hybridization (FISH)

M. C. Pérez, F. J. Álvarez-Hornos, P. San-Valero, C. Gabaldón and V. Martínez-Soria a*

Department of Chemical Engineering, University of Valencia, Av. De la Universidad s/n, Burjassot 46100, Spain.

Abstract

The performance of a full-scale biotrickling system for the treatment of exhaust gases from two different paint sources at a furniture facility, was investigated applying Fluorescence in situ hybridization (FISH). This technique allowed the detection of major bacteria groups and, therefore, helped in understanding complex microbial communities. The results indicated that *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Deltaproteobacteria* were more predominant than *Firmicutes* and *Actiniobacterias*. In addition, a variation in the composition of the bacterial community throughout the time of operation and with the paint source was observed. *Betaproteobacteria* showed similar relative abundance in all analyzed days. However, *Gammaproteobacteria*, relevant group in the degradation of VOCs, fluctuated with operational changes and the relative abundance of *Alphaproteobacteria* decreased when the composition of pollutants of the emission source was changed.

© 2012 Published by Elsevier Ltd. Selection under responsibility of the Congress Scientific Committee (Petr Kluson)

Keywords: Biotechnologies; biotrickling filter; FISH; volatile organic compounds; waste gas treatment

1. Introduction

Biotrickling filtration could be considered as a suitable and viable technology for controlling the industrial emissions of volatile organic compounds (VOCs) in waste gases. Biotrickling filters (BTFs) use

* Corresponding author. Tel.: +34 963543169; fax: +34 963544898.
E-mail address: Vicente.mtnez-soria@uv.es.

a specified inert packing material and involve a liquid phase, which trickles through the bed providing nutrients. The biofilm is developed on the packing surface. Removal efficiency in BFTs depends on multiple parameters, being the microbial community a key parameter in the performance of this process. In general, main efforts have been made to improve the feasibility and robustness of the bioprocess, however there are few studies focused on the characterization of the bacterial population in BFTs. For this purpose, molecular biological techniques are useful tools to analyze microbial community structures during the removal of contaminants in biological processes. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is currently a method used for the detection and quantification of the composition of microbial communities in natural and engineered ecosystems. FISH detects nucleic acid sequences by probes with fluorescent dyes that hybridize specifically to its complementary target sequence within the cell [1]. In fact, there are some studies in the field of biofiltration where FISH technique was used to analyze the bacterial community, for example Friedrich applied the FISH technique in a full-scale industrial biofilter resulting that members of the *Betaproteobacteria* followed by *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* were the most abundant groups and whereas the lower 50 cm of the biofilter proved to be the most active part for the degradation of aldehydes such as 2- and 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, and hexanal [2].

In this study, the evolution during more than a year of the bacterial population in an industrial BFT treating two different VOC sources at a furniture facility was analyzed by using FISH.

2. Materials and methods

The full-scale biotrickling unit was supplied by Pure Air Solutions (The Netherlands) following its innovative abatement technology (VOCUS™) and it has been described by elsewhere [3]. Two different VOC discharge sources were selected, consecutively, as representatives of the diverse paint activities carried out in the industrial facility. In the first focus (A) tested, butyl acetates and xylenes were the major compounds and acetone was the dominant compound in the second focus (B). The plant was operated for more than a year at different air flow rates corresponding to empty bed residence times (EBRT) ranging from 20 to 100 s. During the first seventh months, including start-up period, the VOC removal in the first focus was studied. Afterwards, the BTF was connected to the second source during more than four months. Then, the first source was connected again. At 13th month industrial installation was closed associated to holiday period. During these different periods several biomass samples were taken from the bioreactor to analyze the microbial community.

The FISH technique was carried out adapting the procedure described by Amann et al.[4]. The procedure includes the following steps: sampling, fixation of the biofilm, hybridization with the respective probes for detecting the respective target sequences, washing, mounting, visualization and document of results. Biofilm was collected from full-scale biotrickling unit, the samples were homogenized and disaggregated with the Ultra-Turrax (IKA® T18 basic). Then, the samples were fixed to allow the penetration of the fluorescent probes into the cell. Gram negative cells were fixed with 4% paraformaldehyde and Gram positive cells with ethanol. Hybridization consists in annealing of the probe to the target sequence, performed at 46 °C for 2 h. In this technique, was used a Cy5-labelled EUB_{mix} (general probe) and Cy3-labelled specific probes (Thermo Fisher Scientific, Germany). EUB_{mix} consists of the mix of probes EUB338, EUB338II and EUB338III. Cy5 and Cy3 are fluorescent dyes, that is, fluorochromes with different excitation and maximum emission allowing simultaneous microscopic observation. Table 1 summarizes the oligonucleotide probes used in this study and the percentage of formamide used for each probe. Slides were examined by using a Leica TCS SP confocal laser scanning

microscope (CLSM, Leica Microsystems, Germany). This microscope is equipped with two He-Ne lasers with light emission at 543 and 633 nm, respectively. Five microscopic images were acquired for the negative control and 30 images for the sample with specific and general probes. Each captured image was formed with 2 pictures, one corresponding to EUBmix and other one to specific probe. Finally, specific probes were quantified as a proportion of EUB_{mix} labelled bacteria using image analysis based on the methodology developed by Jubany et al. [5].

Table 1. List of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Specificity	Sequence (5'–3')	Formamide (%)
^a EUB338	<i>Most Bacteria</i>	GCTGCCTCCCCTAGGAGT	0 – 50
^a EUB338-II	<i>Other Bacteria not detected by EUB338</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0 – 50
^a EUB338-III	<i>Other Bacteria not detected by EUB338</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0 – 50
ALF968	<i>α-Proteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20
BET42A	<i>β1-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
-	<i>Competitor for BET42A</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
GAM42A	<i>γ-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
-	<i>Competitor for GAM42A</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
^b DELTA495a	<i>Deltaproteobacteria</i>	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	35
^b DELTA495b	<i>Deltaproteobacteria</i>	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	35
^b DELTA495c	<i>Deltaproteobacteria</i>	AATTAGCCGGTGCTTCCT	35
-	<i>Competitor for DELTA495a</i>	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	35
-	<i>Competitor for DELTA495b</i>	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	35
-	<i>Competitor for DELTA495c</i>	AATTAGCCGGTGCTTCCT	35
HGC69A	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	25
-	<i>(high G+C gram positive bacteria)</i>		
-	<i>Competitor for HGC69A</i>	TATAGTTACGGCCGCCGT	25
^c LGC354A ^b	<i>Firmicutes</i>	TGGAAGATTCCCTACTGC	35
	<i>(low G+C gram positive bacteria)</i>		
^c LGC354B ^b	<i>Firmicutes</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	35
	<i>(low G+C gram positive bacteria)</i>		
^c LGC354C ^b	<i>Firmicutes</i>	CCGAAGATTCCCTACTGC	35
	<i>(low G+C gram positive bacteria)</i>		

a EUB338, EUB338-II, EUB338-III were used in the mixture called EUBmix

b DELTA495a, DELTA495b, DELTA495c were used in the mixture called DELTA495mix

c LGC354A, LGC354B, LGC354C were used in the mixture called LGCmix

3. Results and discussion

The changes of the microbial population associated to different operational conditions were monitored by the FISH technique. In addition, FISH analysis of the inoculum (coming from a municipal WWTP) was also carried out. Figure 1 shows the relative abundance of the general groups of bacteria in the full-scale biotrickling filter; in particular, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Actinobacteria* (high G+C Gram-positive bacteria) and *Firmicutes* (Low G+C gram-positive bacteria) are expressed as percentage of EUB338mix stained cells.

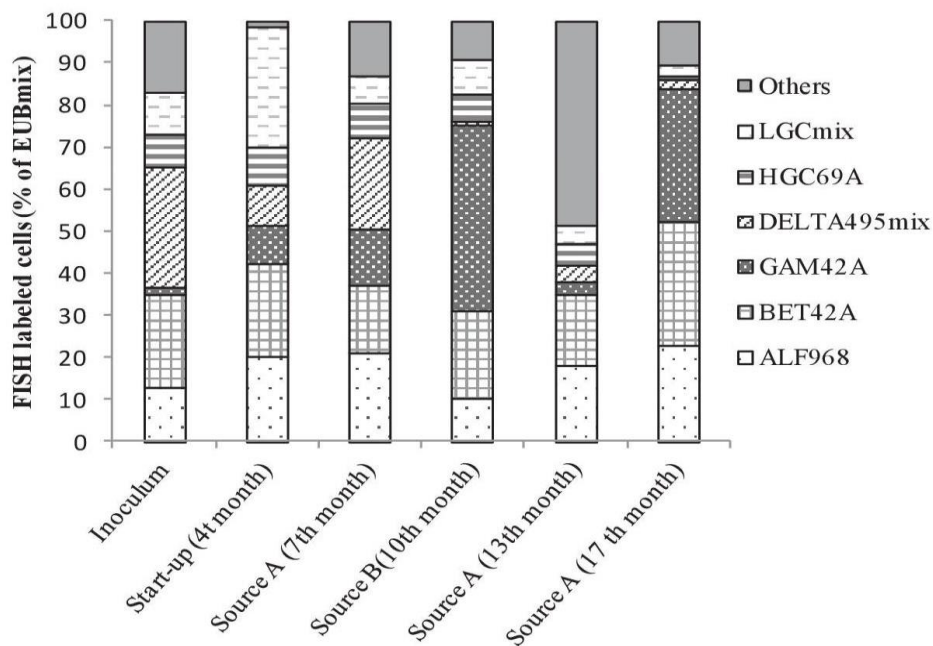


Fig. 1. Time-dependent changes in bacterial community composition using domain to class-specific FISH probes

It can be observed a variation in the composition of the bacterial community throughout the time of operation and with the source selected as well. In first place, a high relative abundance of bacteria was identified, with an average of 80%. This fact indicates that despite the complexity of the samples analyzed, the characterization of the microbial community was successful and, therefore, the selection of probes used in this study was suitable. The complexity of the samples is due to the high diversity of bacterial presenting into the biofilm caused by the complex mixture of volatile organic compounds hardly degradable in the emission source. In addition, changes in the bacterial community in comparison with the initial inoculum community were observed, depending on time but especially on the different VOC emission composition associated with the paint-solvent products used in each spray booth. Figure 1 shows as *Betaproteobacteria* is maintained at similar rates in all analyzed days with values ranging from 16% to 30%. The relative abundance of *Alphaproteobacteria* decreased when source B was connected, previous value of abundance, around 20%, was achieved when source A was selected again. *Gammaproteobacteria*, relevant group in the degradation of VOCs, fluctuate with operational changes and with composition of pollutants of the emission source. For example, at 4th month, the abundance relative of *Gammaproteobacteria* was 10%, at 10th month 44% and at 17th month 31%.

Therefore, the change in the paint formulation did not only affect the pilot unit's performance but also affected the microbial population composition. In this sense, a sudden change of the relative abundance of *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* between the 7th and 10th month associated to the variation in the emission composition was observed. *Gammaproteobacteria* varied from 13% to 45% and *Deltaproteobacteria* from 22% to 6% when the source was changed. Finally, the shift in the population at 13th month could be related to the starvation period associated to holidays closure in the industrial installation. In 17th month of operation, after the holiday period a recovery of the bacteria population was observed. Both at 10th as at 17th month, a high relative abundance of *Gammaproteobacteria* was

identified, 44% at 10th month and 31% at 17th month. These percentages can be explained by ability of species belonging to *Gammaproteobacteria* group to degrade VOCs [5]. Figure 2 shows a high relative quantity of *Gammaproteobacteria* at 10th month respecting general probe EUB338mix. In the last place, in the full-scale biotrickling filter has been more abundant Gram negatives bacteria (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*) compared to Gram positives bacteria (*Actinobacteria* and *Firmicutes*) in all days.

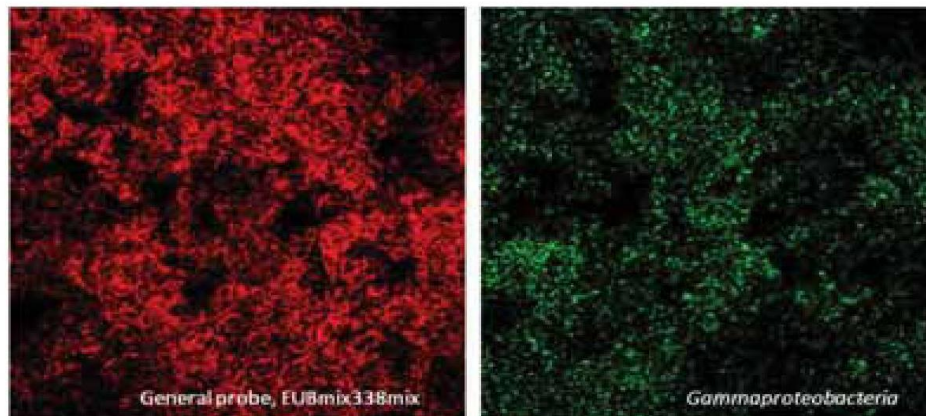


Fig. 2. *Gammaproteobacteria* at 10th month of operation. (a) General probe; (b) specific probe

4. Conclusions

In the present work, the FISH technique allowed the detection of the microbial populations existing in the full-scale biotrickling filter in the coating sector. Operational conditions were changed over the study period and therefore it reflects an evolution in the bacterial community in the process. A high abundance relative of bacteria was identified, an average of 80% and identifying reaching 98%. FISH analysis indicates that the microbial population composition depends on the solvent-paint applied in the booths, so the differences between source A and B were evident. The results obtained showed higher relative abundance of Gram negatives bacteria and relevant changes of *Gammaproteobacteria*, important microorganisms in the degradation of organic solvents.

Finally, it would be interesting to deepen into the microbiology of this process to identify the predominant bacteria species, in order to study the role which play in the VOC removal and in the robustness and effectiveness of the process.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/ under REA grant agreement n° 284949. Financial support from Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CTM2010-15031/TECNO) and Generalitat Valenciana (ACOMP/2012/209), Spain, is also acknowledged. M.C.Pérez has a FPU grant from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain.

References

- [1] Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol.Methods* 2007;**41(2)**:85-112.
- [2] Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, Lipski A. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes (vol 5, pg 183, 2003). *Environ Microbiol* 2003;**5(5)**:439.
- [3] Lafita C, Peña-Roya JM, Gabaldón C, Martínez-Soria V. Full-scale biotrickling filtration of volatile organic compounds from air emission of wooden coating activities. *J Chem Tech Biotech*, in press.
- [4] Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 2000;**12(3)**:231-236.
- [5] Jubany I, Lafuente J, Carrera J, Baeza JA. Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy. *J Chem Techn Biotech* 2009;**84(8)**:1140-1145.
- [6] Mosqueda G, Ramos-González M, Ramos JL. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* 1999;**232(1)**:69-76.

10. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis doctoral se ha centrado en el análisis de las comunidades bacterianas desarrolladas en biofiltros y biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas de compuestos orgánicos volátiles, y en el estudio de su relación con las condiciones de funcionamiento del proceso. Las principales conclusiones que pueden obtenerse del análisis de los resultados experimentales presentados en cada uno de los artículos científicos que componen la presente tesis doctoral (**capítulos del 5 al 9**) se exponen a continuación.

Escala de laboratorio

A nivel de laboratorio se realizaron tres estudios en los que se emplearon tanto biofiltros como biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas que contenían un único contaminante. Del estudio correspondiente al tratamiento de isopropanol (**capítulo 5**), contaminante típico del sector flexográfico, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que el biofiltro percolador relleno de anillos de polipropileno obtuvo eficacias de eliminación ligeramente superiores a las obtenidas en el biorreactor con el material de relleno estructurado, especialmente cuando se aplicó el menor tiempo de residencia (27 s) o la mayor carga másica volumétrica ($75 \text{ g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$).
2. Las técnicas de hibridación fluorescente in situ y de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante han permitido el análisis de la composición de las comunidades bacterianas desarrolladas en los biorreactores y su variación a lo largo de la operación.
3. A pesar de utilizar idénticas condiciones de funcionamiento, se han observado diferencias en la composición de las comunidades bacterianas de ambos biorreactores, relacionándose con la utilización de distinto material de relleno en cada uno de ellos. La diferente estructura y superficie específica que presentan ambos materiales puede afectar a procesos microscópicos tales

como la transferencia de contaminante, oxígeno y nutrientes a la biopelícula y su difusión en el seno de ésta; así como, al desarrollo y a la adhesión de la biomasa sobre el relleno, a la superficie mojada del mismo y a la distribución de la fase líquida. Por lo tanto, una variación en estos procesos puede influir en el desarrollo de las comunidades microbianas, causando un comportamiento diferente a escala macroscópica.

4. A lo largo del experimento se ha detectado una progresiva especialización de las poblaciones bacterianas. Se ha observado un incremento importante de la abundancia relativa de grupos bacterianos que incluyen especies con capacidad para degradar compuestos orgánicos y/o para mantener su actividad metabólica en ambientes con elevadas concentraciones de dichos compuestos. En este sentido, el grupo *Gammaproteobacteria* y el género *Pseudomonas* sp. que destacan por esta capacidad presentaron finalmente la mayor abundancia relativa.
5. La mayor eficacia de eliminación obtenida en el biorreactor relleno de anillos de polipropileno se ha relacionado con una mayor abundancia de especies pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. La especie *Pseudomonas putida*, perteneciente a este género, fue identificada en ambos reactores durante el periodo experimental, indicando que presenta un rol importante en el proceso de degradación del isopropanol y de otros compuestos orgánicos.

Para el estudio relativo a la eliminación de estireno (**capítulo 6**), contaminante típico de las emisiones industriales del sector del procesamiento y de la síntesis de polímeros, se presentan las siguientes conclusiones:

6. Los resultados obtenidos muestran que el biofiltro de turba presentó la mayor capacidad de eliminación máxima ($81 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una carga volumétrica de $173 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a un tiempo de residencia de 60 s), frente a las obtenidas en el biofiltro de fibra de coco ($39 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una carga volumétrica de $89 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a un tiempo de residencia de 90 s) y en el biofiltro percolador ($52 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una carga volumétrica de $116 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a un tiempo de residencia de 45

- s). Sin embargo, el biofiltro de turba y el biofiltro percolador presentaron una capacidad de eliminación similar, alrededor de $40 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, trabajando a una carga volumétrica de $75 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y a un tiempo de residencia de 60 segundos.
7. Se ha demostrado que el diseño y la planificación del programa de riego en los biofiltros juega un papel fundamental en la operación de estos sistemas. Este programa de riego debería ser ajustado en función del tiempo de residencia y de la capacidad de retención de humedad de cada material de relleno, ya que, un desajuste en este parámetro puede llegar a producir problemas de secado o de compactación, afectando de manera negativa al rendimiento del sistema.
 8. Desde el punto de vista de la utilización de estos sistemas a escala industrial, el biofiltro percolador ha presentado: (a) mayor robustez en el funcionamiento, (b) menores pérdidas de presión que implican menores costes energéticos en la impulsión del gas a tratar y (c) eficacias de eliminación elevadas trabajando a tiempos de residencia inferiores a 45 segundos, lo que conlleva la necesidad de menores requisitos de volumen. Por lo tanto, todo esto, junto a las mayores alturas permitidas en su construcción (intervalo comprendido entre 8 y 10 m), contribuye a un mayor control de la operación y a unos requisitos de superficie inferiores a los necesarios para los biofiltros, haciendo del biofiltro percolador el sistema más adecuado para el tratamiento de emisiones de estireno en los intervalos de condiciones experimentales ensayadas.
 9. El uso como inóculo de un fango activado proveniente de una estación depuradora de aguas residuales urbanas permitió un tiempo de arranque menor que el observado mediante la inoculación con un cultivo enriquecido de la cepa *Pseudomonas putida* CECT 324. Este hecho, unido a la obtención de eficacias de eliminación similares entre ambos sistemas inoculados con un tipo de inóculo diferente, pone de manifiesto que el procedimiento de inoculación mediante fango activado es la mejor opción por su mayor aplicabilidad a nivel industrial.

10. Se ha demostrado que la especie *Pseudomonas putida* se desarrolló en presencia de estireno, alcanzando abundancias significativas independientemente del tipo de inóculo y del tipo de material de relleno empleado: orgánico o plástico. Esta observación, junto con el resultado obtenido durante la eliminación de isopropanol, corrobora la importancia de esta especie en la degradación de compuestos orgánicos.
11. En el caso particular de los biofiltros, se han detectado diferencias en la composición de las comunidades bacterianas de ambos sistemas. Estas diferencias se pueden atribuir, entre otras causas, a la microflora indígena específica que estaba presente originalmente en cada uno de los dos materiales de relleno. A partir de esta microflora proliferaron especies bacterianas que no fueron detectadas en el inóculo. Esto explica que la cepa *Pseudomonas putida* CECT 324 contenida en el inóculo no fuera la especie predominante en los biofiltros a partir del tercer mes de operación.

En el último estudio realizado a escala de laboratorio para la eliminación de 2-butoxietanol (**capítulo 7**), compuesto habitual de las emisiones industriales del sector del recubrimiento de superficies, se ha demostrado que:

12. El proceso de biofiltro percolador permite un tratamiento eficaz de emisiones gaseosas contaminadas con 2-butoxietanol. Los resultados indican que el biorreactor inoculado mediante el cultivo puro de *Pseudomonas* BOE200 presentó valores de capacidad de eliminación ligeramente superiores al biorreactor inoculado con fango activado procedente de una depuradora de aguas residuales urbanas. Se han obtenido valores de $110.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $89.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ bajo condiciones de carga volumétrica de $195 \text{ g m}^3 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de residencia de 12.5 s para ambos sistemas, respectivamente.
13. Se ha corroborado que el uso de fango activado para la puesta en marcha de los biorreactores es la mejor opción, tal y como ya se había indicado en el ensayo para la eliminación de estireno. La ligera mejora en la capacidad de eliminación utilizando un cultivo puro no justifica la complejidad que a nivel

industrial supone el uso de cultivos puros frente al uso de fango activado para la inoculación del biorreactor.

14. El uso combinado de las técnicas de cultivo en placa empleando un medio de crecimiento selectivo y la secuenciación de ADN ha permitido el aislamiento y la identificación de especies bacterianas con capacidad de usar el 2-butoxietanol como fuente de carbono.
15. A lo largo del experimento se ha detectado el desarrollo de comunidades bacterianas complejas que incluyen tanto especies capaces de asimilar el 2-butoxietanol como especies que empleaban otras fuentes de carbono como pueden ser las sustancias celulares o extrapoliméricas.
16. Se vuelve a demostrar la importancia de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* en el tratamiento de corrientes gaseosas contaminadas con compuestos orgánicos. Ambas especies han mostrado capacidad para degradar 2-butoxietanol y, además, se detectó un desarrollo de ambas en el sistema inoculado con fango activado.
17. El análisis de los patrones de bandas de DGGE de las muestras obtenidas a diferentes alturas del lecho del biofiltro percolador y en la solución de recirculación mostraron una gran similitud, lo que indica que los flujos de aire y de líquido del proceso generan una distribución homogénea de especies microbianas en el biorreactor.

Escala industrial

A nivel industrial se realizaron dos estudios en los que se utilizó el proceso de biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones industriales procedentes del sector de recubrimiento de superficies caracterizadas por patrones irregulares de concentración y de composición. La instalación de una planta piloto de 0.75 m³ en una industria dedicada a la fabricación de productos automovilísticos (**capítulo 8**) ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

18. Se ha demostrado la efectividad del proceso de biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones industriales que presentaron composiciones variables de sustancias de distinta naturaleza química como n-butyl acetato, xileno, cumeno o naftaleno, entre otros.
19. El tiempo de residencia necesario para que la concentración de compuestos orgánicos volátiles en el efluente gaseoso cumpliera los límites legales exigidos para esta actividad industrial (75 mg C Nm⁻³) dependió de la composición de las emisiones gaseosas asociada al tipo de productos que eran empleados en el proceso de fabricación. Para emisiones ricas en sustancias biodegradables se necesitó un tiempo de residencia comprendido entre 30 y 40 s. Sin embargo, en el caso de composiciones con elevada proporción de sustancias aromáticas y recalcitrantes se necesitó incrementar el tiempo de residencia hasta 80 s.
20. Se desarrolló una comunidad bacteriana diversa y diferente a la identificada en el inóculo que, además, se vio afectada por la variación en la composición de las emisiones gaseosas. En este sentido, el grupo bacteriano *Gammaproteobacteria*, que anteriormente en los experimentos de laboratorio se ha destacado por contener especies con capacidad para degradar compuestos orgánicos, presentó cambios en su abundancia a lo largo del experimento. Los mayores valores de abundancia de este grupo se alcanzaron al tratar las emisiones ricas en sustancias más biodegradables, por ejemplo en presencia de n-butyl acetato.

Finalmente, del estudio que completaba la transferencia de tecnología del proceso de biofiltro percolador y que se centró en la caracterización de las comunidades microbianas del sistema instalado como solución final de depuración de las emisiones gaseosas de una empresa de fabricación de muebles (**capítulo 9**) se puede concluir que:

21. La caracterización de las poblaciones bacterianas del sistema y la selección de las sondas FISH para la identificación de la comunidad microbiana han resultado ser satisfactorias. Se cuantificó hasta el 98% de las bacterias presentes en el sistema industrial a pesar de la complejidad de las muestras y de la elevada variabilidad de las emisiones a depurar.
22. La comunidad bacteriana desarrollada en el sistema experimentó variaciones a lo largo del periodo experimental debido a cambios en la composición de las emisiones gaseosas, tal y como se observó en el estudio a escala piloto realizado en una instalación industrial del sector auxiliar de automoción.
23. Se vuelve a demostrar la importancia de las especies pertenecientes al grupo bacteriano *Gammaproteobacteria* en la degradación de disolventes orgánicos corroborando las conclusiones extraídas en los estudios a escala de laboratorio y de planta piloto.
24. Las variaciones detectadas en el funcionamiento del sistema y, a su vez, en las comunidades bacterianas desarrolladas, muestran la importancia de profundizar en la identificación de las especies involucradas para determinar el papel que desempeñan sobre la efectividad y la robustez del proceso de biofiltración. En este sentido, la aplicación de técnicas de nueva generación como la pirosecuenciación puede ser de gran utilidad.

11. GENERAL CONCLUSIONS

The present doctoral thesis has focused on analysis of the bacterial communities developed in biofilters and biotrickling filters for the treatment of gaseous emissions polluted by volatile organic compounds, and on the study of their relationship with the operational conditions of the process. The main conclusions that can be obtained from analysis of the experimental results presented in each of the scientific articles that compose the present doctoral thesis (**chapters 5 - 9**) are discussed below.

Laboratory scale

At the laboratory level, three studies were performed, in which both biofilters were used as biotrickling filters for the treatment of gaseous emissions that contained a single contaminant. From the study corresponding to the treatment of isopropanol (**chapter 5**), a typical contaminant of the flexographic sector, the following conclusions can be extracted:

1. In the biotrickling filter packed with polypropylene rings, removal efficiencies that were slightly higher than those obtained in the bioreactor with the structured packing material were observed, especially when the shorter residence time (27 s) or the greater inlet load (75 g C m⁻³ h⁻¹) was applied.
2. The techniques of fluorescence in situ hybridisation and denaturing gradient gel electrophoresis allowed analysis of the composition of the bacterial communities developed on the bioreactors and its variation throughout the operation.
3. Despite using identical operational conditions, differences in the composition of bacterial communities of both bioreactors were observed; these were related to the use of different packing materials in each bioreactor. The different structure and specific area presented by both materials can affect microscopic processes such as the transfer to and diffusion into the biofilm of pollutants, oxygen and nutrients or the biomass development and attachment, wetted area and distribution of the liquid phase. Therefore, variation in these

processes can influence the development of microbial communities, causing different behaviours at the macroscopic scale.

4. During the experiment, a gradual specialisation of the bacterial populations was detected. An important increase in the relative abundance of bacterial groups that include species with the ability to degrade organic compounds and/or maintain their metabolic activity in environments with high concentrations of these compounds has been observed. In this sense, the *Gammaproteobacteria* group and the genus *Pseudomonas* sp., which were highlighted for this capability, finally presented the highest relative abundance.
5. The higher removal efficiency obtained in the bioreactor packed with polypropylene rings has been associated with a greater abundance of species belonging to the genus *Pseudomonas* sp. The species *Pseudomonas putida*, belonging to this genus, was identified in both reactors during the experimental period, indicating that it presents an important role in the degradation process of isopropanol and other organic compounds.

For the study related to the removal of styrene (**chapter 6**), a typical pollutant of the industrial emissions from the processing and polymer synthesis sector, the following conclusions are presented:

6. The results obtained show that the peat biofilter presented the highest maximum elimination capacity ($81 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for an inlet load of $173 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an empty bed residence time of 60 s), compared with those obtained from the coconut fibre biofilter ($39 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for an inlet load of $89 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an empty bed residence time of 90 s) and in the biotrickling filter ($52 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for an inlet load of $116 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an empty bed residence time of 45 s). However, the peat biofilter and the biotrickling filter presented a similar elimination capacity, about $40 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, working at an inlet load of $75 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an empty bed residence time of 60 s.

7. It has been demonstrated that the design and planning of the irrigation programme in the biofilters play a key role in the operation of these systems. This irrigation programme should be adjusted with regard to the empty bed residence time and the water holding capacity of each packing material, since maladjustment in this parameter can lead to drying or compacting problems, negatively affecting the system performance.
8. From the point of view of the use of these systems at the industrial scale, the biotrickling filter has presented: (a) greater robustness in the performance, (b) lower pressure drops that involve lower energy costs and (c) high removal efficiencies working at empty bed residence times less than 45 s, which implies lower volume requirements. Therefore, all of these advantages and the greatest heights permitted in its construction (range between 8 and 10 m) contribute to a greater control of the operation and to lower surface requirements than those required for biofilters. This demonstrates that the biotrickling filter is the most suitable system for the treatment of styrene emissions in the intervals of the tested experimental conditions.
9. The use of activated sludge from an urban wastewater treatment plant as inoculum allowed a shorter start-up period than that observed by inoculation with an enriched culture of the strain *Pseudomonas putida* CECT 324. This fact and the similar removal efficiencies obtained in both systems inoculated with a different type of inoculum, shows that the inoculation procedure using activated sludge is the best option due to its wider applicability at the industrial level.
10. It has been demonstrated that the species *Pseudomonas putida* was developed in the presence of styrene, reaching significant relative abundances regardless of the inoculum type and the type of packing material: organic or plastic. This observation, together with the result obtained during the removal of isopropanol, corroborates the importance of this species in the degradation of organic compounds.

11. In the particular case of biofilters, differences in the composition of the bacterial communities of both systems were detected. These differences can be attributed, among other causes, to the specific indigenous microflora that was originally present in each of the two packing materials. From this microflora, bacterial species that were not detected in the inoculum proliferated. This explains that the strain *Pseudomonas putida* CECT 324 contained in the inoculum was not the predominant species in the biofilters from the third month of operation.

In the last study performed at the laboratory scale for the removal of 2-butoxyethanol (**Chapter 7**), a common compound of the industrial emissions from the surface coating sector, has demonstrated that:

12. The biotrickling filter process allows the effective treatment of gaseous emissions contaminated with 2-butoxyethanol. The results indicate that the bioreactor inoculated with the pure culture of *Pseudomonas* BOE200 presented elimination capacity values slightly higher than those in the bioreactor inoculated with activated sludge from an urban wastewater treatment plant. Values of $110.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and $89.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ were obtained for both systems, respectively, under conditions of inlet load of $195 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and an empty bed residence time of 12.5 s.

13. The use of activated sludge for the start-up of the bioreactors as the best option has been corroborated, as already indicated in the study regarding the removal of styrene. The slight improvement in the elimination capacity using a pure culture does not justify the complexity that supposes the use of pure cultures compared with the use of activated sludge for the bioreactor inoculation at the industrial scale.

14. The combined use of plating techniques with a selective growth medium and DNA sequencing has enabled the isolation and identification of bacterial species with the capability to use 2-butoxyethanol as the carbon source.

15. During the experiment, the development of complex bacterial communities that include both species with the ability to assimilate 2-butoxyethanol as a species that employed other carbon sources, such as cellular or extrapolymeric substances, was detected.
16. The importance of species belonging to the genus *Pseudomonas* sp., such as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, in the treatment of gas streams contaminated with organic compounds, has been demonstrated. Both species have shown the ability to degrade 2-butoxyethanol and, in addition, development of them in the system inoculated with activated sludge was detected.
17. The DGGE banding patterns analysis from obtained samples at different heights of the bed of the biotrickling filter and in the recirculation solution showed great similarity, indicating that the air and liquid flows of the process generate an even distribution of microbial species in the bioreactor.

Industrial scale

At the industrial level, two studies were performed in which the biotrickling filter process was used for the treatment of industrial emissions from the surface coating sector characterised by irregular patterns of concentration and composition. The installation of a pilot plant of 0.75 m³ in an industry dedicated to the automotive products manufacturing (**chapter 8**) has led to the following conclusions:

18. The biotrickling filter process is effective for the treatment of industrial emissions that presented variable compositions of substances of different chemical nature such as n-butyl acetate, xylene, cumene and naphthalene, among others.
19. The empty bed residence time needed for that the concentration of volatile organic compounds in the gaseous effluent met the legal limits for this industrial activity (75 mg C Nm⁻³), dependent on the composition of the

gaseous emissions associated with the type of products that were employed in the manufacturing process. For the treatment of emissions composed mainly of biodegradable substances, an empty bed residence time between 30 and 40 s was needed. However, for the treatment of emissions containing a high proportion of aromatic and recalcitrant substances, it was required to increase the empty bed residence time to 80 s.

20. A diverse and different bacterial community to that identified in the inoculum was developed, which affected the variation in the composition of the gaseous emissions. In this sense, the *Gammaproteobacteria* bacterial group, which has been previously highlighted in laboratory experiments using species with the ability to degrade organic compounds, presented changes in abundance throughout the experiment. The highest abundance values of this group were achieved when the emissions were composed mainly of biodegradable substances, for example in the presence of n-butyl acetate.

Finally, from the study that completed the technology transfer of biotrickling filter process which was focused on the characterisation of microbial communities of the system installed as a final solution for the treatment of gaseous emissions from a furniture facility (**chapter 9**), it can be concluded that:

21. The characterisation of bacterial populations of the system and the selection of FISH probes for identification of the microbial community gave satisfactory results. Despite the complexity of the samples and the high variability of emissions for treatment, 98% of the bacteria present in the industrial system were quantified.

22. The bacterial community developed in the system showed variations throughout the experimental period due to changes in the composition of the gaseous emissions, as observed in the study at the pilot scale, which was conducted in an industrial installation from the auxiliary automotive sector.

23. It has been demonstrated again the importance of the species belonging to the *Gammaproteobacteria* bacteria group in the degradation of organic solvents, corroborating the conclusions extracted from studies at laboratory and pilot plant scale.

24. The variations detected in the system performance and, in turn, in the bacteria communities developed, show the importance of deepening the identification of the species involved to determine the role that presents the effectiveness and robustness of the biofiltration process. In this sense, the application of next-generation sequencing technologies such as pyrosequencing can be very useful.