



UNIVERSIDAD DE ALMERIA

Facultad de ciencias experimentales

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
MEDIANTE PROCESOS BASADOS EN LA
RADIACIÓN SOLAR Y EL OZONO.
EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS
ANALÍTICAS Y MICROBIOLÓGICAS
AVANZADAS.**

Laura Ponce Robles

Tesis Doctoral

Almería, Julio 2018





UNIVERSIDAD DE ALMERIA

Facultad de ciencias experimentales

“Doctorado en química Avanzada”

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE
PROCESOS BASADOS EN LA RADIACIÓN SOLAR Y EL
OZONO. EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS ANALÍTICAS
Y MICROBIOLÓGICAS AVANZADAS**

**“WASTEWATER TREATMENT BY SOLAR IRRADIATION
AND OZONE BASED PROCESSES. EVALUATION BY
ADVANCED ANALYTICAL AND MICROBIOLOGICAL
TECHNIQUES”**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor:

LAURA PONCE ROBLES

Fdo. Laura Ponce Robles

Almería a 2 de Julio de 2018

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. D. Sixto Malato Rodríguez

Profesor de Investigación de OPI

CIEMAT

Ministerio de Ciencia, Innovación y
Universidades

Dra. Dña Isabel Oller Alberola

Investigador Contratado OPI

CIEMAT

Ministerio de Ciencia, Innovación y
Universidades



*“Empieza haciendo lo necesario, después lo posible
y de repente te encontrarás haciendo lo imposible.”*

San Francisco de Asís

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una tesis doctoral para mí supone el cumplimiento de una meta tanto a nivel personal como profesional. El camino no siempre ha sido fácil, pero es al final de este camino cuando es preciso realizar un balance de todo lo aprendido y disfrutado de esta experiencia. Por ello, me gustaría agradecer a todas las personas que de una forma u otra, han formado parte de este trabajo y me han ayudado a recorrer este camino.

En primer lugar quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Dr. Sixto Malato Rodríguez y Dra. Isabel Oller Alberola, por confiar en mí desde el primer momento, transmitirme sus conocimientos y por toda la ayuda recibida en este tiempo.

A mi tutora Dra. Ana Agüera por confiar en mí y animarme a presentar la documentación para empezar esta nueva etapa. Sin su “empujón” no hubiera sido posible. A la Dra. Inmaculada Polo por su ayuda desinteresada, consejos y motivación durante este periodo. Al Dr. Maldonado y Dr. Leónidas por sus charlas y buen trato recibido a lo largo de esta etapa.

A la Plataforma Solar de Almería (PSA)-CIEMAT y a todos sus colaboradores por la oportunidad de realizar un trabajo de calidad en tan prestigioso centro de investigación.

A tod@s mis compañeros de la PSA, porque de cada uno de ellos he aprendido conceptos y valores, además de llevarme una gran familia de amigos. A los tres pilares del laboratorio: Mi “Elisica” por su simpatía y optimismo; Isa Fernández gracias por tu amistad; y mi querido “Agustín”, más que compañero un padre para todas sus niñas, siempre con una sonrisa y dispuesto a ayudar. Eres un ejemplo a seguir.

A mis compis incondicionales: Ana, Irene, Melina y a mi querida Samira. Gracias por tantas risas y anécdotas. Chicas sois fantásticas.

A las últimas incorporaciones pero por ello no menos importantes, “Panchi”, Azahara, Dennis e Ilaria. A mis antiguos compañeros de la PSA por impartirme sus conocimientos desde el primer momento: Pilar, Stefanos, Marga, Bartolomé, Sara, Alba y por su puesto a mi querida María.

A todas las personas que han pasado por la PSA durante este periodo porque de cada uno de ellos he aprendido mucho (Jose Antonio, Matt, María, Ana, Iván, Cristina, Rita, Valeria, Mercedes, Diego, Marcelo, Giusy, Lis,...) y por supuesto a las “maricármenes” que me han brindado su amistad y su simpatía: Chus, Ángela, Leonor, Teresa, Arianna,...).

A mis “zapilleras”, porque cono nuestros ratos de quedadas, cenas y risas desde el primer momento me hicisteis sentir como en casa. Gracias Sonia, Noelia, Ana Uclés, Gracia, y en especial a mi Anita, amiga, compañera y confidente.

Por último, y casi los más importantes a mi familia, por estar ahí día tras día apoyándome, animándome, por darme una serie de valores de los que cada día estoy más orgullosa.

Y a ti Pablo, por tu apoyo incondicional y paciencia, tus viajes exprés para estar solamente unas horas conmigo. Te quiero.

El trabajo de investigación que se recoge en este documento ha sido desarrollado fundamentalmente en la Plataforma Solar de Almería (PSA), perteneciente al Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Algunas de las actividades se han desarrollado en el centro mixto CIEMAT-UAL (Centro de Investigación en Energía Solar, CIESOL) que se encuentra en el Campus de la Universidad de Almería.

El trabajo se ha realizado gracias a la financiación obtenida en forma de ayuda Pre-doctoral de Formación de Personal Investigador en el marco del proyecto nacional AQUAFOTOX (CTQ2012-38754-C03-01): “Integración de Procesos Fotoquímicos solares con otras técnicas avanzadas para el tratamiento de lixiviados de vertedero y aguas de cocido de corcho”, un proyecto coordinado con las siguientes entidades participantes: PSA-CIEMAT, Instituto de Tecnología Química (ITQ) y Escuela Politécnica Superior de Alcoy, ambos de la Universidad Politécnica de Valencia. Dentro de este proyecto, Dña. Laura Ponce Robles ha disfrutado de la ayuda Pre-doctoral BES-2013-064360 durante el periodo 2014-2017 concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Además, Dña. Laura Ponce Robles ha colaborado en otros proyectos nacionales e internacionales: “SFERA II” (Grant Agreement nº INFRA 312643 de la Comisión Europea); “Caracterización y tratamiento de aguas residuales de distinto origen (Lixiviados de vertedero y efluentes de la industria del corcho)” (ref. RNM-1739, del programa de Incentivos a Proyectos de Investigación de Excelencia, Convocatoria 2012, Junta de Andalucía); “Tecnologías eficientes para la eliminación de contaminantes de preocupación emergente, contenidos en Directiva 2013/39/CE o riesgo significativo según Directiva 2008/105/CE. (TRICERATOPS)” (referencia CTQ2015-69832-C4-1-R).

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral y presentados en esta memoria han sido publicados o están en proceso de publicación en revistas internacionales científicas con índice de impacto y que se citan a continuación:

Ponce-Robles, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., & Malato, S. (2017). Cork boiling wastewater treatment and reuse through combination of advanced oxidation technologies. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(7), 6317-6328.

Ponce-Robles, L., Rivas, G., Esteban, B., Oller, I., Malato, S., & Agüera, A. (2017). Determination of pesticides in sewage sludge from an agro-food industry using QuEChERS extraction followed by analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(26), 6181-6193.

Ponce-Robles, L., Oller, I., Agüera, A., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., Malato, S., & Perez-Estrada, L. A. (2018). Application of a multivariate analysis method for non-target screening detection of persistent transformation products during the cork boiling wastewater treatment. *Science of the total environment*, 633, 508.

Ponce-Robles, L., Polo-López, M.I., Oller, I., Garrido-Cardenas, J.A., Malato, S., (2018). Practical approach to the evaluation of industrial wastewater treatment by the application of advanced microbiological techniques. *Ecotoxicity and Environmental Safety*. *Enviado*

INDICE DE CONTENIDOS

II.2.2. Plan experimental.....	65
II.2.2.1. Determinación de una serie de plaguicidas seleccionados en fangos de una depuradora que trata aguas residuales industriales.....	66
II.2.2.2. Aplicación de un método de análisis multivariable para la detección de compuestos desconocidos utilizando HPLC-MS	66
II.3. Materiales y métodos	69
II.3.1. Reactivos	69
II.3.2. Plaguicidas modelo.....	69
II.3.3. Técnicas analíticas avanzadas	72
II.3.3.1. Pre-tratamiento de muestras: Métodos de extracción	72
II.3.3.1.1. Extracción en fase sólida (SPE) y fase sólida secuencial (SSPE)	72
II.3.3.1.2. Extracción en fase sólida dispersiva: método QuEChERS	75
II.3.3.2. Analizador de triple cuadrupolo/trampa de iones lineal (Q-TRAP)	78
II.3.3.3. Analizador triple cuadrupolo / tiempo de vuelo (Q-TOF).....	81
II.4. Resultados y discusión	85
II.4.1. Determinación de plaguicidas en fango activo utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	85
II.4.1.1. Criterios de selección del tipo de fango activo para el desarrollo de la metodología.....	85
II.4.1.2. Optimización de parámetros LC-MS/MS	86
II.4.1.3. Optimización del método de extracción QuEChERS utilizando diferentes adsorbentes como etapa de limpieza.....	87
II.4.1.4. Optimización de un método SPE para la extracción del sobrenadante de fangos activos	92
II.4.1.5. Estudio de validación (Rango lineal, efecto matriz, recuperación, límite de cuantificación, repetitividad y reproducibilidad en muestras)	92
II.4.1.5.1. Validación en la fase sólida del fango utilizando la metodología QuEChERS como sistema de extracción	93
II.4.1.5.2. Validación en el sobrenadante utilizando la tecnología SPE para la extracción de muestras	94
II.4.1.6. Aplicación a muestras reales utilizando fangos de una industria de cítricos y fangos procedentes de una EDAR.....	95

II.4.2. Aplicación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para la búsqueda de compuestos desconocidos en aguas complejas	101
II.4.2.1. Selección de una estrategia de extracción para el análisis de muestras complejas	101
II.4.2.2. Estrategia para la monitorización de compuestos desconocidos mediante LC-Q-TOF/MS. Evaluación cualitativa	102
II.4.2.3. Optimización de técnicas estadísticas “ómicas” para la búsqueda de marcadores en muestras complejas.....	104
II.5. Conclusiones.....	111
II.6. Bibliografía.....	113
 CAPÍTULO III: TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA DE COCIDO DE CORCHO	
III.1. Introducción	123
III.1.1. Tecnologías para tratamientos de aguas industriales.....	123
III.1.1.1. Tratamiento biológico para la descontaminación de aguas residuales industriales	123
III.1.1.1.1. Importancia de la población bacteriana en un tratamiento biológico	125
III.1.1.1.2. Técnicas microbiológicas para el estudio de un tratamiento biológico.....	127
III.1.2. Tratamientos para la regeneración de aguas residuales industriales procedentes del cocido de corcho	129
III.2. Objetivos y plan experimental	133
III.2.1. Objetivos	133
III.2.2. Plan experimental	134
III.3. Materiales y métodos	137
III.3.1. Reactivos	137
III.3.2. Técnicas analíticas convencionales.....	137
III.3.2.1. Medida de pH	137
III.3.2.2. Medida de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) en suspensión	138

III.3.2.3. Medidas de turbidez	139
III.3.2.4. Determinación de peróxido de hidrógeno mediante volumetría yodométrica.....	140
III.3.2.5. Determinación de hierro mediante espectrofotometría (ISO 6332)	141
III.3.2.6. Método de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total en una muestra	143
III.3.2.7. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO).....	144
III.3.2.8. Análisis de carbono orgánico disuelto (COD) y nitrógeno total (NT) ...	146
III.3.2.9. Cromatografía iónica. Determinación de aniones, cationes, ácidos carboxílicos y aminas.....	148
III.3.3. Técnicas de cuantificación microbiana.....	152
III.3.3.1. Microscopía óptica	152
III.3.3.2. Cultivo microbiano: Recuento en placa	153
III.3.4. Técnicas de biología molecular. Análisis genético	155
III.3.4.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	155
III.3.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	158
III.3.4.3. Metagenómica. Técnicas de secuenciación masiva.....	163
III.3.5. Bioensayos de toxicidad.....	166
III.3.5.1. Ensayos de respirometría. Inhibición de fangos activos procedentes de una EDAR.....	167
III.3.5.2. Bioensayo basado en la actividad bioluminiscente de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (30 minutos y 24 horas)	170
III.3.5.3. Bioensayo basado en el crustáceo de medio salino-salobre <i>Artemia franciscana</i> (24 horas)	172
III.3.5.4. Bioensayo basado en el crustáceo de agua dulce <i>Daphnia magna</i> (48 horas).....	173
III.3.5.5. Bioensayo basado en la actividad del protozoo ciliado <i>Tetrahymena termophyla</i> (24 horas)	175
III.3.6. Análisis de biodegradabilidad mediante respirometría	176
III.3.7. Pre-tratamiento físico-químico de muestras: Coagulación/floculación...177	
III.3.7.1. Coagulantes y floculantes seleccionados.....	179
III.3.7.2. Ensayos a escala de laboratorio utilizando un sistema “Jar-test”	182
III.3.7.3. Ensayos de coagulación/floculación/filtración a escala planta piloto	183
III.3.8. Reactor biológico tanque agitado a escala de laboratorio	185

III.3.9. Plantas piloto para la descontaminación de aguas mediante procesos avanzados de oxidación	186
III.3.9.1. Planta piloto para fotocátalisis homogénea (proceso foto-Fenton solar): Captador Parabólico Compuesto (CPC).....	186
III.3.9.2. Planta piloto de ozonización.....	188
III.4. Resultados y discusión	193
III.4.1. Caracterización físico-química de aguas residuales procedentes de la industria del corcho	193
III.4.2. Estudio del comportamiento de la población bacteriana de un fango activo de EDAR en contacto con ARC utilizando un bioreactor tanque agitado a escala de laboratorio.....	195
III.4.2.1. Caracterización a físico-química y microscópica del fango activo de una EDAR urbana.....	196
III.4.2.2. Evaluación de los principales parámetros físico-químicos.....	197
III.4.2.3. Evaluación microscópica del sistema biológico	199
III.4.2.4. Evaluación de los cambios en la población bacteriana mediante la técnica de recuento en placa.....	201
III.4.2.5. Determinación de la concentración ADN.....	203
III.4.2.6. Evaluación de bacterias totales ADNr (16S) y bacterias amino-oxidantes (AOB) mediante técnicas de qPCR	205
III.4.2.7. Aplicación de técnicas de secuenciación masiva.....	206
III.4.2.8. Evaluación de la toxicidad crónica durante el tratamiento biológico....	210
III.4.3. Pre-tratamiento físico-químico de aguas de cocido de corcho	213
III.4.4. Procesos avanzados de oxidación aplicados a la depuración de aguas de cocido de corcho tras una primera fase de pre-tratamiento físico-químico	216
III.4.4.1. Ozonización combinada con un pre-tratamiento de C/F utilizando ECOTAN BIO	216
III.4.4.2. Tratamiento mediante foto-Fenton solar en un fotorreactor basado en captadores tipo CPC	218
III.4.4.3. Comparación entre foto-Fenton solar y ozono para el tratamiento de aguas residuales de cocido de corcho	220

III.4.5. Comportamiento de la población bacteriana de un fango activo de EDAR urbana en contacto con aguas residuales de cocido de corcho tratadas mediante C/F + foto-Fenton solar	223
III.4.5.1. Caracterización del fango activo utilizado en el estudio de adaptación al ARC parcialmente oxidada	225
III.4.5.2. Evaluación de los principales parámetros físico-químicos del estudio de adaptación	226
III.4.5.3. Evaluación microscópica de muestras a lo largo de los experimentos de adaptación de fangos a ARC parcialmente oxidadas	229
III.4.5.4. Evaluación de los cambios en la población bacteriana mediante recuento en placa	232
III.4.5.5. Determinación de la concentración de ADN en el proceso de adaptación de un fango de EDAR urbana a ARC parcialmente oxidadas	233
III.4.5.6. Evaluación de bacterias totales ADNr 16S y bacterias amino-oxidantes (AOB) mediante técnicas de qPCR.....	234
III.4.5.7. Evaluación de la toxicidad crónica durante el tratamiento biológico de adaptación	235
III.4.6. Aplicación de técnicas analíticas avanzadas para la búsqueda de compuestos desconocidos en aguas de cocido de corcho a lo largo de la línea de tratamiento propuesta	237
III.4.6.1. Monitorización de compuestos desconocidos mediante LC-Q-TOF/MS. Evaluación cualitativa	238
III.4.6.2. Aplicación de un método de análisis multivariable para la detección de productos de transformación persistentes durante el tratamiento de aguas residuales de cocido de corcho	240
III.5. Conclusiones.....	257
III.6. Bibliografía.....	261
CONCLUSIONS SUMMARY	271
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	277
ÍNDICE DE FIGURAS	281
ÍNDICE DE TABLAS.....	289

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

En esta Tesis doctoral se ha abordado el problema de la contaminación de los recursos hídricos con compuestos tóxicos y biorecalcitrantes mediante la combinación a escala piloto de tratamientos físico-químicos (coagulación/floculación), procesos de oxidación avanzada (ozonización y foto-Fenton solar) y tratamientos biológicos (fangos activados). Como agua a estudiar se ha elegido un efluente de carácter industrial que procede del cocido del corcho natural previo a su comercialización. Para la evaluación de estos tratamientos se han utilizado herramientas analíticas convencionales y avanzadas (medidas de COD, DQO, turbidez, nitrógeno total, hierro en disolución, contenido polifenólico total, SST, SSV, cromatografía iónica, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, etc), técnicas microbiológicas (recuento en placa, microscopía óptica, extracción de ADN, qPCR o técnicas metagenómicas) así como tests microbiológicos de toxicidad y biodegradabilidad (Respirometría, BioFix®Lumi, Artoxkit, Protoxkit o Daphtoxkit). Para ello ha sido necesario aplicar protocolos y técnicas desarrolladas específicamente para este trabajo, y que pretenden sentar las bases para el desarrollo de futuras aplicaciones basadas en este tipo de estudios avanzados de tratamiento, evaluación y análisis de aguas residuales complejas.

Por un lado se han desarrollado metodologías analíticas avanzadas (de elevada sensibilidad y selectividad) que permiten realizar análisis cualitativos y cuantitativos de cara a una caracterización más detallada de aguas residuales industriales. Los estudios realizados se han centrado en la búsqueda de compuestos conocidos (target, término en inglés) y desconocidos (non-target, término en inglés) utilizando técnicas cromatográficas avanzadas acopladas a espectrometría de masas. Con este objetivo se ha desarrollado y validado un método analítico para la extracción y cuantificación de compuestos “target” (plaguicidas) en fangos de depuradora procedentes de actividades industriales mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El método desarrollado se basó en la aplicación de una estrategia de extracción QuEChERS (acrónimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe) para la fracción sólida del fango y una extracción en fase sólida (SPE) para el sobrenadante, ambas seguidas de un análisis LC-MS/MS. La estrategia se aplicó con éxito para la cuantificación de los compuestos seleccionados en fangos de una industria agroalimentaria y en fangos de una EDAR convencional.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta que, debido a la alta complejidad y naturaleza desconocida de las aguas residuales procedentes de la industria del corcho y en general de otras aguas residuales, la identificación de constituyentes orgánicos que pueden influir en la línea de tratamiento aplicada no es posible utilizando esquemas de búsqueda tradicionales que utilizan bases de datos MS. Al igual que en otros campos de conocimiento, la aplicación de técnicas analíticas avanzadas como técnicas metabolómicas puede ser una alternativa. En este trabajo se ha desarrollado un método analítico avanzado mediante la utilización de un sistema HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) para la detección de compuestos que sufren cambios significativos durante la línea de tratamiento (aparecen, desaparecen, etc.). La metodología consistió en una etapa de extracción de muestras SSPE (extracción en fase sólida secuencial) seguido de un análisis en un sistema Q-TOF. Los resultados se analizaron mediante la utilización de un software de análisis multivariable, encontrándose un número determinado y concreto de masas significativas que presentaron un comportamiento bien definido en el proceso. Por tanto este enfoque podría ayudar a la identificación de compuestos desconocidos en todo tipo de aguas residuales complejas.

Como ya se ha indicado, en este trabajo se ha desarrollado una estrategia que permita el tratamiento eficaz de aguas residuales procedentes de la industria de transformación del corcho como ejemplo de aguas que presentan elevada complejidad. El tratamiento de cocido es una práctica obligatoria para la limpieza del corcho, así como para la mejora de sus características físico-químicas. En el proceso de cocción, se producen grandes cantidades de aguas residuales conteniendo sustancias orgánicas como compuestos fenólicos o taninos. Además este tipo de aguas residuales presenta compuestos de origen natural y desconocidos que podrían ser tóxicos o recalcitrantes.

En primer lugar se propuso la adaptación de un sistema biológico aerobio para el tratamiento de aguas residuales de cocido de corcho. La variación de la flora microbiana presente en el bioreactor se evaluó mediante la utilización de microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN, qPCR y técnicas metagenómicas. También se siguieron otros parámetros como DOC, DQO, SST, SSV, contenido iónico o toxicidad crónica utilizando técnicas respirométricas.

Tras demostrar la imposibilidad de adaptación de un sistema biológico a este tipo de aguas residuales industriales debido principalmente al desarrollo de una toxicidad

crónica, se planteó tratar parcialmente las aguas residuales utilizando diferentes PAOs (foto-Fenton solar y ozono) para hacerlas biocompatibles con un tratamiento biológico posterior especialmente adaptado a este tipo de aguas.

Previo a la aplicación de estos PAOs se optimizó un pre-tratamiento basado en técnicas físico-químicas de coagulación-floculación (C/F). Los resultados globales indicaron que el tratamiento más eficaz era la utilización del coagulante FeCl_3 a 0.5 g/L seguido de un tratamiento de foto-Fenton solar, que dio mejores resultados que la ozonización.

El paso final en la línea de tratamiento propuesta consistió en la adaptación de un tratamiento biológico aerobio para aguas residuales de cocido del corcho parcialmente tratadas mediante C/F y foto-Fenton solar. La efectividad del tratamiento biológico se evaluó también mediante técnicas microbiológicas (microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN y qPCR) y toxicológicas. Los resultados globales mostraron de nuevo la imposibilidad de adaptación de un sistema biológico a este tipo concreto de aguas residuales industriales, y por tanto la necesidad de aplicar exclusivamente tecnologías de tratamiento basadas en PAOs que permitan la completa mineralización del contenido orgánico de estas aguas residuales.

En general, las diferentes metodologías desarrolladas y descritas en este documento resultan prometedoras para su aplicación en el estudio del tratamiento de aguas residuales industriales complejas y biorecalcitrantes, dando una perspectiva amplia de cómo abordar estos problemas haciendo un uso holístico y multidisciplinar de conocimientos basados en la química analítica avanzada, la microbiología y la ingeniería química.

SUMMARY

In this PhD work, the problem of water resources contamination by toxic and biorecalcitrant compounds has been studied at pilot plant scale through the combination of physical-chemical treatments (coagulation/flocculation), advanced oxidation processes (ozonation and solar photo-Fenton) and biological treatments (activated sludge). A complex industrial wastewater coming from cooking natural cork prior to its commercialization has been selected as a case study. Conventional and advanced analytical tools (DOC, COD, turbidity, total nitrogen, iron in solution, total polyphenolic content, TSS, VSS, ion chromatography, liquid chromatography coupled to mass spectrometry, etc.), microbiological techniques (plate count, optical microscopy, DNA extraction, qPCR or metagenomic techniques) as well as biodegradability and toxicity tests (Respirometry, BioFix®Lumi, Artoxkit, Protoxkit or Daphtoxkit) have been widely applied. In consequence the development of specific protocols and techniques have been faced, with the aim of being the basis for the development of future applications hinging on this type advanced studies for the treatment, evaluation and analysis of complex wastewater.

On the one hand, advanced analytical methodologies (high sensitivity and selectivity) have been developed, enabling qualitative and quantitative analysis for a detailed industrial wastewater characterization. The studies have been focused on “target” and “non-target” screening, using advanced chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. With this aim, an analytical method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for the extraction and quantification of target compounds (pesticides) in sewage sludge from industrial activities. The method is based on the application of QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) protocol for the solid phase of the sludge and a solid phase extraction (SPE) for the supernatant, both followed by an LC-MS/MS analysis. The method was successfully applied for the quantification of a group of selected compounds in sewage sludge coming from an agro-food industry and urban WWTP.

On the other hand, due to the high complexity and unknown nature of cork boiling wastewater (CBW) and other wastewaters in general, the identification of organic constituents that can influence in the applied treatment line is not possible using traditional searching MS databases. As in other fields of knowledge, the application of

advanced analytical techniques such as metabolomics can be an alternative. In this work, an advanced analytical method has been developed through the use of an HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) system for the detection of compounds showing significant changes during the treatment line (appear, disappear, etc.). The methodology consisted in a sequential solid phase extraction (SSPE) step followed by an analysis in a Q-TOF system. The results were analyzed using multivariate analysis software, finding a specific and determined number of significant masses that presented a well-defined behavior in the process. So, this approach could assist to the identification of unknown compounds in all types of complex wastewater.

As previously indicated, a strategy that allows the effective treatment of complex wastewater generated in the cork processing industry has been developed. The cooking step is an obligatory practice for cleaning the raw cork, as well as for improvement its physical-chemical characteristics. In the cooking procedure, large amounts of wastewater containing organic substances such as phenolic compounds or tannins are produced. In addition, this type of wastewater contains natural origin and unknown compounds that could be toxic or recalcitrant.

First, the adaptation of an aerobic biological system for the treatment of CBW was proposed. Microbial community variation was evaluated using optical microscopy, plate count, DNA extraction, qPCR and metagenomics. Other parameters were also followed such as DOC, COD, SST, SSV, ionic content or chronic toxicity using respirometric assays.

After demonstrating the impossibility of adapting a biological system to this type of industrial wastewater (mainly due to the development of chronic toxicity), it was proposed to partially treat the wastewater by applying different AOPs (solar photo-Fenton and ozone) in order to make them biocompatible for subsequently complete treatment in an adapted post-biological system.

Prior to the application of these AOPs, a physic-chemical pre-treatment using coagulation-flocculation (C/F) was optimized. The overall results indicated that the most effective treatment was the use of FeCl₃ at 0.5 g/L followed by a solar photo-Fenton treatment, (selected after comparison with ozonation process).

The final step in the proposed treatment line consisted in the adaptation of an aerobic biological treatment for CBW partially treated by C/F and solar photo-Fenton process. The effectiveness of the biological treatment was also evaluated by microbiological techniques (optical microscopy, plate count, DNA extraction and qPCR) and toxicological techniques. The global results showed again the impossibility of adapting a biological system to this specific type of partially oxidized industrial wastewater, and therefore, the need to apply AOPs till the complete mineralization of organic content of the CBW organic content.

In general, the development of different methodologies described in this work are promising for their application in the study of complex and biorecalcitrant industrial wastewaters, giving a broad perspective on how to approach these problems making a holistic and multidisciplinary use of knowledge based on advanced analytical chemistry, microbiology and chemical engineering.

CAPÍTULO I: CONCEPTOS GENERALES

I.1. Problemática ambiental derivada de la demanda de agua para el desarrollo humano

La demanda mundial de agua de alta calidad, ya sea para abastecimiento de la población, saneamiento, regadío o usos industriales está en continuo aumento. Debido a la escasez de recursos hídricos, niveles altos de contaminación y al cambio climático, en los últimos años se ha desarrollado una preocupación sobre el tratamiento y reutilización de aguas. En el Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de 2017, se demuestra que una mejor gestión de las aguas residuales implica no solo la reducción de contaminación en las fuentes, sino además la eliminación de contaminantes en aguas residuales, reutilización de aguas regeneradas y recuperación de subproductos útiles. Si se cumplen estas cuatro acciones, a largo plazo se generarán beneficios sociales, ambientales y económicos, contribuyendo al bienestar y la salud, la seguridad del agua y el desarrollo sostenible. Sin embargo, el uso sostenible del agua requiere un esfuerzo continuo en desarrollo tecnológico, formación, concienciación y aceptación social.

La preocupación por una mejor gestión de las aguas a nivel mundial ha alcanzado un nivel importante en los últimos años. Así, en septiembre de 2015 se produjo una reunión de jefes de Estado de todo el mundo para adoptar una serie de objetivos para el desarrollo sostenible (ODS), que establece como meta 6.3: “De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertido y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar a nivel mundial y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos”.

Según la base de datos de AQUASTAT de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), las principales actividades humanas que conllevan altos consumos de agua y a su vez producción de aguas residuales son de tres sectores principales: agricultura, doméstico e industrial. Se calcula que cada año se utilizan en el mundo unos 3928 km³ de agua dulce. Se estima que, en todo el mundo, de esos 3928 km³ de agua dulce anuales, el 44% (1716km³/año) se consume principalmente en la agricultura (38%) a través de la evaporación en cultivos irrigados. El 56% restante alcanza el medio ambiente en forma de aguas residuales municipales (8%), industriales (16%) y agua de drenaje agrícola (32%) (figura I.1).

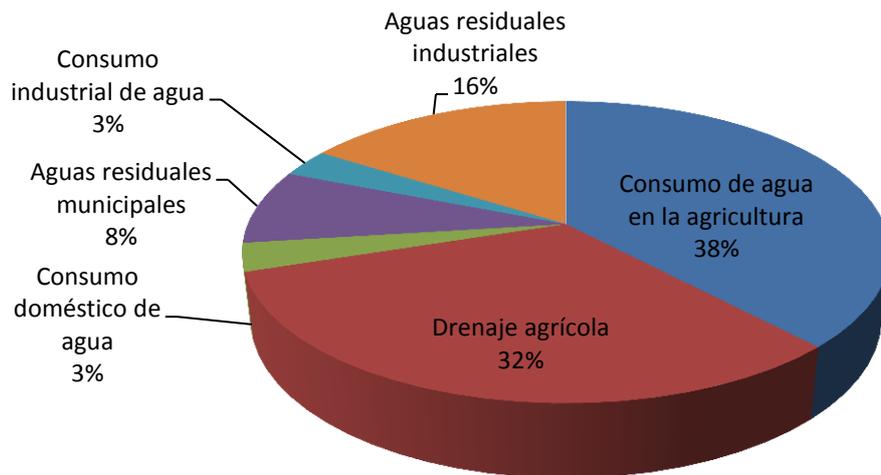


Figura I.1. Consumo de agua dulce y producción de aguas residuales a escala mundial.

Fuente: AQUASTAT; Mateo-Sagasta y col. (2015); Shiklomanov (1999).

La agricultura es el sector que consume más agua, seguido del uso industrial y finalmente del uso doméstico. Sin embargo, las aguas residuales industriales presentan valores elevados, si se comparan con el consumo industrial de agua.

La calidad de las aguas residuales depende de su origen, la forma en que se recolectan y los tratamientos que reciben. Independiente de cómo se trate el agua residual, el “producto final” se denomina efluente. Para cumplir con las leyes de protección ambiental se deben eliminar ciertas sustancias incluyendo materia orgánica, ciertos compuestos inorgánicos (fundamentalmente metales como sodio, potasio, magnesio, y metales pesados), agentes patógenos y nutrientes (principalmente compuestos de nitrógeno y fosforo). Sin embargo la convicción de que las aguas deben de ser aprovechadas (reutilizadas) cada vez es más frecuente. El reúso de aguas está condicionado al tratamiento seleccionado previamente a su vertido, que determina la calidad del efluente conseguido, destacando como destino más frecuente la reutilización en agricultura o para ciertos usos industriales.

En la actualidad, existen en España más de 2500 estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), con una depuración anual de 3375 Hm³/año. De estas aguas, aproximadamente un 13% del total se utilizan para reúso, y solamente un 3% de este valor es utilizado en aplicaciones industriales [Serrano y cols., 2007]. Debido a estas cifras tan bajas y al aumento de zonas industriales promovido por el continuo

crecimiento de la población, la reutilización en usos industriales actualmente representa un importante mercado potencial.

El tratamiento previo al reúso suele ser la descarga de aguas residuales no tratadas a una planta de tratamiento municipal. En general, esto implica altos costes para las aguas industriales y en algunos casos la planta seleccionada puede no estar diseñada para el manejo de la composición o cantidad de cierto tipo de aguas residuales. Otra opción consiste en adecuar la propia industria para el reúso del agua en el mismo proceso industrial. Este mecanismo resulta efectivo para industrias cuyos procesos no requieren aguas de elevada calidad, sin embargo, si el agua requerida fuera de alta calidad, serían necesarias instalaciones específicas y sistemas de análisis sofisticados que podrían encarecer el proceso de depuración.

I.2. Normativa para la reutilización de aguas residuales industriales

En las aguas residuales procedentes de la actividad industrial, generalmente se encuentran sustancias contaminantes que pueden provocar grandes problemas medioambientales. Entre los contaminantes más importantes se encuentran plaguicidas, metales pesados, materia orgánica persistente, sedimentos en suspensión y microorganismos patógenos [DE, U. P. M. D. E., 2008]. Estos subproductos generados durante los procesos industriales pueden ir al agua produciéndose descargas con altos niveles de contaminantes. Gran parte de estas aguas industriales residuales se vierten sin tratamiento en los cursos de agua, reduciendo la calidad de grandes volúmenes de agua, posibilitando la infiltración en acuíferos y contaminando los recursos hídricos subterráneos. Esta contaminación a menudo depende de las condiciones geográficas y el tipo de industria, por tanto, es necesaria la elaboración de estrategias de depuración que se ajusten a las condiciones locales y regionales. Para ello resulta imprescindible establecer un marco legislativo coherente y efectivo, que permita el desarrollo y aplicación de medidas para asegurar un uso sostenible del agua, minimizando los riesgos para los ecosistemas.

La Unión Europea, desde los años 70, ha llevado a cabo una expansión y reestructuración de su legislación en materia de aguas, mediante la aplicación de diferentes directivas que tratan de regular la calidad del agua con el objetivo de minimizar los problemas de contaminación ambiental. Así, en 1976 entró en vigor la

primera Directiva en materia de control de aguas (Directiva 76/160/CEE de 8 de diciembre de 1975) relativa a la calidad de aguas de baño, que fue derogada por la Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de febrero de 2006, fijando las normas para la vigilancia, evaluación y gestión de la calidad de aguas de baño y ayudando a prevenir la contaminación de dichas aguas.

En 1980 surgió la necesidad de establecer una normativa para aguas de consumo humano, apareciendo la Directiva 80/778/CE de 15 de Julio, sustituida en 1998 por la Directiva 98/83/CE, fijando la atención en parámetros microbiológicos, químicos y relacionados con la radioactividad presente en algunas aguas. Además, se establecieron normas de calidad tanto en sistemas de alcantarillado y suministro, así como en el agua a utilizar en la industria alimentaria.

En los años 90 se trataron de resolver además los problemas de contaminación provenientes de aguas residuales urbanas, del sector agrícola y de las grandes instalaciones industriales, mediante el desarrollo de la directiva de Aguas Residuales Urbanas (Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de Mayo de 1991), que fue modificada parcialmente el 27 de febrero de 1998 por la Directiva 98/15/CE. Esta directiva permitió la determinación de los tratamientos a los que debían someterse las aguas residuales antes de su vertido, teniendo en cuenta las características del área de vertido y la población. Así, los tratamientos aplicados deberían de ser más o menos rigurosos según se efectuaran en zonas calificadas en el Anexo I de esta directiva como “normales”, “sensibles”, o “menos sensibles”.

Debido al continuo crecimiento de la demanda de agua de buena calidad y en cantidades suficientes para todos los usos (no únicamente el consumo humano), surgió la necesidad de un avance en la política de aguas con el objetivo de unificar las actuaciones en materia de gestión de agua en la Unión Europea. Esta unificación se produce en el año 2000 con la introducción de la Directiva Marco del Agua (DMA, 2000/60/EC), en inglés *Water Framework Directive*, permitiendo garantizar la protección de la calidad de las aguas y promover un uso sostenible que permita la disponibilidad a largo plazo de este recurso natural. Esta directiva estableció un nuevo régimen para la prevención y control de la contaminación química de aguas superficiales continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas. Los objetivos que se contemplaron en esta directiva fueron los siguientes:

- Prevenir el deterioro y proteger el estado de los ecosistemas acuáticos.
- Promover, a largo plazo, un uso sostenible del agua basado en la protección de los recursos hídricos disponibles.
- Protección y mejora del medio acuático mediante medidas específicas de reducción de vertidos y control de emisiones.
- Garantizar la reducción progresiva de la contaminación en aguas subterráneas.
- Paliar los efectos adversos de inundaciones y sequías.

Con el desarrollo de esta norma, surgió la necesidad de establecer normas específicas para la identificación de la peligrosidad de diferentes sustancias, clasificándolas en algunos casos como peligrosas o prioritarias, y por tanto exigiendo su control ambiental. Es por ello que en 2008, de acuerdo a las disposiciones y objetivos de la Directiva 2000/60/CE se produjo una modificación (2008/105/CE), estableciendo las denominadas normas de calidad ambiental (NCA). Estas NCA incluyeron límites de concentración para un total de 33 sustancias, enumeradas en la tabla I.1 del 1 al 33.

En la actualidad, la Directiva 2013/39/UE, es la encargada de regular las sustancias prioritarias en política de aguas, modificando a la DMA (2000/60/CE) y ampliando la lista de sustancia prioritarias a 45, de las cuales 21 son identificadas como peligrosas (2013/39/UE, Anexo I). Se entiende como sustancias peligrosas las que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo. Estas sustancias incluyen plaguicidas, compuestos fenólicos y compuestos clorados entre otros, estableciendo la normativa de calidad ambiental (NCA) para dichas sustancias, y por tanto valores límites de contaminación. Esta lista de sustancias prioritarias debe de tenerse en cuenta para los planes hidrológicos actuales (periodo 2015-2021), con el objetivo de lograr el buen estado químico de las aguas superficiales. Con este objetivo, los estados miembros deberán presentar un programa de seguimiento suplementario y un programa de medidas en relación a la lista de sustancias, antes de que finalice 2018. Deberán de cumplirse las NCA para las sustancias prioritarias identificadas en la DMA y 2013/39/UE antes de que finalice 2021 y para las sustancias prioritarias identificadas recientemente antes de 2028.

Tabla I.1. Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas de la Unión Europea (2013/39/UE, Anexo I).

Nº	Nº CAS (1)	Nº UE (2)	Nombre de la sustancia prioritaria (3)	Identificada como sustancia peligrosa
1	15972-60-8	240-110-8	Alacloro	
2	120-12-7	204-371-1	Antraceno	X
3	1912-24-9	217-617-8	Atracina	
4	71-43-2	200-753-7	Benceno	
5	No aplicable	No aplicable	Difeniléteres bromados	X (4)
6	7440-43-9	231-152-8	Cadmio y sus compuestos	X
7	85535-84-8	287-476-5	Cloroalcanos, C ₁₀₋₁₃	X
8	470-90-6	207-432-0	Clorfenvinfós	
9	2921-88-2	220-864-4	Clorpirifós	
10	107-06-2	203-458-1	1,2-dicloroetano	
11	75-09-2	200-838-9	Diclorometano	
12	117-81-7	204-211-0	Ftalato de di(2-etilhexilo) (DEHP)	X
13	330-54-1	206-354-4	Diurón	
14	115-29-7	204-079-4	Endosulfán	X
15	206-44-0	205-912-4	Fluoranteno	
16	118-74-1	204-273-9	Hexaclorobenceno	X
17	87-68-3	201-765-5	Hexaclorobutadieno	X
18	608-73-1	210-168-9	Hexaclorociclohexano	X
19	34123-59-6	251-835-4	Isoproturón	
20	7439-92-1	231-100-4	Plomo y sus compuestos	
21	7439-97-6	231-106-7	Mercurio y sus compuestos	X
22	91-20-3	202-049-5	Naftaleno	
23	7440-02-0	231-111-4	Níquel y sus compuestos	
24	No aplicable	No aplicable	Nonilfenoles	X (5)
25	No aplicable	No aplicable	Octilfenoles (6)	
26	608-93-5	210-172-0	Pentaclorobenceno	X
27	87-86-5	201-778-6	Pentaclorofenol	
28	No aplicable	No aplicable	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (7)	X
29	122-34-9	204-535-2	Simazina	
30	No aplicable	No aplicable	Compuestos de tributilestaño	X (8)
31	12002-48-1	234-413-4	Triclorobencenos	
32	67-66-3	200-663-8	Triclorometano (cloroformo)	
33	1582-09-8	216-428-8	Trifluralina	X
34	115-32-2	204-082-0	Dicofol	X
35	1763-23-1	217-179-8	Ácido perfluoro-octano-sulfónico y sus	X

Nº	Nº CAS (1)	Nº UE (2)	Nombre de la sustancia prioritaria (3)	Identificada como sustancia peligrosa
			derivados (PFOS)	
36	124495-18-7	No aplicable	Quinoxifenol	X
37	No aplicable	No aplicable	Dioxinas y compuestos similares	X (9)
38	74070-46-5	277-704-1	Aclonifenol	
39	42576-02-3	255-894-7	Bifenox	
40	28159-98-0	248-872-3	Cibutrina	
41	52315-07-8	257-842-9	Cipermetrina (10)	
42	62-73-7	200-547-7	Diclorvos	
43	No aplicable	No aplicable	Hexabromociclododecanos (HBCDD)	X (11)
44	76-44-8/ 1024-57-3	200-962-3/ 213-831-0	Heptacloro y epoxido de heptacloro	X
45	886-50-0	212-950-5	Terbutrina	

(¹) CAS: Chemical Abstract Service.

(²) Número UE: Número de registro del Catálogo Europeo de Sustancias Químicas Comercializadas (EINECS) o de la Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (ELINCS).

(³) Cuando se hayan seleccionado grupos de sustancias, a menos que estén explícitamente señalados, determinados representantes típicos se definen en el contexto de la fijación de normas de calidad ambiental.

(⁴) Solo los compuestos tetra, penta, hexa y heptabromodifeniléter (números CAS 40088-47-9, 32534-81-9, 36483-60-0, 68928-80-3, respectivamente).

(⁵) Nonilfenol (CAS 25154-52-3, EU 246-672-0), con inclusión de los isómeros 4-nonilfenol (CAS 104-40-5, EU 203-199-4) y 4-nonilfenol (ramificado) (CAS 84852-15-3, EU 284-325-5).

(⁶) Octilfenol (CAS 1806-26-4, EU 217-302-5), con inclusión del isómero 4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)-fenol (CAS 140-66-9, EU 205-426-2).

(⁷) Con inclusión de benzo (a) pireno (CAS 50-32-8, EU 200-028-5), benzo(b)fluoranteno (CAS 205-99-2, EU 205-911-9), benzo(g,h,i)perileno (CAS 191-24-2, EU 205-883-8), benzo(k)fluoranteno (CAS 207-08-9, EU 205-916-6), indeno(1,2,3-cd)pireno (CAS 193-39-5, EU 205-893-2) y con exclusión del antraceno, fluoranteno y naftaleno, que figuran por separado.

(⁸) Con inclusión del catión de tributilestaño (CAS 36643-28-4).

(⁹) Se refiere a los siguientes compuestos: siete dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8- H6CDD (CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (CAS 3268-87-9), diez dibenzofuranos policlorados (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (CAS 72918- 21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (CAS 55673-89-7), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (CAS 39001-02-0), doce policlorobifenilos similares a las dioxinas (PCB-DL): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, CAS 32598-13-3), 3,3',4',5'-T4CB (PCB 81, CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5'-P5CB (PCB 114, CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 118, CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5'-P5CB (PCB 126, CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 156, CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, CAS 39635-31-9).

(¹⁰) CAS 52315-07-8 se refiere a una mezcla isómera de cipermetrina, α -cipermetrina (CAS 67375-30-8), β -cipermetrina (CAS 65731-84- 2), θ -cipermetrina (CAS 71697-59-1) y ζ -cipermetrina (52315-07-8).

(¹¹) Se refiere a las sustancias 1,3,5,7,9,11-hexabromociclododecano (CAS 25637-99-4), 1,2,5,6,9,10-hexabromociclododecano (CAS 3194-55-6), α -hexabromociclododecano (CAS 134237-50-6), β -hexabromociclododecano (CAS 134237-51-7) y γ - hexabromociclododecano (CAS 134237-52-8).».

La implantación de esta nueva directiva tiene una gran importancia para el desarrollo de tecnologías específicas para tratamientos de aguas industriales, así como en el desarrollo de técnicas y metodologías analíticas para la monitorización y detección de las sustancias prioritarias, impulsando un salto tecnológico en el desarrollo de métodos analíticos sofisticados para la correcta cuantificación de las sustancias objeto de estudio.

En España la normativa relacionada con el control de la contaminación del agua es muy amplia. Se inició en 1985 con la aprobación del reglamento de la Administración Pública del agua y de la planificación hidrológica la Ley 29/1985. Desde entonces y hasta la fecha, se han aprobado diversas leyes y Reales Decretos. La transposición de la Directiva 2000/60/CE en España se realizó mediante la Ley 62/2003, de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social que incluye, en su artículo 129, la modificación del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por la que se incorpora al derecho español la Directiva 2000/60/CE, estableciendo un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

I.3. Gestión de Vertido de aguas residuales industriales

A lo largo de los últimos años, debido a las constantes alarmas por vertidos industriales de aguas contaminadas con sustancias peligrosas en el medio ambiente, existe una demanda de un continuo esfuerzo tecnológico y de formación con el objetivo de garantizar, por una parte el uso racional del agua como materia prima, y por otra parte la reducción del deterioro de ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Este esfuerzo debe estar fundamentado en el desarrollo de una legislación que impida, o al menos regule adecuadamente, estos vertidos al medio ambiente.

Un impulso fuerte hacia el desarrollo de esta regularización tuvo lugar mediante el establecimiento del Real Decreto 1290/2012, que en su artículo Primero (que modifica el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrollaba la Ley de Aguas, 1/2001, de 20 de julio), indica en su modificación treinta y dos (apartado 2) referida al artículo 245: “Queda prohibido con carácter general el vertido directo o indirecto de aguas y productos residuales susceptibles de contaminar las aguas continentales o cualquier otro elemento del dominio público hidráulico, salvo que se cuente con la previa autorización”. Teniendo en cuenta la DMA, este Real Decreto supuso una

modificación del Reglamento del Dominio Público Hidráulico que hasta la fecha estaba establecido.

Ya en el año 2016, se estableció el Real Decreto Legislativo 1/2016 de 16 de diciembre, con el objetivo de “evitar o, cuando ello no sea posible, reducir y controlar la contaminación de la atmósfera, del agua y del suelo, mediante el establecimiento de un sistema de prevención y control integrados de la contaminación, con el fin de alcanzar una elevada protección del medio ambiente en su conjunto”. Actualmente, este nuevo decreto es aplicable a las instalaciones de titularidad pública y privada en las que se desarrolle alguna de las actividades industriales incluidas en las categorías del anejo 1.

Además de ello, para garantizar una buena gestión medioambiental en cuanto a control de vertidos industriales, es necesaria la aplicación de un sistema de gestión certificado tipo ISO 14001 o EMAS [Roberts y Robinson, 1999]. Para la correcta aplicación de este sistema se debe analizar la normativa local, regional y estatal que permita regular y limitar el vertido. En función de las características del vertido y de lo recogido en la normativa, se establecerán criterios y objetivos a cumplir por las instalaciones industriales para el correcto tratamiento de las aguas residuales.

I.4. Líneas de tratamiento generales para la regeneración de aguas residuales

En general, la preocupación por la protección y la conservación de los recursos hídricos ha llevado consigo el desarrollo de tecnologías para la regeneración y reúso de diferentes tipos de aguas residuales.

En la actualidad hay una amplia gama de tratamientos disponibles en función del tipo del agua a tratar y la calidad requerida. En general, el agua regenerada se puede utilizar para diferentes fines. La forma más común es el uso en la agricultura pero existen otros como el uso en riego de campos de golf y jardines o como agua de proceso. En general, las aguas residuales se clasifican en cuatro categorías dependiendo de su origen:

- Efluentes domésticos.
- De establecimientos comerciales e instituciones, incluyendo hospitales.
- Efluentes de origen industrial.
- Aguas pluviales y otras escorrentías urbanas.

Una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) es una planta dedicada al tratamiento de estos tipos de aguas residuales y su función básica es recoger las aguas de las categorías expuestas anteriormente, y después de reducir la contaminación mediante diferentes tratamientos o procesos, devolverla a un cauce receptor como un río, embalse, el mar, etc. El esquema de tratamiento de una EDAR convencional se divide en una línea de aguas donde se trata el agua depurada y una línea de fangos o lodos. La línea de aguas consta de un pre-tratamiento, un tratamiento primario y un secundario. Adicionalmente puede aplicarse un tratamiento terciario. La línea de fango consta de las etapas de espesamiento, estabilización o digestión y deshidratación.

Línea de aguas

Pre-tratamiento: Es un proceso físico para la eliminación de sólidos gruesos, materiales grandes (madera, piedras, plásticos, telas, basura) y demás elementos en suspensión que pueda contener el agua residual. Procesos comunes de esta etapa son el desbaste, desengrasado, desarenado, etc.

Tratamiento primario: El objetivo fundamental de esta etapa es la eliminación de sólidos flotantes, sólidos en suspensión, arenas, grasas y aceites. En esta etapa se encuentran procesos de sedimentación, flotación, coagulación-floculación o filtración.

Tratamiento secundario: Es un tratamiento biológico con el objetivo de transformar la materia orgánica del agua residual en material celular, gases, energía y agua. La base de la depuración biológica es la capacidad que poseen los microorganismos para degradar parcial o totalmente la materia orgánica. Este proceso puede llevarse de forma aerobia o anaerobia. Existen diferentes tipos de tratamientos biológicos, aunque el más importante es el proceso de fangos activos.

Tratamiento terciario: Constituye un complemento a la depuración del agua residual con el objetivo de conseguir una mejor calidad del efluente eliminando contaminantes específicos del agua tales como materia orgánica no-biodegradable o nutrientes. Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO), o tratamientos de ozono están incluidos en esta etapa.

Tras aplicar estos tratamientos en la línea de agua, se obtiene agua depurada de mayor o menor calidad dependiendo de los procesos aplicados. Por otro lado, se generan fangos

que tienen que ser tratados. Los fangos generados tras tratamientos primarios y secundarios generalmente son muy reactivos debido a la materia orgánica que contienen. Además son extremadamente líquidos (el fango primario contiene aproximadamente un 1.5% de materia seca mientras que el secundario contiene un 0.5%) [Mendoza y cols., 1998]. Si estos fangos generados no son tratados correctamente, pueden ocurrir procesos de descomposición generando malos olores.

Línea de fangos

Espesamiento o concentración: Este tratamiento tiene como objetivo eliminar parte de la fracción líquida, aumentando la proporción de sólidos y reduciendo el volumen de fango.

Estabilización o digestión: Consiste en la aplicación de procesos químicos, biológicos o térmicos con el objetivo de eliminar la materia orgánica biodegradable, reducir patógenos y eliminar olores desagradables que pueden ser provocados por la descomposición de la materia orgánica fresca.

Deshidratación: En esta etapa se aplican métodos naturales y mecánicos (secado por evaporación, filtros de vacío, centrífugas) con el objetivo de reducir el volumen de fango eliminando el agua tipo “capilar” que se encuentra entre los flóculos.

Los tratamientos primarios y secundarios tienen un coste relativamente bajo y están bien implantados en EDAR convencionales. Sin embargo, en algunos casos, los procesos biológicos convencionales de tratamientos secundarios no siempre dan resultados satisfactorios, especialmente cuando se aplican a aguas complejas industriales, por la presencia de sustancias tóxicas o resistentes a dicho tratamiento. En estos casos suele ser una solución combinar los tratamientos convencionales con los de oxidación avanzada para mejorar la eficiencia final de la depuración. Además, su aplicación como tratamientos terciarios resulta especialmente interesante cuando el objetivo es mejorar la calidad del agua tratada hasta condiciones aptas para determinadas actividades de reuso.

I.5. Procesos avanzados de oxidación (PAO)

A menudo las aguas residuales de procedencia industrial afectan seriamente al medioambiente debido a que pueden contener contaminantes con elevada toxicidad y/o baja biodegradabilidad. Estas aguas, vertidas incorrectamente a sistemas de alcantarillado, tradicionalmente han sido tratadas por métodos químicos y biológicos comúnmente encontrados en una EDAR convencional. Sin embargo, la efectividad de estos métodos es limitada cuando se trabaja con aguas complejas con alta carga orgánica. En los últimos años se han desarrollado tecnologías que tienen en cuenta el tipo de aguas a tratar, así como las posibilidades de reutilización, su beneficio sobre la rentabilidad económica industrial y fundamentalmente la eficacia de los procesos en la eliminación de estos contaminantes.

Para lograr una eficaz depuración, es necesario además de la utilización de tratamientos convencionales, el uso de tratamientos terciarios como los Procesos Avanzados de oxidación (PAO). Los PAO también pueden utilizarse antes de un tratamiento secundario, como etapa de pre-oxidación con objeto de aumentar la biodegradabilidad de un efluente en particular.

Los PAO están basados en la oxidación química de compuestos orgánicos mediante reacciones basadas en la generación de radicales hidroxilo (HO^\bullet) [Glaze y cols., 1987]. Estos radicales poseen alta efectividad con respecto a la oxidación de la materia orgánica y pueden ser generados por diferentes procesos, incluyendo los fotoquímicos (que pueden emplear luz solar). Las principales características de estos radicales son su carácter no selectivo y su elevado potencial de oxidación ($E_0=2.8$ V con respecto al electrodo normal de hidrógeno), por tanto son capaces de oxidar prácticamente la totalidad de los compuestos orgánicos. En la tabla I.2 se puede observar el potencial de oxidación del radical hidroxilo y de otras especies oxidantes.

Tabla I.2. Potenciales de oxidación de algunos agentes oxidantes.

Especie	E^0 (V, 25°C)	Especie	E^0 (V, 25°C)
Flúor	3.03	Permanganato	1.68
Radical hidroxilo	2.80	Dióxido de cloro	1.57
Oxígeno atómico	2.42	Ácido hipocloroso	1.49
Ozono	2.07	Cloro	1.36
Peróxido de hidrógeno	1.78	Bromo	1.09
Radical perhidroxilo	1.70	Yodo	0.54

Generalmente, un PAO consiste en dos etapas, una de formación de radicales hidroxilo y otra de la reacción de estos radicales con los compuestos orgánicos presentes en la muestra acuosa. Este proceso presenta una serie de ventajas con respecto a otros tratamientos convencionales:

- Alta velocidad de reacción (entre 10^7 y 10^{10} m/s) [Arslan-Alaton y cols., 2013].
- Es una técnica potente para eliminar altas cargas de carbono orgánico, actuando en matrices complejas gracias a su carácter no-selectivo, pudiendo alcanzar la mineralización total de los contaminantes orgánicos.
- Son efectivos también para tratar contaminantes a muy baja concentración ($\mu\text{g/L}$).
- Son muy útiles para eliminar contaminantes muy persistentes que resisten a otros métodos de tratamiento.

La aplicación a gran escala de PAO para tratamiento de aguas residuales está limitada por el elevado coste de operación, alto consumo energético y empleo de reactivos de alto coste (H_2O_2 , O_3 , etc.). Sin embargo, aunque los costes sean elevados, la utilización de estos tratamientos está justificada para tratar aguas industriales complejas en las que los tratamientos convencionales no presentan resultados satisfactorios. Así, además de la utilización como tratamiento terciario, un PAO se podría utilizar como etapa de pre-tratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las aguas contaminadas, permitiendo la generación de intermedios más biodegradables que el contaminante original, que se someterían a un tratamiento biológico convencional posterior para llevar a cabo una correcta descontaminación del agua a tratar, reduciendo así los correspondientes costes de operación.

Los PAO conocidos en la actualidad son diversos y su desarrollo y comercialización dependen de los avances científicos y tecnológicos. Generalmente los PAO se clasifican en homogéneos y heterogéneos [Poyatos y cols., 2010]. Los PAO más comunes utilizan combinaciones de ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación ultravioleta (UV) y catalizadores (figura I.2). En el caso particular de este trabajo se han estudiado dos PAO: foto-Fenton solar y ozonización.

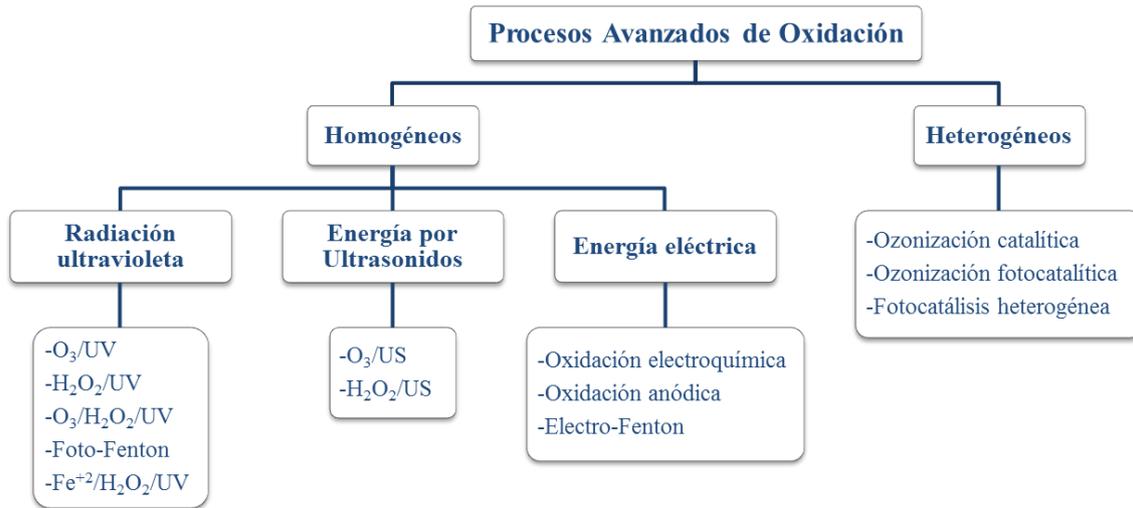
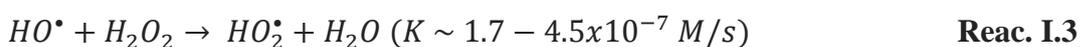
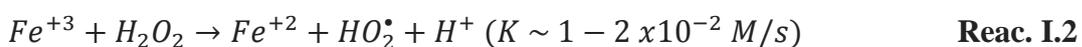
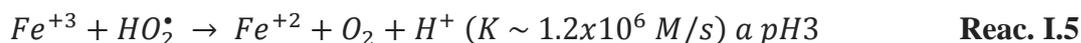
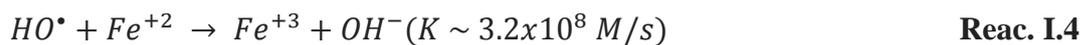


Figura I.2. Clasificación general de los procesos avanzados de oxidación.

I.5.1. Fotocatálisis solar homogénea: foto-Fenton solar

El proceso Fenton fue descubierto por Henry J. Fenton, demostrando en 1894 que el H_2O_2 podía ser activado por sales de Fe^{+2} para oxidar ácido tartárico [Fenton, 1894]. Más tarde, Haber y Weiss (1934), propusieron que el oxidante activo generado mediante la reacción Fenton era el radical hidroxilo (HO^\bullet) [Haber y cols., 1934]. Posteriormente, Barb y cols., revisaron el mecanismo original propuesto por Haber y Weiss para dar lugar a lo que actualmente se conoce como reacción en cadena “clásica” o “vía radicales libres” de Fenton, en la que se considera la producción de radicales hidroxilo como etapa clave del proceso [Barb y cols., 1949; 1951a; 1951b]. A mediados de los años 60 comenzó a desarrollarse la aplicación de la reacción de Fenton como proceso oxidante para la destrucción de sustancias tóxicas orgánicas [Brown y cols., 1964]. El mecanismo de reacción propuesto por Barb y cols., para la descomposición del H_2O_2 en medio ácido, en oscuridad y en ausencia de compuestos orgánicos se detalla en las reacciones I.1 a I.7, las cuales muestran las reacciones Fenton que se suelen activar por temperatura [Rigg y cols., 1954; Pignatello y cols., 2006].

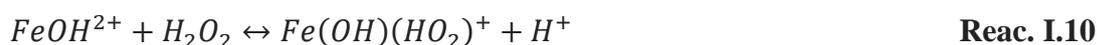




En ausencia de otras especies o sustancia oxidables, se produce la conversión catalizada por el hierro del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua mediante la reacción I.8. Esta reacción puede darse incluso cuando está presente en la mezcla de reacción un contaminante orgánico, constituyendo un consumo importante de oxidante.

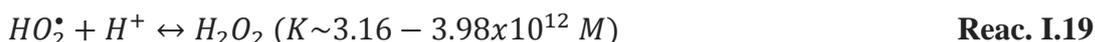
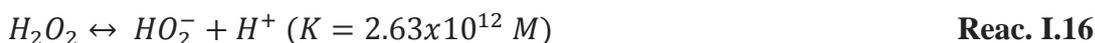
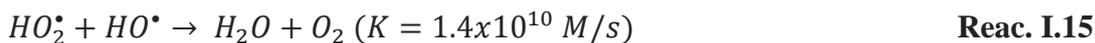


En el mecanismo de Fenton, los radicales hidroxilo, responsables de la oxidación de los compuestos orgánicos, se generan estequiométricamente en la reacción I.1 y se consumen en las reacciones I.3 y I.4. Además, la regeneración de los iones ferrosos a partir de iones férricos (reacciones I.2 y I.5) es la etapa limitante del ciclo catalítico cuando el hierro se encuentra presente a concentraciones bajas. La reacción 1.2 se inicia mediante la formación de complejos de H_2O_2 con los iones férricos que se disocian para dar lugar a iones ferrosos (reacciones I.9-I.12).



Algunas reacciones radicalarias tipo radical-radical (reacciones I.13-I.15) y de equilibrio (reacciones I.16-I.19) también juegan un papel importante en el mecanismo de Fenton:





Las reacciones de Fenton se ven claramente aceleradas en presencia de luz, debido a la regeneración catalítica de los iones ferrosos. A este proceso se le conoce como foto-Fenton. Una ventaja del uso de la radiación solar es que ciertos complejos que intervienen en las reacciones de Fenton previamente descritas (ferri-hidroxi o ferri-carboxílicos) absorben luz UV y parte de la luz visible del espectro solar, aumentando la generación de radicales hidroxilo y por tanto la eficiencia de la reacción. [Pignatello, 1992; Benitez y cols., 2000; Oppenländer, 2003]. En el proceso de foto-Fenton los complejos de Fe^{+3} sufren una transferencia de carga ligando-metal, dando lugar a su disociación en Fe^{+2} y el ligando oxidado (reacción I.20) [Pignatelo y cols., 2006] (reacción I.20).



Los ligandos pueden ser cualquier base de Lewis capaz de formar complejos con los iones férricos tales como OH^- , H_2O , HO_2^- , Cl^- , $R-COO^-$, $R-OH$, $R-NH_2$, etc. Dependiendo del ligando, los complejos férricos presentan diferentes propiedades de absorción de luz, por lo que los rendimientos cuánticos de la reacción 1.20 son variables y presentan absorción a diferentes longitudes de onda. En este contexto, el pH del medio juega un papel fundamental, determinando los complejos férricos que se forman. De forma general, el pH óptimo para el proceso de foto-Fenton es 2.8, ya que en estas condiciones se evita la precipitación de hidróxidos y la especie de hierro mayoritaria es $[Fe(OH)]^{2+}$, complejo ferri-acuoso que presenta una alta fotoactividad.

Hay que destacar que diversos iones (fosfato, sulfato, organosulfonato, fluoruro, bromuro y cloruro) inhiben la oxidación de compuestos orgánicos mediante el proceso de Fenton o foto-Fenton. La inhibición provocada por estos iones suele deberse a la precipitación del hierro (por ejemplo el Fe^{+3} forma complejos insolubles con el ión

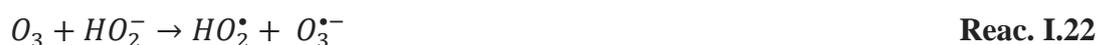
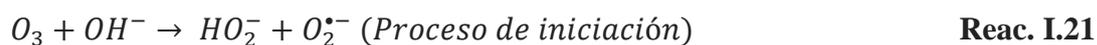
fosfato en medio ácido o neutro) o a la formación de complejos de coordinación con Fe^{+3} que presentan una menor reactividad. La inhibición del proceso por la presencia de iones cloruro (aguas salinas o concentraciones superiores a 0.01 M a pH 2.8 [Pignatello, 1992]) o bromuro, se debe a que estos iones son capaces de reaccionar con los radicales hidroxilo, actuando como ligandos débiles para el Fe^{+2} [Pignatello y cols., 2006]. La presencia de carbonatos y bicarbonatos además determina una ralentización del proceso porque reaccionan con los radicales hidroxilos.

I.5.2. Ozonización

La ozonización es una técnica de oxidación química que presenta una gran variedad de aplicaciones: presenta una alta efectividad para la eliminación de color y olor, materia orgánica, contaminantes y tiene una alta capacidad de desinfección.

El ozono, forma alotrópica del oxígeno, es un oxidante muy energético ($E_0 = 2.07$ V con respecto al electrodo normal de hidrógeno a 25°C). Sin embargo, en medio acuoso se descompone rápidamente volviendo a originar oxígeno diatómico, por tanto, es muy inestable y se suele generar “in situ”.

El tratamiento con ozono (O_3) se ve muy afectado por el pH, convirtiéndose en un PAO cuando se trabaja en medio alcalino, provocando la generación de una serie de radicales entre las que se encuentra el radical hidroxilo [Hollender y cols., 2009]. A medida que el pH aumenta, la velocidad de descomposición de ozono también, y por tanto la velocidad de generación de radicales hidroxilo. Los radicales libres formados de la descomposición del ozono podrían ser capaces de degradar a los compuestos orgánicos y la efectividad depende de la composición del agua y de la dosis de ozono [Rosal y cols., 2010; Sotelo y cols., 1989]. Las reacciones que se producen se muestran a continuación:





La degradación de contaminantes (oxidación de los compuestos orgánicos presentes en las muestras) puede ocurrir por dos vías: la directa y la indirecta.

- **Reacción directa:** La vía directa representa la reacción entre la molécula orgánica y el ozono disuelto. La degradación de los compuestos orgánicos ocurre generalmente a través de los grupos insaturados (anillos aromáticos, alquenos, etc.) [Am Water Works Res y cols., 1991] y en compuestos alifáticos con grupos funcionales específicos como aminas y sulfuros [Von Gunten, 2003]. Por tanto es un mecanismo selectivo que se realiza preferiblemente con compuestos aromáticos, dobles enlaces o aminas.
- **Reacción indirecta:** En esta vía, los radicales hidroxilos actúan como oxidantes y se ve beneficiada por la elevada velocidad de reacción entre moléculas orgánicas y radicales hidroxilo, (aproximadamente entre 10^6 - 10^9 veces mayor que la reacción directa). [Langlais y cols., 1991].

La generación de radicales hidroxilo puede ser aumentada con la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ampliando la concentración de los mismos en el agua, por tanto aumenta la efectividad y la rapidez de la reacción [Peyton y cols., 1988]. Los inconvenientes principales derivados de la utilización de ozono para el tratamiento de aguas residuales industriales derivan del elevado coste eléctrico para generar ozono in situ y de la posible formación de sub-productos [Nelieu y Einhom., 1996] que pueden presentar elevada toxicidad.

I.6. Industria productora de corcho y sus aguas residuales industriales

El trabajo realizado en esta tesis doctoral tiene como objetivo abundar con detalle en el tratamiento de aguas residuales complejas de procedencia industrial. Para ello se utilizó como modelo un agua residual de la industria corchera ya que se trata de un ejemplo representativo de aguas residuales complejas procedentes de industrias relacionadas con productos naturales y no susceptible de ser tratada de forma eficaz mediante los procesos convencionales disponibles en el mercado.

El proceso industrial de transformación del corcho incluye una etapa muy importante: el cocido de corcho. Este tratamiento es una práctica industrial obligatoria para mejorar las características físico-químicas del material. El proceso de cocido permite limpiar el corcho, extrayendo sustancias hidrosolubles como sales minerales, compuestos de largas cadenas de carbono, taninos y azúcares, así como algunos compuestos volátiles. La aportación de estos compuestos al agua de cocido da origen a aguas residuales complejas de tratamiento eficiente desconocido.

I.6.1. Generalidades

El corcho es un producto natural que se obtiene de la corteza del alcornoque (*Quercus Suber*). El alcornoque es un árbol que se encuentra esencialmente en la costa occidental mediterránea y algunas zonas del atlántico, cubriendo áreas considerables en la península Ibérica (España y Portugal) y en los países del norte de África (Marruecos, Argelia y Túnez), así como en algunas zonas de Francia e Italia, formando poblaciones denominadas dehesas. Utilizando los datos referentes a la década de los 90 se pueden establecer las siguientes cifras: 713000 ha en Portugal, 475000 ha en España, 68000 ha en Francia, 65000 ha en Italia, 348000 ha en Marruecos y 90000 ha en Túnez [Pereira y cols., 2011].

Los alcornoques poseen una capa protectora en su corteza que forma una envoltura continua con un espesor apreciable alrededor del tallo y ramas. Esta capa establece una barrera protectora entre los tejidos vivos y fisiológicamente activos del tallo del árbol y el medio ambiente. El alcornoque presenta una característica única que le diferencia del resto de especies forestales: su aptitud para regenerar la corteza cuando esta ha sido retirada parcialmente en determinadas condiciones. Por tanto, el corcho se puede sacar del tallo sin poner en peligro la vitalidad del árbol, ya que éste posteriormente es capaz

de reconstruir una nueva capa de corcho. Esta característica abre la posibilidad de utilizar el alcornoque como un producto sostenible y es la base para el uso industrial del corcho como materia prima.

Las propiedades del corcho están relacionadas con su composición química y la estructura macromolecular de sus componentes. A nivel macroscópico, el corcho se caracteriza por la presencia de anillos concéntricos (crecimiento radial) y presencia de lenticelas (poros) que atraviesan el cuerpo de corcho.

Los primeros estudios acerca de la composición química del corcho fueron realizados por Brugnatelli en 1787. Más tarde, Chevreul publicó dos monografías (1807 y 1814) nombrando como componente principal del corcho la suberina. Hoy en día, la química del corcho está aún bajo investigación debido a la falta de información acerca de la estructura polimérica de los componentes, su disposición tridimensional y su biosíntesis [Pereira y cols., 2011]. La falta de procedimientos analíticos estándar e incertidumbres en la definición de las macromoléculas que forman el corcho, hace que la composición química varíe según diferentes autores. Klauber (1920) indicó que el corcho estaba compuesto (en porcentaje de masa seca) por un 58% de suberina, 12% de lignina, 22% de celulosa, 2% de cerina, 5% de agua y un 1% de otros componentes. Resultados posteriores de otros autores indican contenidos variables de suberina de un 33% a un 50% [Guillemonat, 1960; Hata y cols., 1969; Holloway, 1972; Pereira y cols., 1982; Parameswaran y cols, 1981]. Pereira y cols., en 1988 propusieron una composición química formada por un 38.6% de suberina, 21.7% de lignina, 18.2% de polisacáridos, 15.3% de componentes extraíbles (ceras, taninos, polifenoles, etc) y un 0.7% de ceniza.

A pesar de que la composición del corcho presenta cierta variabilidad, tiene muchas características útiles de cara a su uso industrial:

- **Ligereza:** Se debe a que el 80-90% de su volumen es aire (predominantemente nitrógeno).
- **Elasticidad:** Gran capacidad para recuperar el volumen inicial tras una deformación.
- **Compresibilidad:** al reducir el volumen de corcho en una dirección no se produce deformación en la dirección perpendicular.

- Alta impermeabilidad: La difusión de líquidos y gases a través del corcho es muy dificultosa y extremadamente lenta o casi nula.
- Escasa conductividad térmica.
- Excelente aislamiento acústico y de vibraciones: Permite suprimir simultáneamente los sonidos del aire, el impacto y eliminar los puentes de sonido absorbiendo las ondas de sonido y vibraciones.
- Resistente a agentes químicos: Es químicamente inerte, no entrando en reacciones químicas con líquidos o gases en contacto.
- Coeficiente de rozamiento elevado: La superficie del corcho queda tapizada por micro ventosas que permiten gran adherencia y dificultan su deslizamiento
- Muy resistente a la corrosión biológica: La presencia de taninos y ausencia de proteínas hace que se desarrolle una resistencia a hongos y moho.
- Inodoro: No presenta olor característico.

Debido a estas propiedades, el corcho se ha utilizado desde la antigüedad. Existen hallazgos arqueológicos y pruebas escritas que muestran el uso como dispositivo flotante y aislante alrededor del año 3000 a.C. en China, Egipto y en algunos países de Asia. Además, también existen restos arqueológicos en el área mediterránea que afirman el uso del corcho en placas de corcho grabadas, suelas de sandalias, cierres de frascos o en ánforas. En la Edad Media, en zonas corcheras de África y Europa se utilizaron tablones de corcho como aislante en techos y paredes, e incluso para artículos para el hogar o féretros. El empleo del corcho para tapar botellas de vino es relativamente reciente. Se atribuye al monje benedictino Dom Perignon en el siglo XVII (año 1680), y lo empleó como una forma de conservación de botellas de champagne, abriendo así una vía importante de uso de corcho a escala industrial. La producción de tapones para embotellado de vino comenzó en Francia extendiéndose a Cataluña en la segunda mitad del siglo XVIII y más tarde a Portugal. Debido a la gran producción de tapones en el siglo XIX, las industrias de corcho se centralizaron en zonas cercanas a las materias primas, aumentando por tanto su dimensión en Portugal, (principal productor de corcho del mundo hasta la fecha) y en España en zonas de Extremadura.

A lo largo de la historia el corcho ha competido con otros materiales sintéticos, sin embargo, la mayoría de los usos han permanecido a lo largo de la historia, siendo hoy en día el objetivo principal de la industria corchera la producción de tapones de corcho natural para vinos y otras bebidas. Su fabricación supone el 85% del volumen de negocio del sector corchero en España y en el mundo [<http://www.barnacork.com/el-corcho/ique-es-el-corcho.html>].

Aunque la producción de tapones es la aplicación más utilizada, existe además una gran variedad de productos derivados del corcho que se utilizan en la actualidad: Láminas de corcho natural o aglomerados para construcción o aplicaciones aeroespaciales, suelas y plantillas para calzado, artículos de pesca, objetos de decoración, juntas para automoción, industria química y farmacéutica, soportes, moda y complementos, etc.

I.6.2. Producción de corcho

En la actualidad, según ASECOR (Agrupación Sanvicenteña de Empresarios del Corcho), un 23% de la producción mundial de corcho (aproximadamente 375 mil toneladas al año) tiene su origen en España (78 mil toneladas). De estas, casi un 24% procede de los alcornoques de Extremadura, siendo una actividad industrial de elevada importancia en esta zona geográfica (figura I.3).

La producción de corcho es un proceso industrial que soporta una cadena integrada que va desde la extracción del corcho del alcornoque (saca del corcho) hasta el consumidor con un impacto importante a nivel económico, social y ambiental en las regiones donde se realiza la producción y transformación de la materia prima.

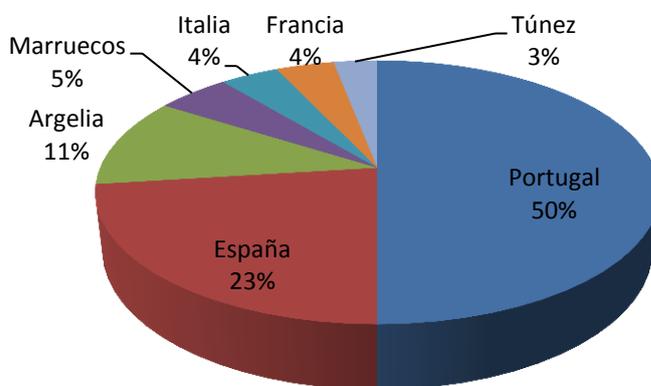


Figura I.3. Producción de corcho en el mundo.

La “saca del corcho” es un proceso que se realiza de forma manual sobre todo en el mes de julio (mes donde el corcho puede ser separado del árbol sin dañarlo), aunque las fechas pueden oscilar desde el 1 de junio hasta el 1 de septiembre según la ley sobre la Dehesa (Ley 1/1986 de 2 de mayo, modificada por la Ley 8/2002 de 14 de noviembre de Reforma Fiscal de la Comunidad Autónoma de Extremadura). De esta forma el árbol tiene tiempo de crear una nueva capa delgada de corcho, suficiente para su protección en los meses de invierno. El corcho se puede extraer por primera vez cuando el árbol tiene aproximada 25 años, aunque esto depende de las condiciones climáticas durante su etapa de crecimiento. A este primer corcho se le denomina bornizo, y es válido para la elaboración de elementos decorativos y aislantes, debido a la dificultad de separar el corcho de la fina corteza leñosa externa de color grisáceo, por lo que no se puede utilizar para aglomerados de uso alimentario. Dependiendo de la calidad de la estación, tras la primera saca se puede sacar corcho cada 9 años. El corcho no es válido para tapones hasta el tercer descorche, donde el árbol tendría alrededor de unos 40 años. En general, la vida media de un alcornoque ronda los 150-200 años, por lo que se podrían hacer unas 16 sacas destinadas a la elaboración de tapones para su uso principalmente en el taponado de vinos y licores.

Para un correcto tratamiento del corcho, existen empresas dedicadas a la preparación del mismo (preparación de corcho en planchas), mientras que otras empresas se dedican a la transformación (elaboración de tapones o productos para el mercado). Por tanto, una vez realizada la saca, el siguiente paso es el envío del material a la industria de preparación del corcho, donde permanece durante un periodo de 6-7 meses en reposo para el secado de las resinas y otros productos presentes en los alcornocales, y que se encuentran en el corcho. Tras la estabilización de la materia prima, se produce el denominado proceso de cocción de corcho. Este proceso es esencial para mejorar las propiedades mecánicas del corcho y por tanto para la obtención de unas características adecuadas para su procesado. En este proceso se produce la limpieza, eliminación de sustancias hidrosolubles o posibles microorganismos, aumento de espesor (aproximadamente un 15%), reducción de la densidad, mejora de la flexibilidad y aplanamiento de las planchas que aún conservan la curvatura propia del tronco del alcornoque (figura I.4).

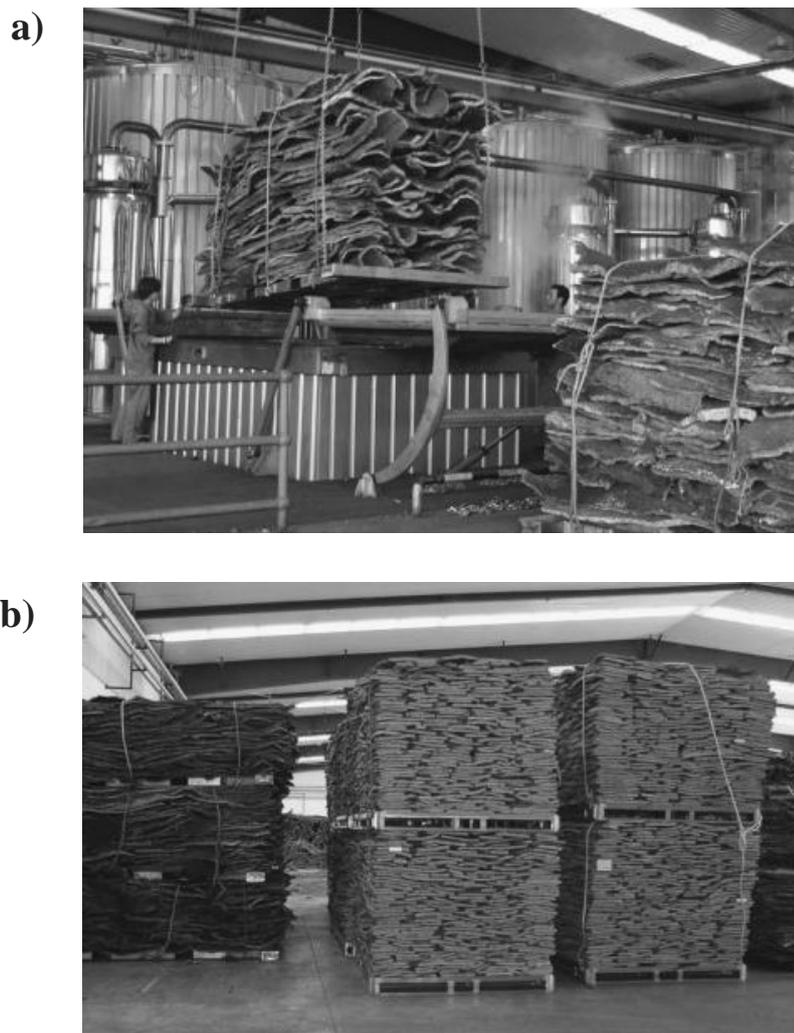


Figura I.4. Planchas de corcho a) antes y b) después de la cocción.

Fuente: Pereira, H. (Ed.). (2011). Cork: biology, production and uses. Elsevier.

La operación de cocido del corcho es un proceso normalizado y definido por el Código Internacional de Prácticas Taponeras (CIPT) [http://www.asecor.com/doc/cipt_es.pdf]. El procedimiento tradicional consiste en la inmersión de las planchas de corcho en balsas o calderas con agua hirviendo (a una temperatura próxima a los 100°C) durante al menos una hora. El agua debe de ser cambiada regularmente una o dos veces por semana, y después de cada parada de un día. Tras el proceso de cocción, las planchas de corcho son secadas y sujetas a un proceso de reposo durante aproximadamente tres semanas con niveles de humedad y temperatura controladas. Posteriormente, las planchas de corcho son recortadas y separadas de acuerdo con su espesor y calidad.

Estas planchas son enviadas normalmente a la industria transformadora, presentando una amplia actividad industrial que ofrece dos vertientes fundamentales dentro de la

utilización del corcho natural: la primera corresponde a todas aquellas actividades que requieren un corcho de óptima calidad, como es el caso de la elaboración de tapones de corcho. La segunda de ellas corresponde a aquellas que requieren el corcho de menor calidad, como por ejemplo la industria del calzado, artículos deportivos, de decoración, de pesca, o la elaboración de aglomerados.

A pesar de que la industria de producción de corcho puede ser considerada como ecológica ya que el corcho es un material natural no contaminante y reciclable, en el proceso de cocción se generan grandes cantidades de aguas residuales, donde se hidrolizan componentes naturales del corcho como lignina, taninos o compuestos clorados, que son capaces de transformarse en otros compuestos o sustancias perjudiciales para el medio ambiente.

I.6.3. Aguas residuales industriales procedentes de la industria corchera

En la producción industrial de corcho, la etapa de cocido, da lugar a grandes volúmenes de agua residual (140-1200 L/tonelada de corcho) [Gil, 1998; Gil y cols., 2005]. La composición de ésta agua residual de cocido de corcho (ARC) depende del tipo de corcho y del número de ciclos de cocido. Las aguas residuales se caracterizan por tener un color oscuro, pH ácido, baja biodegradabilidad, toxicidad media y por la presencia de compuestos fenólicos y taninos, 2,4,6-tricloroanisol o pentaclorofenol [Minhalma y cols., 2000; Benítez y cols., 2006]. Estas sustancias orgánicas son indeseables y su continua acumulación en el agua a lo largo de los ciclos de cocido requiere una evacuación frecuente del agua residual. Debido a este alto contenido en compuestos orgánicos, estas aguas tienen un contenido de demanda química de oxígeno (DQO) superior a los límites de descarga al medio ambiente, mostrando un valor medio de 7400 mg/L [Mendonça y cols., 2004; Acero y cols., 2005]. Además, se ha detectado la presencia de toxicidad en efluentes procedentes de la industria corchera con valores de EC₋₅₀ (Concentración media efectiva de una sustancia en el medio que produce un determinado efecto en el 50% de los organismos) que oscilaron entre 2.3% y 29.5% para las especies *Vibrio Fisheri* y *Daphnia Magna*. [Mendonça y cols., 2007].

El ARC no tiene ningún propósito útil y su potencial contaminante la convierte por tanto en un grave peligro ambiental debido al contenido orgánico tóxico y recalcitrante [Ré y cols., 2007; Mendonça y cols., 2007]. En estas condiciones las aguas residuales

no se pueden descargar directamente en las redes municipales de alcantarillado, ya que excede los límites legales de vertido al medioambiente. Por tanto, es necesario buscar soluciones que impliquen un correcto tratamiento [Benítez y cols., 2003].

Debido a ello, es necesario el desarrollo y estudio de tecnologías que afronten de forma eficiente el tratamiento de estas aguas complejas con el fin de obtener aguas con parámetros de calidad dentro de los rangos establecidos para la descarga o reúso en el mismo proceso industrial. De esta forma se lograría reducir la huella hídrica que produce este tipo de industria en el medioambiente.

I.7. Bibliografía

Acero, J. L., Benítez, F. J., Leal, I., & Real, F. J. (2005). Removal of phenolic compounds in water by ultrafiltration membrane treatments. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(8), 1585-1603.

Am Water Works Res, F., Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment: application and engineering*. CRC press.

Arslan-Alaton, I. (2003). A review of the effects of dye-assisting chemicals on advanced oxidation of reactive dyes in wastewater. *Coloration Technology*, 119(6), 345-353.

Barb, W. G., Baxendale, J. H., George, P., & Hargrave, K. R. (1949). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide.

Barb, W. G., Baxendale, J. H., George, P., & Hargrave, K. R. (1951). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part I.—The ferrous ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47, 462-500.

Barb, W. G., Baxendale, J. H., George, P., & Hargrave, K. R. (1951). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part II.—The ferric ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47, 591-616.

Benítez, F. J., Acero, J. L., & Leal, A. I. (2006). Application of microfiltration and ultrafiltration processes to cork processing wastewaters and assessment of the membrane fouling. *Separation and Purification Technology*, 50(3), 354-364.

Benitez, F. J., Acero, J. L., Garcia, J., & Leal, A. I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research*, 37(17), 4081-4090.

Benitez, F. J., Beltran-Heredia, J., Real, F., & Acero, J. L. (2000). Phenolic contaminant acids oxidation by Fenton's reagent. *Fresenius Environmental Bulletin*, 9(3), 144-151.

BOE. Ley 29/1985 (<http://www.boe.es/boe/dias/1985/08/08/pdfs/A25123-25135.pdf>).

Brown, R. F., Jamison, S. E., Pandit, U. K., Pinkus, J., White, G. R., & Braendlin, H. P. (1964). The Reaction of Fenton's Reagent with Phenoxyacetic Acid and Some Halogen-Substituted Phenoxyacetic Acids¹. *The Journal of Organic Chemistry*, 29(1), 146-153.

Brugnatelli, L. V. (1787). *Elementi di chimica*.

Chevreul, M. (1807). De l'action de l'acide nitrique sur le liège. *Ann. Chim*, 92, 323-333. Chevreul, M. E. (1814). Mémoire sur le moyen d'analyser plusieurs matieres végétales et le Liege en particulier.

DE, U. P. M. D. E. (2008). LOS RECURSOS HÍDRICOS (WWAP). El agua, una responsabilidad compartida. Segundo informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. Zaragoza: Expoagua Zaragoza.

DIRECTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de octubre de 2000.

Directiva 2013/39/UE del 12 de agosto (<https://www.boe.es/doue/2013/226/L00001-00017.pdf>).

Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de Mayo de 1991) de las Comunidades Europeas, C. (1991). Directiva del Consejo 91/271/CEE de 21 de Mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Directiva, C. E. (1975). 76/160/CEE (1976). Directiva del Consejo de diciembre de.

Directive 2013/39/UE of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*

Europea, U. (1998). DIRECTIVA 98/83/CE DEL CONSEJO Relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. <https://www.boe.es/doue/1998/330/L00032-00054.pdf>.

Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899-910.

Gil L (1998) Cortiça, produção, tecnologia e aplicação, INETI.

Gil L, Pereira C, Silva P 2005. Cork and CO₂ fixation. Proceedings of SUBERWOOD: New challenges for integration of cork oak forests and products. Universidad de Huelva, Huelva, 20-22 October.

Glaze, W. H., Kang, J. W., & Chapin, D. H. (1987). The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation.

Guillemonat, A. (1960). Progrès récents dans l'étude de la constitution chimique du liège. Ann. Fac. Sci, 30, 43-54.

Haber, F. (1934). J. Weiss, Pro, R, Soc. London, Ser. A, 147, 3332.

Hata, K., Sogo, M., Fukuhara, T., & Hochi, M. (1969). On the suberin in the outer bark of some Japanese tree species. Kagawa Univ Fac Agr Tech Bull.

Hollender, J., Zimmermann, S. G., Koepke, S., Krauss, M., Mcardell, C. S., Ort, C., ... & Siegrist, H. (2009). Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. Environmental science & technology, 43(20), 7862-7869.

Holloway, P. J. (1972). The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* Roth. Chemistry and physics of lipids, 9(2), 158-170.

<http://www.asecor.com/>

<http://www.barnacork.com/el-corcho/ique-es-el-corcho.html>

<http://www.boe.es/boe/dias/1986/07/22/pdfs/A26393-26402.pdf>

<http://www.boe.es/boe/dias/2012/09/20/pdfs/BOE-A-2012-11779.pdf>

<http://www.boe.es/boe/dias/2016/12/31/pdfs/BOE-A-2016-12601.pdf>

<http://www.boe.es/doue/2006/064/L00037-00051.pdf>

<http://www.boe.es/doue/2008/348/L00084-00097.pdf>

<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html?lang=es>

http://www.mapama.gob.es/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm7-28959.pdf

<http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/>

Klauber, A. (1920). *Die Monographie des Korke*. A. Weber.

Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A., & Anselmo, A. M. (2004). Fungal biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Engineering in life sciences*, 4(2), 144-149.

Mendonça, E., Picado, A., Silva, L., & Anselmo, A. M. (2007). Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 384-390.

Mendoza, J., Montañés, M., & Palomares, A. (1998). *Ciencia y tecnología del medio ambiente*. Universidad Politécnica de Valencia (España). 177p.

Minhalma, M., Dias, C. R., & De Pinho, M. N. (2000). Membrane fouling in ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Advances in Environmental Research*, 3(4), 539-549.

Nelieu, S., Kerhoas, L., & Einhorn, J. (1996). Atrazine degradation by ozonation in the presence of methanol as scavenger. *International journal of environmental analytical chemistry*, 65(1-4), 297-311.

Oppenländer, T. (2003). *Photochemical purification of water and air: advanced oxidation processes (AOPs)-principles, reaction mechanisms, reactor concepts*. John Wiley & Sons.

Pereira, H. (1982). Studies on the chemical composition of virgin and reproduction cork of *Quercus suber* L. Parameswaran, N., Liese, W., & Gunzerodt, H. (1981). Características do verde da cortiça de *Quercus suber* L. *Cortiça*, 514, 179-184.

Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Science and Technology*, 22(3), 211-218.

- Pereira, H. (Ed.). (2011). Cork: biology, production and uses. Elsevier.
- Peyton, G. R., & Glaze, W. H. (1988). Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. 3. Photolysis of aqueous ozone. *Environmental science & technology*, 22(7), 761-767.
- Pignatello, J. J. (1992). Dark and photoassisted iron (3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science & Technology*, 26(5), 944-951.
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical reviews in environmental science and technology*, 36(1), 1-84.
- Poyatos, J. M., Muño, M. M., Almecija, M. C., Torres, J. C., Hontoria, E., & Osorio, F. (2010). Advanced oxidation processes for wastewater treatment: state of the art. *Water, Air, and Soil Pollution*, 205(1-4), 187.
- Ré, A., Rodrigues, A. M., & Quintino, V. (2007). Acute toxicity testing with the European estuarine amphipod *Corophium multisetosum*. *Hydrobiologia*, 587(1), 89-99.
- Rigg, T., Taylor, W., & Weiss, J. (1954). The rate constant of the reaction between hydrogen peroxide and ferrous ions. *The journal of chemical physics*, 22(4), 575-577.
- Roberts, H., & Robinson, G. (1999). ISO 14001 EMS: manual de sistemas de gestión medioambiental. Editorial Paraninfo.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., ... & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water research*, 44(2), 578-588.
- Seguimiento en Materia de Agua y Saneamiento en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. www.unwater.org/sdgs/en/
- Serrano, A. (2007). Plan Nacional de Calidad de las Aguas 2007-2015. *Ambienta: la revista del Ministerio de Medio Ambiente*, (69), 6-15.

Sotelo, J. L., Beltrán, F. J., González, M., & Domínguez, J. (1989). Effect of high salt concentrations on ozone decomposition in water. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 24(7), 823-842.

Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water research*, 37(7), 1443-1467.

**CAPÍTULO II:
TÉCNICAS ANALÍTICAS
AVANZADAS APLICADAS A
AGUAS RESIDUALES
COMPLEJAS**

II.1. Introducción

II.1.1. Contaminantes presentes en el medio ambiente

El desarrollo de actividades humanas frecuentemente lleva asociadas alteraciones en el medio ambiente, que en numerosos casos, provocan efectos adversos sobre el mismo. Esto deriva en una preocupación por los niveles de contaminación a los que están expuestos todos los organismos vivos por diferentes vías: aire, agua, suelo, etc.

Tradicionalmente, la evaluación de riesgo medioambiental se ha realizado mediante la vigilancia y control de contaminantes en los diferentes compartimentos ambientales (aire, agua o biota), donde la química analítica juega un papel fundamental. La mayoría de estos compuestos son sustancias polares que entran al medio ambiente durante su producción, consumo y eliminación a niveles de mg/L o incluso niveles muy inferiores. Dentro de estos compuestos podemos encontrar los denominados “contaminantes emergentes” o “contaminantes de preocupación emergente” que son sustancias de origen natural (toxinas, hormonas, etc) y sintéticas (plaguicidas, farmacéuticos, plásticos, nanomateriales, etc) que, hasta ahora, no se consideraban un riesgo para el medioambiente. Los productos de transformación y metabolitos también contribuyen al aumento del número de estos contaminantes emergentes, ya que muchos de ellos pueden presentar unos valores de toxicidad comparables o incluso más elevados que los compuestos originales [Bletsou y cols., 2015; Farré y cols., 2014]. La red NORMAN en su página web proporciona una lista de estas sustancias [<http://www.norman-network.net>]. Dentro de estas sustancias, además de productos farmacéuticos u otro tipo de compuestos, se encuentran plaguicidas como carbendazima, dimetoato, imazalil, imidacloprid, propamocarb, tiabendazol o procloraz. Estos compuestos se usan de forma convencional en agricultura y pueden presentar grandes problemas medioambientales a largo plazo.

La complejidad de los análisis de compuestos en muestras ambientales reside en la inmensa cantidad de contaminantes a controlar, la complejidad de las matrices y la gran variedad de interferencias que se pueden encontrar. Las tendencias actuales en el desarrollo de nuevos métodos analíticos permiten determinar sustancias presentes en muestras complejas de una forma más rápida y eficiente, llegando a límites de detección extremadamente bajos. Para ello se requiere de métodos que permitan la separación e identificación de un gran número de compuestos con diferentes propiedades químicas y

un amplio intervalo de concentraciones. En numerosos casos, la identificación y evaluación cuantitativa resulta difícil debido a la ausencia de patrones analíticos disponibles en el mercado.

Actualmente, el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas ha permitido la detección de una amplia gama de sustancias químicas a niveles traza (ng/L – µg/L) en cursos de agua de todo el mundo [Belgiorno y cols., 2012]. Estas sustancias químicas (productos químicos naturales o sintéticos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, plaguicidas, productos químicos industriales y domésticos, surfactantes, etc) pueden incorporarse al medio ambiente a través de aguas residuales industriales, escorrentía agrícola, desechos domésticos, efluentes de vertederos, etc., y se consideran una amenaza para el medio ambiente y la salud humana.

La descarga de efluentes de EDAR al medio ambiente también está considerada una fuente de contaminación debido a ciertos contaminantes que pueden no ser correctamente tratados en estas plantas de tratamiento (contaminantes persistentes que no se eliminan mediante los tratamientos aplicados y otros compuestos que procedan de la bio-transformación de los no persistentes) [Bueno y cols., 2012; Loos y cols., 2013]. Un estudio realizado en 2012 por Martínez Bueno evaluó la presencia de un grupo de 100 compuestos orgánicos (productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, plaguicidas y metabolitos), mostrando un porcentaje diferente de eficiencia en cuanto a la eliminación de compuestos en diferentes EDAR españolas de diversas provincias, detectando la presencia de compuestos persistentes en todos los efluentes estudiados [Bueno y cols., 2012], lo que confirma que las descargas de efluentes de EDAR pueden ser responsables de contaminación en aguas superficiales.

Existe además una preocupación creciente por la presencia de contaminantes orgánicos y microorganismos patógenos en fangos de EDAR, ya que pueden convertirse en una fuente de contaminación acuática o terrestre cuando se utiliza en la agricultura o en vertederos. [Mailler y cols., 2014]. Los compuestos lipofílicos que se encuentren o se generen en un tratamiento secundario de una EDAR, son susceptibles de una adsorción (atracciones electrostáticas entre grupos ionizados positivos en los micro-contaminantes con los negativos de la superficie de microorganismos) o absorción (asociación con grasas o con la membrana lipofílica de microorganismos) en los fangos activos [Luo y

cols., 2014], que tras un tratamiento en la línea de fangos (generación de biosólidos), pueden ser utilizados como fertilizantes.

II.1.2. Estrategias generales de análisis de compuestos

Una evaluación rigurosa de la contaminación ambiental requiere una innovación constante en tecnologías y enfoques analíticos que permitan una identificación precisa de cada sustancia capaz de alterar el medio ambiente. La actual tendencia es el desarrollo de métodos rápidos y genéricos que permitan extraer y analizar el mayor número de compuestos posible con costes relativamente bajos.

La gran variedad de compuestos existentes y sus diferentes propiedades físico-químicas tales como el pKa complican el desarrollo de una metodología “universal” para la determinación de compuestos y sus productos de degradación. Debido a la complejidad de las matrices, el análisis de contaminantes en aguas residuales lleva casi siempre asociada la utilización de varias técnicas combinadas. El principal objetivo del proceso es conocer una parte bien representativa de una muestra. La estrategia más común es llevar a cabo una primera etapa de muestreo, una segunda de tratamiento previo, una etapa de extracción y posterior limpieza de los extractos y por último la detección de compuestos de interés. En la figura II.1 se muestra un procedimiento general para el análisis de muestras acuosas y muestras sólidas. La planificación de cada uno de estos pasos es muy importante, ya que una estrategia mal definida podría llevar a obtener una respuesta equivocada.

En general, la tendencia actual de análisis, es el desarrollo de procedimientos que sean rápidos, sensibles y que involucren un menor consumo de solventes o reactivos. Para una correcta detección de contaminantes en muestras ambientales, la etapa de extracción y la selección de los equipos de detección son las etapas cruciales en el proceso, sobre todo si se pretende determinar compuestos a niveles de traza.

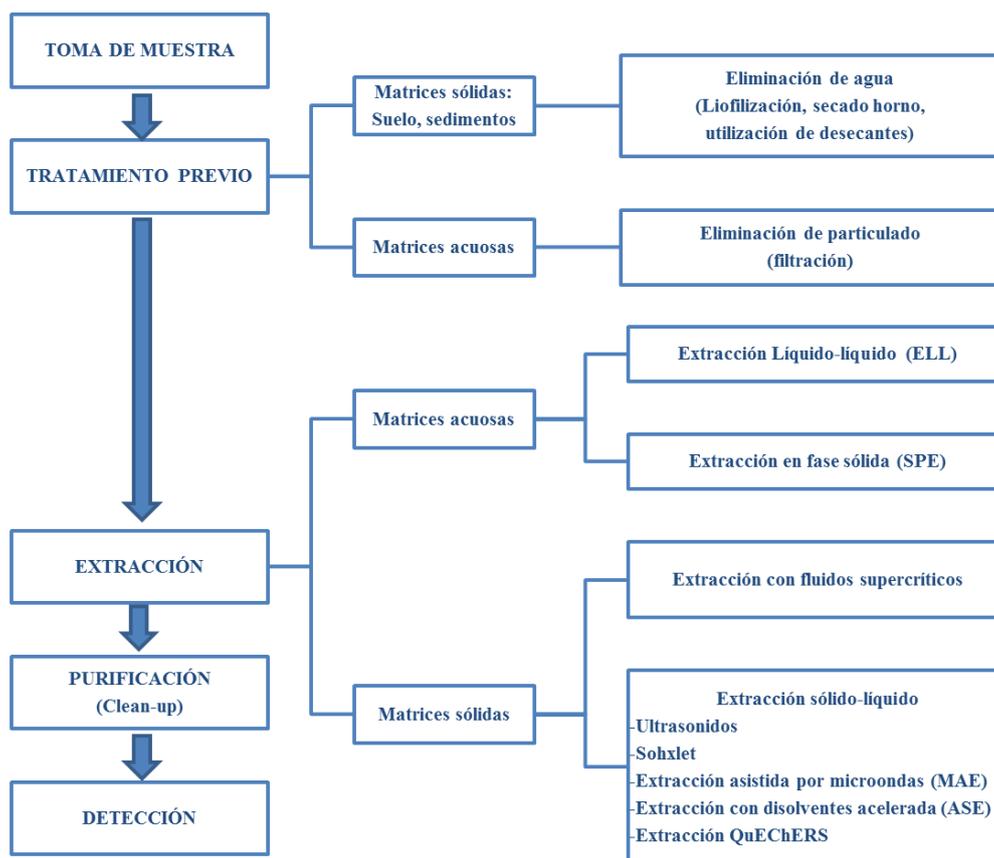


Figura II.1. Estrategia general de análisis de contaminantes para muestras acuosas y sólidas.

II.1.2.1. Extracción de muestras

El objetivo de la extracción de muestras es la de obtener una solución representativa, reproducible y homogénea, conteniendo los compuestos de interés, que sea lo más limpia posible, libre de interferencias (cuando esto sea posible), y que sea compatible con el método de detección seleccionado. Por tanto, la correcta elección de un método de extracción es fundamental para un posterior análisis cromatográfico satisfactorio.

En muestras acuosas, tradicionalmente las técnicas más utilizadas para la etapa de extracción son la extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés “Liquid-Liquid Extraction”) y la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés “Solid Phase Extraction”). La LLE ha resultado un método eficaz para la separación de compuestos con diferentes solubilidades en dos líquidos inmiscibles [Majors, 2013]. Sin embargo, a pesar de ser una metodología sencilla y que proporciona buenas recuperaciones, presenta grandes inconvenientes, como el uso de grandes cantidades de

disolventes orgánicos y la necesidad de aplicar una técnica de evaporación de estos disolventes para la concentración de los extractos. Además, el usuario debe seguir estrictas normas de seguridad debida a la toxicidad de los disolventes.

La SPE con todas sus variantes, es hoy por hoy una de las técnicas más potentes para muestras de diferente índole (muestras ambientales, alimentos, industria farmacéutica, etc) debido a su gran versatilidad y a la introducción en las últimas décadas de una gran diversidad de sorbentes o cartuchos de extracción que pueden encontrarse en el mercado [Bielicka-Daszkiewicz, 2016]. Mediante la elección de los cartuchos adecuados se pueden conseguir extracciones muy selectivas. Además esta técnica resulta idónea para el diseño de equipos automatizados.

Una de las modificaciones de formato que ha despertado cierto interés en los últimos años es la introducción de la SPE dispersiva o dSPE. La principal característica es que la extracción no se lleva a cabo en un cartucho sino en el seno de la propia disolución. La ejecución por tanto es más fácil y rápida que en una SPE convencional. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos realizados mediante la técnica dSPE se emplea una etapa de limpieza o “clean up” con el objetivo de reducir, minimizar o eliminar las interferencias potenciales que puedan afectar a la posterior determinación cromatográfica [Wilkowska y cols., 2011]. En este sentido, el método QuEChERS (acrónimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe, que significan que es un método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro) ha sido el más empleado en los últimos años [<http://quechers.cvua-stuttgart.de/>].

Recientemente, la atención se ha centrado en la miniaturización de las técnicas de extracción, es decir, técnicas que garanticen la reducción del consumo de reactivos. En este sentido se han desarrollado en los últimos años métodos como la microextracción en fase sólida (SPME, Solid-Phase Microextraction), extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) o micro-extracción líquida-líquida dispersiva (DLLME, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction). [Rezaee y cols., 2006; Zhao y cols., 2009].

II.1.2.1.1. Extracción en fase sólida (SPE) y fase sólida secuencial (SSPE)

La SPE es una técnica que se desarrolló a mediados de los años 70 como alternativa a la LLE. Hoy en día es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de muestras tanto líquidas como gaseosas [Canosa, 2009].

Esta técnica analítica de separación consiste en el paso de una muestra acuosa a través de un soporte sólido (cartucho de extracción) conteniendo un material que extrae selectivamente al analito de interés, desechando así los compuestos que pueden producir interferencias en el análisis. Los analitos son adsorbidos en el soporte y posteriormente eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material adsorbente y la fase móvil utilizada. Este procedimiento puede, adicionalmente, concentrar una muestra permitiendo mejorar la detección de sustancias que se encuentran a muy baja concentración. El mecanismo para la retención de los compuestos de interés en el adsorbente depende de las características propias del analito (pH o temperatura), así como las del adsorbente, y se basa en interacciones tipo dipolo-dipolo, ión-dipolo, interacciones hidrofóbidas o de intercambio iónico. Para la optimización de un método SPE por tanto es necesario conocer el tipo de analitos específicos que se quieren analizar y el comportamiento en términos de polaridad o hidrofobicidad. Un parámetro que nos ayuda a conocer la polaridad de cada compuesto es el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}), y se define como la relación de equilibrio de la concentración de un producto químico en octanol y en agua a una temperatura determinada. En cualquier caso, puede ser difícil predecir la afinidad de un analito específico hacia el adsorbente. Además, hay compuestos solubles en agua que no se retienen en el adsorbente o lo hacen escasamente, por lo que hay que usar una ELL convencional.

El procedimiento general de SPE consiste en varias etapas:

- Etapa de acondicionamiento: Consiste en la activación del adsorbente y de los grupos funcionales del mismo. Se consigue pasando un volumen de disolvente apropiado a través del cartucho. Un disolvente muy utilizado para esta etapa es el metanol. A continuación el disolvente utilizado para la activación se reemplaza por el disolvente de la muestra, normalmente agua Milli-Q a un pH determinado. La elevada tensión superficial del agua, combinada con la microporosidad de las membranas cargadas con partículas, da como resultado un flujo lento y desigual a través de la membrana y

una baja recuperación del analito si las membranas no se acondicionan en primer lugar con un disolvente orgánico [Poole y cols., 2000].

- Etapa de carga de muestra: Consiste en pasar el volumen de muestra seleccionado a través del cartucho. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de la muestra.
- Etapa de lavado: Esta etapa permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho del adsorbente. En muestras acuosas, se suele utilizar agua Milli-Q para esta etapa.
- Etapa de secado: Consiste en hacer circular una corriente de nitrógeno a través de la columna, mejorando así el rendimiento de la extracción, y asegurándonos que no quedan restos de disolución acuosa en el medio.
- Etapa de elución: En esta etapa se pasa un disolvente adecuado por la columna para eluir los compuestos de interés. El solvente óptimo ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las impurezas de la muestra, dejándolas en el adsorbente. Para obtener un valor alto de concentración de las muestras el volumen de elución ha de ser el menor posible.

En general, el proceso de extracción se puede realizar de forma manual o utilizando sistemas que permiten la automatización del proceso de extracción. La automatización permite extraer una secuencia de muestras sin necesidad de supervisión y de forma repetitiva. Sin embargo, para aplicar diferentes condiciones de extracción (diferentes acondicionamientos, volúmenes de extracción, pH y cartuchos) el sistema de programación de los equipos es más complicado y los tiempos de extracción son más largos.

Para muestras complejas se puede aplicar una extracción en fase sólida secuencial o SSPE (por sus siglas en inglés “Sequential Solid Phase Extraction”), que consiste en el paso de la muestra por varios cartuchos de extracción en serie. Esta técnica permite aumentar la selectividad de la extracción y el fraccionamiento de muestras.

II.1.2.1.2. Extracción en fase sólida dispersiva: método QuEChERS

El método QuEChERS se desarrolló en los años 2001 y 2002 por Michelangelo Anastassiades durante su trabajo post-doctoral en el grupo de investigación de Steven Lehotay en Pennsylvania (EEUU), publicándose por primera vez el método detallado en 2003 [Anastassiades y cols., 2003]. Esta metodología inicialmente fue desarrollada para el análisis de compuestos veterinarios en tejidos animales, pero después de darse cuenta del potencial de la técnica, se probó en la determinación de compuestos polares y de carácter básico como en el análisis de residuos orgánicos de plaguicidas en matrices vegetales, dando resultados satisfactorios y convirtiéndose en la metodología más reconocida y ampliamente utilizada en este campo.

Debido a su capacidad para extraer con elevada eficacia compuestos orgánicos en un amplio rango de polaridades, el método QuEChERS se ha expandido recientemente a aplicaciones ambientales para el análisis tanto de plaguicidas como de otros compuestos de preocupación ambiental en suelos, sedimentos y aguas residuales, confirmando que se trata de una poderosa técnica multiresiduo [Bruzzoniti y cols., 2014]. Así, este método se ha aplicado en el análisis de fangos de aguas residuales de EDAR urbanas para la determinación de productos farmacéuticos [Peysson y Vulliet, 2013; Ferhi y cols., 2016; Bourdat-Deschamps y cols., 2014; Rossini y cols., 2016] o plaguicidas [Olofsson y cols., 2013]. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología aún no se ha concretado para la determinación de compuestos en aguas residuales industriales, siendo éste uno de los objetivos de este trabajo.

El método QuEChERS combina una primera fase de extracción simple con un disolvente orgánico (normalmente acetonitrilo) y diferentes sales para eliminar el agua presente en las muestras y una segunda etapa de extracción dispersiva en fase sólida (dSPE). Esta última etapa se conoce como etapa de limpieza o “clean up” y permite mediante el uso de adsorbentes selectivos, minimizar posibles interferencias en el análisis cromatográfico.

Desde que se empezó a utilizar este método, se han desarrollado modificaciones con el objetivo de asegurar una extracción eficiente para compuestos dependientes del pH y para abarcar el mayor número de matrices posibles [Lehotay, 2007; CEN, 2008]. Las variantes más populares se basan en la adición de un tampón para mantener un pH

controlado durante la extracción. Así, la adición de acetato (QuEChERS AOAC, pH 4.8) [Lehotay y cols., 2007] o tampón citrato (EN 15662, pH 5-5.5) han demostrado su eficacia en el análisis de plaguicidas en alimentos. En la figura II.2 se muestra el método desarrollado por Anastassiades y dos de sus modificaciones (QuEChERS AOAC y EN 15662).

Además, en una extracción QuEChERS hay que tener en cuenta que productos secos como cereales, frutas o té requieren adición de agua antes de la extracción para debilitar las interacciones de los compuestos de interés con la matriz y asegurar un coeficiente de partición adecuado que favorezca la extracción.

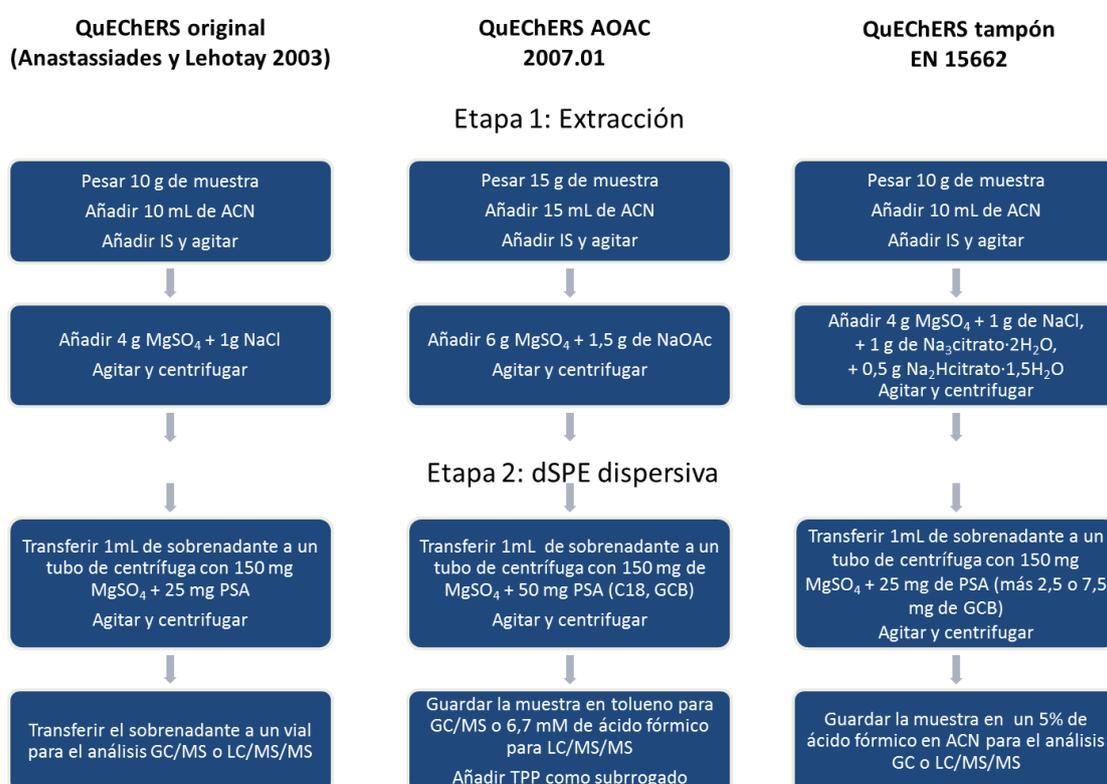


Figura II.2. Método QuEChERS original y dos modificaciones (2007.01 y EN 15662:2008).

Al realizar una extracción hay que tener en cuenta la interacción de los analitos con la matriz, ya que la co-elución de los componentes de la matriz con los compuestos objeto de estudio puede dar lugar a una supresión o un aumento indeseable en la señal en el análisis cromatográfico posterior, afectando al rendimiento cuantitativo de los métodos. Por esta razón, es necesario optimizar y aplicar procedimientos de limpieza eficientes

para obtener mejores resultados en términos de recuperaciones promedio y efectos matrices. Por tanto, la segunda etapa en el método QuEChERS (d-SPE) es una etapa de limpieza fundamental sobre todo cuando se trabaja con matrices complejas. Normalmente esta limpieza se consigue mediante la adición de una mezcla de sulfato magnésico con adsorbentes como PSA (amina primaria-secundaria para la eliminación de azúcares y ácidos grasos), C18 (para la eliminación de interferencias no polares como lípidos o Carbón-grafito) o CGB (para la eliminación de pigmentos) [Schenck y Hobbs, 2004]. Recientemente se han comercializado otros compuestos como Z-sep o Zsep+ con el objetivo de mejorar la limpieza en matrices altamente grasas. Un ejemplo de ello es el uso de estos compuestos en el análisis de plaguicidas y contaminantes ambientales en peces y camarones o en la determinación de pesticidas en frutas aceitosas o aceites vegetales [Wang y cols., 2015; Nieto-García y cols., 2015; Morris y Schriener, 2015; Li y cols., 2015].

II.1.2.2. Separación cromatográfica

El análisis de una muestra contempla una primera etapa de separación cromatográfica. Los dos enfoques más comunes para la separación de un analito de otros compuestos en el extracto de la muestra son la cromatografía de gases (GC, siglas en inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas en inglés). La diferencia esencial entre las dos técnicas es la naturaleza del proceso de partición. En GC el analito se reparte entre una fase estacionaria y una fase gaseosa, mientras que en HPLC el proceso de partición ocurre entre una fase estacionaria y una fase líquida. Por tanto, la separación se logra en ambos casos por la afinidad del analito de interés con la fase estacionaria. Cuanto mayor es la afinidad más se mantiene el analito en la columna. La elección de la técnica empleada depende en gran medida del analito de interés. La GC generalmente es una técnica rápida y con buena resolución, sin embargo, la cromatografía líquida presenta ciertas ventajas con respecto a la GC:

- La cromatografía líquida se aplica a la separación de cualquier compuesto soluble en fase líquida (fármacos, ácidos nucleicos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, antioxidantes, polímeros naturales y sintéticos, etc), mientras que la GC se aplica únicamente a compuestos volátiles.

- El análisis en HPLC generalmente se realiza a temperatura ambiente, y por tanto se pueden recuperar compuestos que sean termolábiles.
- Los detectores para HPLC generalmente no son destructivos de la muestra, por tanto, las muestras pueden utilizarse para análisis posteriores.

II.1.2.3. Sistemas de detección. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Hoy en día, la espectrometría de masas es una técnica muy utilizada en la identificación de compuestos desconocidos, cuantificación de compuestos conocidos y elucidación de estructuras moleculares. El desarrollo de esta tecnología se remonta a los años 20, donde el físico, químico y profesor inglés Francis William Aston inventó el primer espectrómetro de masas, permitiéndole identificar isótopos del Neón, siendo galardonado en 1922 con el premio Nobel de Química.

Los procesos que se producen en un espectrómetro de masas son de naturaleza química, por tanto la presencia y abundancia de determinados iones en un espectro de masas, será función de la estructura química de cada compuesto analizado. Los compuestos por tanto, se separan de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) y finalmente se detectan en el equipo adecuado.

Aunque la espectrometría de masas resulta ser una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, la complejidad de los espectros de masas dificulta enormemente el análisis de mezclas complejas, por ello se utilizan acoplamientos con técnicas potentes de separación, como es la cromatografía, registrándose espectros de masas a lo largo de la separación cromatográfica.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública debido a su altísima especificidad y sensibilidad, permitiendo la detección de un gran número de microcontaminantes orgánicos, incluso a niveles de pg/L. [Pérez-Fernández y cols., 2017]. Esta técnica alcanzó su mayor eficacia a partir del año 2002 cuando se le concedió el premio Nobel de Química a los científicos John B. Fenn, Koichi Tanaka y Kurt Wüthrich por el desarrollo de métodos de identificación y análisis de estructuras de

macromoléculas biológicas. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología se produjo con considerable retraso respecto a su homóloga cromatografía de gases aplicada a espectrometría de masas (GC-MS) debido al enorme contraste entre los flujos utilizados en cromatografía líquida convencional con el alto vacío necesario para el analizador de masas.

La cromatografía líquida se basa en una separación física de la muestra en función de su afinidad entre dos fases, una fase estacionaria (columna cromatográfica) y una fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza elutrópica, que fluyen a través de la columna. La interacción que se produce entre el analito y los disolventes es el factor determinante en la retención de los mismos en la columna cromatográfica. La clasificación de los diferentes tipos de cromatografía líquida depende de la composición química y el tipo de relleno de la fase estacionaria, pudiéndose producir diferentes mecanismos de separación. El tipo de cromatografía más común es la fase reversa y el tipo de material apolar con que se rellenan las columnas de fase reversa suele ser sílica químicamente modificada (cadenas de C₈, C₁₈), aunque también se hace uso de otros materiales como copolímeros de estireno-divinilbenceno (XAD, PRP) o partículas de sílice-carbón (X-Terra). En los últimos tiempos la cromatografía líquida en fase reversa se ha convertido en el tipo de cromatografía más ideal para el acoplamiento con la espectrometría de masas, sobre todo debido a la idoneidad de esta cromatografía para el análisis de compuestos polares. La adición de aditivos como ácidos o disoluciones tamponadas en la fase móvil puede favorecer la ionización $[M+H]^+$ (protonación) o $[M-H]^-$ (desprotonación) de los compuestos de interés.

Por otro lado también se está desarrollando en los últimos tiempos el uso de cromatografía de interacciones hidrofílicas (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC). Este tipo de cromatografía se basa en el uso de columnas de sílica no modificadas y presenta una retención contraria al de la fase reversa, donde los compuestos de alta polaridad quedan retenidos en la fase estacionaria. Los compuestos más básicos se eluyen con fase móvil ácida generando iones positivos mediante protonación mientras que los analitos ácidos eluyen a pH neutro, pudiéndose cromatografiar incluso en su forma desprotonada.

El factor limitante para el desarrollo del acoplamiento LC-MS fue la obtención de interfases que permitieran la introducción del flujo de LC en los detectores de masas. La ionización de los analitos es de vital importancia, ya que eligiendo una interfase adecuada se puede controlar, separar y dirigir iones cargados de forma sencilla y eficiente hacia el analizador de masas. Una de las interfases más utilizadas actualmente en esta técnica es el electrospray o ESI. Cuando se usa esta interfase, el flujo procedente de la cromatografía líquida (donde se encuentran los analitos de interés) pasa a través de un capilar a presión atmosférica, manteniendo alto voltaje que dispersa la corriente de líquido formándose gotas altamente cargadas (nebulización). Estas gotas formadas son desolvatadas a medida que pasan a través de la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas. El proceso de desolvatación es asistido por una corriente de gas caliente. A medida que el tamaño de las gotas va disminuyendo se alcanza un punto en el cual las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie de la gota son suficientes para superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial. Es entonces donde ocurre una “explosión de Coulomb” produciendo gotas más pequeñas y llegando al punto donde los iones son capaces de pasar a fase gaseosa. Estos iones son transferidos a través de una serie de lentes focalizadoras hacia el analizador de masas (figura II.3).

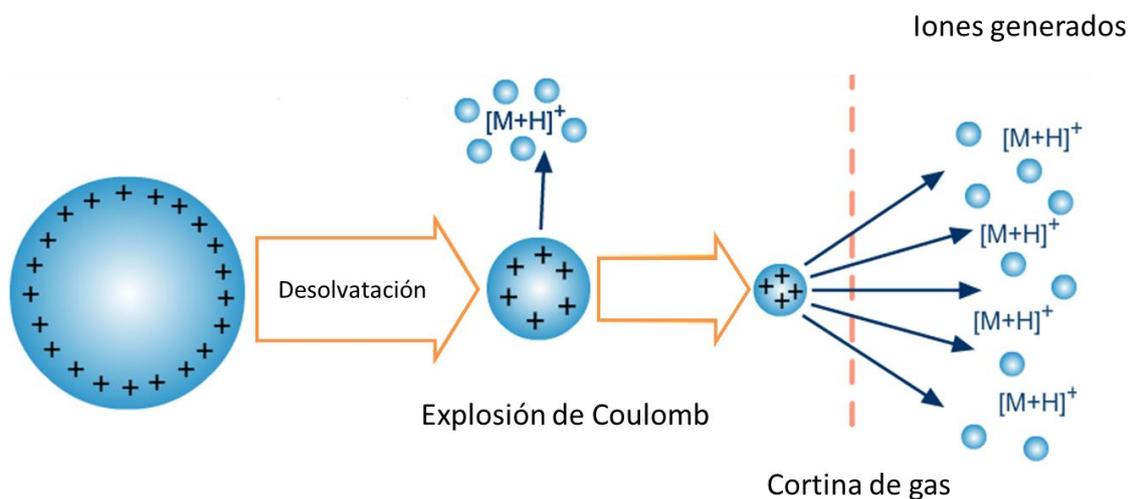


Figura II.3. Ionización en electrospray.

Mientras que la cromatografía líquida separa las mezclas con múltiples componentes, la espectrometría de masas proporciona la identidad estructural de los componentes individuales con alta especificidad molecular y sensibilidad. Esta técnica es muy utilizada para el análisis de compuestos bioquímicos, orgánicos e inorgánicos que se

encuentran comúnmente en muestras ambientales y muestras biológicas. Por tanto, es una técnica de fácil aplicación a una amplia gama de sectores que incluyen la biotecnología, el control del medio ambiente, procesado de alimentos, industrias, cosmética, etc. [Dass, 2007].

Existen diferentes tipos de analizadores de masas, que son los encargados de separar los distintos iones generados en función de su relación masa/carga (m/z). Los cinco analizadores más importantes son de tipo cuadrupolo, tiempo de vuelo, trampa de iones cuadrupolares, sector magnético y resonancia de ión-ciclotrón con transformada de Fourier. El analizador de masas seleccionado, así como las condiciones cromatográficas, vendrá determinado por el objetivo de los análisis, y depende de si se quiere detectar, cuantificar o confirmar la presencia de un determinado analito en una muestra.

Una de las tendencias en el desarrollo de metodologías específicas para la cuantificación de compuestos conocidos o “target” es el desarrollo y validación de métodos utilizando detectores de triple cuadrupolo (QqQ). Estos detectores permiten monitorizar y cuantificar una gran cantidad de compuestos con tiempos de análisis relativamente rápidos. Sin embargo, para la correcta cuantificación de las muestras es necesaria la utilización de patrones o estándares analíticos. Para ello, se evalúan diversos parámetros analíticos como rango lineal, precisión, límites de cuantificación y límites de detección, permitiendo “validar” un método específico para la detección de una serie de compuestos seleccionados en la “matriz” o muestra elegida. Cuando se trata de muestras complejas, los componentes de la matriz pueden interferir en la medida de los compuestos seleccionados, provocando el denominado “efecto matriz”, que en la mayoría de los casos puede dar lugar a un proceso de inhibición de la señal analítica.

Actualmente, existen ciertos compuestos (subproductos, productos de transformación o metabolitos) que podrían ser un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. La mayoría de ellos son sólo parcialmente conocidos, por tanto en la mayoría de casos no se dispone de estándares analíticos que permitan el uso de detectores QqQ. Dos estrategias alternativas para la determinación de este tipo de compuestos desconocidos o “non-target” es la utilización de analizadores de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) y Orbitrap. Ambos proporcionan datos de masa exacta de un espectro completo

con alta sensibilidad. Esta capacidad resulta muy útil para detectar compuestos desconocidos en las muestras de interés.

En este trabajo se utilizó un analizador de masas Triple Cuadrupolo/Trampa de Iones lineal (Q-TRAP) y un Triple Cuadrupolo/Tiempo de vuelo (Q-TOF). El triple cuadrupolo se consideró muy adecuado para la cuantificación de compuestos predefinidos (target analysis), mientras que la utilización del Q-TOF permitió el estudio de compuestos desconocidos en muestras acuosas (non-target analysis).

II.1.2.4. Análisis de compuestos desconocidos “non-target”. Técnicas metabolómicas

En la actualidad, el desarrollo de estrategias alternativas para la determinación de compuestos desconocidos, así como productos de degradación en muestras complejas está en continuo aumento. Los avances recientes en espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) y ultra-HRMS, como espectrometría de masas de triple cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo, orbitrap-MS o transformada de furier-MS han permitido la detección de compuestos desconocidos en una gran diversidad de matrices con gran sensibilidad y alta resolución [Ross y cols., 2012]. Sin embargo, uno de los principales problemas de este tipo de análisis es el modo de gestionar y procesar la gran cantidad de información que estos métodos recogen en cada análisis. Para resolver este problema, se pueden aplicar determinados softwares capaces de realizar análisis multivariantes, análisis de compuesto principal (PCA) o proyección sobre estructuras latentes (PLS). Dichos softwares procesan toda la información y la transforman en un conjunto de datos de menor dimensión. Estos enfoques son comúnmente utilizados en metabolómica, siendo herramientas útiles para el manejo de datos [Sleighter y cols., 2010; Ross y cols., 2012; Chen y cols., 2015].

El término metabolómica se define como el estudio de los perfiles globales de metabolitos en las condiciones específicas de un sistema biológico. La interpolación de este concepto a otros campos de estudio se traduce en un análisis que intenta identificar la formación, aumento, disminución o desaparición de todas las moléculas pequeñas de un sistema global en un conjunto específico de condiciones [Worley y Powers., 2013; Hassani y cols., 2010]. Por tanto, en muestras medioambientales, la utilización de técnicas metabolómicas tiene como objetivo detectar y elucidar la estructura de

compuestos y metabolitos, que se caracterizan por una gran diversidad físico-química en sus estructuras moleculares. Estas técnicas utilizan sistemas de análisis multivariable. Para ello hay que disponer de softwares específicos con algoritmos determinados para el manejo de grandes volúmenes de datos.

El desarrollo de softwares adecuados para la traducción de información de masa exacta (ME) producida por los equipos de espectrometría de masas de alta resolución resulta un factor limitante en el análisis de datos debido a la necesidad de desarrollar matrices de datos y a la especificidad de los archivos generados. Actualmente cada marca comercial gestiona y comercializa softwares estadísticos específicos que permiten gestionar los datos obtenidos de los análisis para asegurar que la variabilidad de los parámetros de control del equipo (hardware) no influya en la transformación de los datos (reducción dimensional), y así aumentar la significancia del análisis estadístico.

Uno de los softwares utilizados en la actualidad para la identificación de marcadores químicos es MarkerView® (SCIEX, Concord, ON, Canadá). Este software maneja archivos de masa exacta (FullScan Q-TOF) a los cuales se aplica un algoritmo basado en análisis de componentes principales con el objetivo de analizar variaciones importantes en las muestras e identificar valores atípicos. El análisis de componente principal (PCA, por sus siglas en inglés “Principal Component Analysis”) es una técnica estadística basada en una transformación ortogonal de un conjunto de datos de carácter multivariable, utilizado para el análisis y visualización de variaciones sistemáticas entre muestras. Este tipo de análisis busca la proyección (de datos multivariados) según la cual los datos queden mejor representados en un plano bidimensional para poder identificar valores atípicos. El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral, se trataría de la búsqueda de ME de metabolitos que tienen una tendencia definida y característica (degradación, formación, aumento o distribución). Dicha proyección convierte una multitud de variables, posiblemente correlacionadas, en un conjunto de variables sin correlación lineal llamadas componentes principales (PCs). El PCA producirá diferentes proyecciones en planos bidimensionales que tienen un porcentaje estadístico el cual indica el nivel de variación que representa cada proyección. Los componentes principales son las razones de variación y se enumeran de mayor a menor en función del mencionado porcentaje (PC1, PC2, PC3... PCn). Seleccionando los dos componentes principales que expliquen en mayor medida la variación de los datos (PC1 y PC2), se consigue una visualización de múltiples experimentos, de forma que los compuestos

que cambian de forma similar o en la misma dirección aparecerán juntos en el diagrama PCA, mientras que los que sean muy diferentes o tengan grandes variaciones aparecerán separados en el gráfico. Esto es muy útil para la determinación de compuestos importantes, que sufran una variación específica en el sistema.

En la figura II.4 se muestra un esquema de la cantidad de información y multi-dimensionalidad de los datos obtenidos en experimentos de tratamiento de agua y analizados con HRMS, donde R_t e Intensidad representan los cromatogramas y m/z representan los espectros de masas de alta resolución.

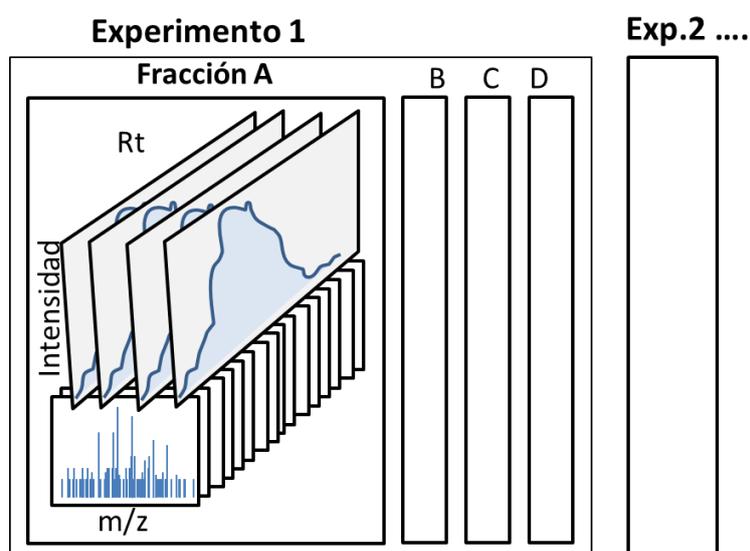


Figura II.4. Representación de la cantidad de información y multi-dimensionalidad de los datos proveniente de muestras de varios experimentos analizadas con HRMS. Donde: Experimento 1 representa una o varias muestras; Fracción A (B, C, D,...) representa las diferentes fracciones de la(s) muestra(s) generadas por un determinado método de preparación de muestras. R_t : tiempo de retención cromatográfico, Intensidad: valor arbitrario, m/z : masa exacta.

La reducción dimensional de la información obtenida a través del análisis de componente principal se representa mediante un esquema en la figura II.5. La proyección de todos los datos (HRMS) obtenidos en todos los experimentos se realiza en un plano bi-dimensional donde es posible visualizar y analizar los valores comunes que comparten todas las muestras y los valores atípicos que son característicos en una o varias muestra (i.e., una o varias etapas de un proceso). La posición de la “fuente de luz” que cambiará la proyección visual de los datos es función de la combinación de las

componentes principales (PCs). La proyección donde mejor se aprecian las diferencias o valores atípicos normalmente será la combinación de PC1 y PC2.

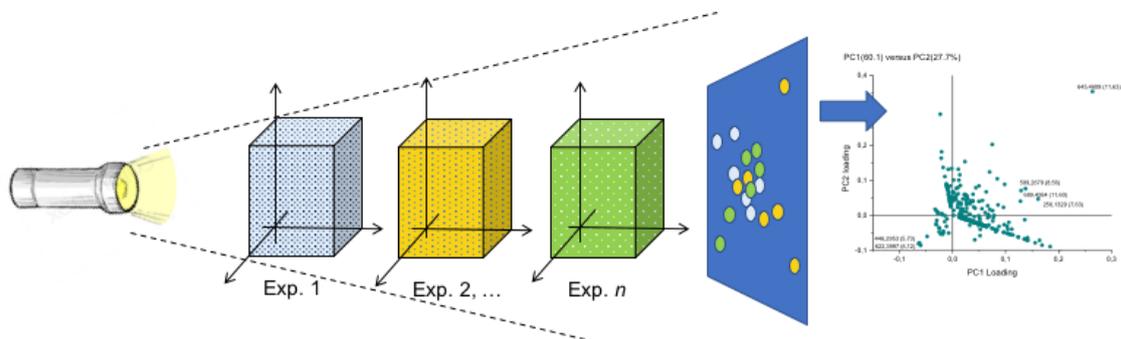


Figura II.5. Esquema de la reducción dimensional de la información obtenida a través del análisis de componente principal.

II.2. Objetivos y plan experimental

II.2.1. Objetivos

El objetivo general del trabajo que se presenta en este capítulo es el desarrollo de metodologías analíticas avanzadas (con elevada sensibilidad y selectividad) que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos para la evaluación de aguas residuales industriales. Los estudios realizados se han centrado en la búsqueda de compuestos conocidos (target) y desconocidos (non-target) utilizando técnicas cromatográficas avanzadas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución.

El interés de la realización de estos estudios no solo radica en la determinación de compuestos específicos, sino que permite establecer una metodología aplicable a la determinación de compuestos desconocidos potencialmente contaminantes en diferentes tipos de aguas industriales antes, durante y después de su tratamiento mediante técnicas de oxidación química y biológica.

Los objetivos específicos en el desarrollo del Plan experimental son los que se muestran a continuación:

- Desarrollo y validación de un método analítico avanzado para la extracción y cuantificación de compuestos “target” en fangos industriales mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
- Aplicación del método desarrollado para la determinación y cuantificación de los compuestos “target” (en este caso plaguicidas) a dos tipos de fango: un fango procedente de una industria agroalimentaria y otro procedente de una EDAR que trata aguas de procedencia urbana.
- Desarrollo de una nueva estrategia analítica para la determinación de compuestos “non-target” en aguas industriales complejas mediante la aplicación de técnicas metabolómicas.

II.2.2. Plan experimental

Para la consecución de los objetivos expuestos en el apartado anterior, ha sido necesario llevar a cabo el plan experimental que se detalla a continuación:

II.2.2.1. Determinación de una serie de plaguicidas seleccionados en fangos de una depuradora que trata aguas residuales industriales

- Elección de un fango activo procedente de una depuradora que trata aguas residuales industriales.
- Selección de una serie de plaguicidas modelo.
- Aplicación de una estrategia de extracción QuEChERS para la determinación de la fracción sólida del fango. La optimización de la metodología se realizó mediante una comparativa de la etapa de limpieza o clean-up basada en la utilización de diferentes adsorbentes (C18+PSA, Zsep y Zsep+).
- Selección de una estrategia de extracción SPE para la fracción líquida (sobrenadante) del fango seleccionado.
- Validación de ambos métodos de extracción utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. La correcta validación de cada metodología se llevó a cabo mediante la evaluación de ambos procedimientos en términos de linealidad, recuperaciones, límites de cuantificación, y precisión.
- Aplicación de ambas técnicas para la determinación de la concentración de los compuestos seleccionados en fangos procedentes de una depuradora que trata aguas industriales procedentes de la industria agroalimentaria y a una EDAR urbana.

II.2.2.2. Aplicación de un método de análisis multivariable para la detección de compuestos desconocidos utilizando HPLC-MS

- Selección de un agua compleja industrial, en este caso aguas residuales procedentes de la industria de cocido de corcho.
- Selección de una estrategia de extracción SPE para disminuir la complejidad de las muestras y obtener fracciones más sencillas de diferente polaridad.
- Inyección de muestras en un sistema LC/Q-TOF para evaluar el número de compuestos que pudieran contener las muestras.

- Desarrollo de una estrategia basada en técnicas metabolómicas y aplicación de un análisis multivariable para reducir la elevada cantidad de datos y encontrar sustancias resistentes al tratamiento de oxidación química propuesto en este estudio.

II.3. Materiales y métodos

II.3.1. Reactivos

Para la determinación analítica de una serie de plaguicidas en fangos de procedencia industrial se utilizaron estándares de grado analítico con una pureza mayor del 99%, suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania).

Las extracciones SPE incluidas en este trabajo se realizaron utilizando los siguientes cartuchos: C18 (500 mg; 3 cm³); C18 (500 mg, 6 cm³) y Lichroulut EN (200 mg y 6 cm³). Para las extracciones QuEChERs se utilizaron tubos de extracción (SupelQue Citrato) suministrados por Supelco, (Bellefonte, PA) conteniendo citrato sódico dibásico sesquihidratado (0.5g), citrato sódico tribásico dihidratado (1g), cloruro sódico (1g) y sulfato magnésico anhidro (4g). Además, para la etapa de limpieza en la extracción se utilizaron diferentes adsorbentes (C18, PSA, Z-sep y Zsep+), todos ellos suministrados por Supelco.

Para los análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se utilizó ACN y ácido fórmico de alta pureza (Fluka, Buchs, Alemania). El agua utilizada para la cromatografía fue generada directamente por un equipo Millipore (Bedford, MA) con una resistencia específica de 18.2 MΩ·cm.

II.3.2. Plaguicidas modelo

La principal fuente de contaminación del medio ambiente por el uso de plaguicidas es el residuo que resulta de su aplicación. Sin embargo, su dispersión es universal, afectando a los sistemas biótico (animales y plantas) y abiótico (suelo, aire y agua), amenazando su estabilidad y representando un peligro para la salud pública.

Aunque tradicionalmente se han considerado las prácticas agrícolas como principal fuente de contaminación del agua por plaguicidas, en los últimos años se ha prestado atención a otras fuentes no agrícolas, como por ejemplo las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas [Köck-Schulmeyer y cols., 2013]. Además de su presencia en los efluentes tratados, que contribuyen a la propagación de los plaguicidas en el medio acuático, algunos de estos plaguicidas tienden a acumularse en lodos de depuradora (fango activo) durante los tratamientos biológicos de dichas aguas residuales. Por tanto, la práctica común de extender los lodos de depuradora sobre tierras agrícolas puede

constituir una fuente adicional de contaminación del suelo por estos compuestos. [Olofsson y cols., 2013]. Algunas industrias también se consideran una fuente importante de contaminación por plaguicidas, como por ejemplo la industria alimentaria [Ibáñez y cols., 2015]. Las plantas de procesado o envasado de alimentos, incluyendo las etapas de lavado o tratamientos con fungicidas para el control de hongos durante el almacenamiento, producen grandes volúmenes de aguas residuales contaminadas con plaguicidas. Sin embargo, los tratamientos biológicos comúnmente aplicados a este tipo de aguas residuales no logran la eliminación total de los plaguicidas [Pérez y cols., 2014; Rivas Ibáñez y cols., 2014; Jiménez y cols., 2015; Agüera y cols., 2013]. Los lodos de depuradoras generados durante los tratamientos también pueden contener plaguicidas como Acetamiprid, tiabendazol o imazalil [Rivas Ibáñez y cols., 2014; Pérez y cols., 2014]. Sin embargo, el análisis de estos fangos o lodos de depuradora presenta grandes dificultades debido a la complejidad de la matriz.

En este trabajo se seleccionaron 11 plaguicidas modelo (tabla II.1) con el objetivo de desarrollar una técnica analítica para el estudio de la presencia de plaguicidas de uso común en lodos de depuradoras que tratan aguas residuales industriales y su aplicabilidad a otros lodos como los de EDAR urbanas. Estos plaguicidas se seleccionaron debido a su uso frecuente en prácticas agrícolas y por la presencia de estos compuestos como mayoritarios en un seguimiento anual realizado en nuestro grupo de investigación a una industria agro-alimentaria conocida, de donde proceden los lodos objeto de estudio [Agüera y cols., 2013]. Los once plaguicidas son: dos insecticidas de tipo neonicotinoide (acetamiprid e imidacloprid), un insecticida organofosforado (dimetoato), un insecticida carbamato (pirimicarb), cinco fungicidas de tipo azol (carbendazima, imazalil, miclobutanil, procloraz y tiabendazol) y otros dos fungicidas (propamodarb y pirimetanil).

Tabla II.1. Estructura química y propiedades de los plaguicidas modelo seleccionados.

Compuesto	Estructura química	Masa molar (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/l)	pKow	pKa	Propiedad ácido-base
Acetamiprid Insecticida neonicotinoide		222.7	2950 (25°C, pH 7)	0.8 (25°C)	0.7	No presenta en el rango 2-8
Carbendazima Fungicida benzimidazoico		191.2	8 (24°C, pH 7)	1.5 (25°C, pH 7.9)	4.2	Básico
Dimetoato Insecticida organofosfato		229.3	39800 (25°C, pH 7)	0.704 (pH 7)	n.a	No presenta disociación
Imazalil Fungicida azol		297.2	184 (20°C), pH 7.6	2.63 (pH 5)	6.49	Base débil
Imidacloprid Insecticida neonicotinoide		255.7	613 (20°C, pH 5.5)	0.57 (21°C)	n.a	No presenta disociación
Myclobutanil Fungicida triazol		288.8	124 (20°C, pH 3-5)	3.17 (20°C pH 4, 7, 9)	2.3	Ácido fuerte
Pirimicarb Insecticida carbamato		238.3	3000 (agua purificada)	1.7 (agua purificada)	4.44	Base débil
Procloraz Fungicida azol		376.7	26.5 (20°C)	3.53 (25°C, pH 6.7)	3.8	Base débil
Propamocarb Fungicida		188.3	900000 (20°C, pH 7)	1.2 (pH 7)	9.6	Básico
Pyrimetanil Fungicida		199.3	121 (25°C, pH 6.1)	3 (no dependiente del pH)	3.52	Base débil
Tiabendazol Fungicida bencimidazol		201.3	30 (20°C, pH 7)	2.39 (20°C, pH 7)	4.73	Básico

n.a: No aplicable

Fuente: Lewis, K., Tzilivakis, J., Green, A., & Warner, D. (2006). *Pesticide Properties DataBase (PPDB)*.

II.3.3. Técnicas analíticas avanzadas

II.3.3.1. Pre-tratamiento de muestras: Métodos de extracción

La puesta a punto de un método analítico, incluye una secuencia de procedimientos que se inicia con la recolección de la muestra y culmina con el procesado de los resultados. Los pasos intermedios para llevar a cabo esto pueden involucrar el almacenamiento de las muestras, acondicionamiento o preparación, aislamiento de los analitos de interés, identificación de estos analitos y por último la cuantificación. La preparación de la muestra es normalmente el paso más laborioso y tedioso, llegando en algunos casos a ser el 60% del tiempo total empleado en el método analítico. El principal objetivo en la preparación de muestras es la extracción de compuestos de interés, separándolos de otros componentes que pueden causar interferencias, y por tanto aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible.

II.3.3.1.1. Extracción en fase sólida (SPE) y fase sólida secuencial (SSPE)

Fundamento teórico y descripción del equipo

En este trabajo se ha desarrollado un método de SPE para el sobrenadante de un fango procedente de una industria agroalimentaria y un método combinado de extracción SPE y SSPE para la extracción de ARC.

Debido a la especificidad de cada analito y con el objetivo de obtener los mejores rendimientos, en la actualidad se comercializan una gran variedad de cartuchos de extracción que contienen distintos adsorbentes. En este trabajo, para la etapa de extracción de la fase líquida de un fango procedente de la industria agroalimentaria se utilizó un cartucho C18 de 3 cm³ con 500 mg de adsorbente proporcionado por Waters (Milford, Massachusetts, USA). Este adsorbente se seleccionó por su capacidad de proporcionar una adecuada recuperación para los plaguicidas de interés en un amplio rango de polaridades. Para el proceso de extracción de aguas complejas de procedencia industrial (aguas residuales procedentes de una industria corchera) se utilizaron dos cartuchos diferentes: a) C18 de 6 cm³ y 500 mg b) Lichroulut EN de 6 cm³.

Para la realización de las diferentes extracciones, se optó por un sistema de extracción manual utilizando un regulador de vacío Supelco Visiprep™ con 12 posiciones conectado a una bomba (figura II.6).



Figura II.6. Sistema de extracción manual utilizado para todas las extracciones SPE y SSPE.

La principal ventaja de la técnica seleccionada con respecto a la LLE convencional para las muestras objeto de estudio, es el menor consumo de disolvente y ausencia de emulsiones, además de la versatilidad del tipo de adsorbentes utilizados.

Procedimiento

Para la SPE del sobrenadante de fango de la industria agroalimentaria se utilizaron cartuchos comerciales C18 (500 mg, 3cc). Los cartuchos se acondicionaron con 6 mL de metanol y 6 mL de agua Milli-Q (pH 4). El pH de las muestras se ajustó previamente a un valor de 4 ± 0.5 . A continuación, 50 mL de muestra se pasaron por el cartucho C18 a un caudal de 1 mL/min. Para la etapa de lavado se utilizaron 4 mL de agua Milli-Q y los cartuchos se secaron posteriormente durante 10 minutos bajo corriente de nitrógeno para eliminar las trazas de agua. Finalmente los plaguicidas se eluyeron con 4 mL de metanol y posteriormente con 4 mL de acetonitrilo a un caudal de 1 mL/min. Los extractos se evaporaron hasta sequedad con una corriente de nitrógeno y se reconstituyeron con 1 mL de ACN. Antes del análisis cromatográfico, se aplicó a todas las muestras una dilución 1:10 con agua Milli-Q y finalmente las muestras se filtraron a través de un filtro de PTFE de 0.45 μm .

Para la SPE y SSPE de las aguas residuales de la industria corchera se utilizó un cartucho C18 (Sharlau Extrabond; 500 mg, 6 cc) en serie con un cartucho de estireno-divinilbenceno (Lichrolut EN, 200 mg, 6 cc) [Castillo y cols., 1999], (figura II.7).

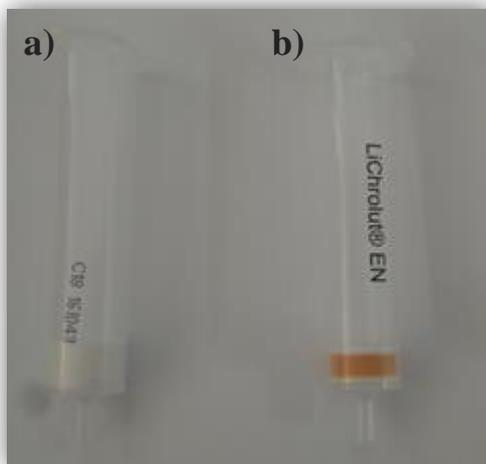


Figura II.7. Cartuchos utilizados para la extracción SPE y SSPE de las aguas residuales de la industria corchera: a) C18, b) LiChrolut EN.

Como etapa previa a la extracción, el pH de las muestras se ajustó a un valor comprendido entre 6.5 y 7.5 y a continuación, las muestras se filtraron a través de un filtro de celulosa de 0.22 μm . Para la extracción SPE y SSPE todos los cartuchos se acondicionaron con 7 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q a pH 7 a un caudal de 1 mL/min.

El procedimiento se inició con el paso de 200 mL de muestra por el cartucho C18 a un caudal de 5 mL/min. A continuación, la muestra percolada se acidificó a un pH de 3 y se pasó por el cartucho Lic EN a un caudal de 10 mL/min (fracción D). Para la desorción del cartucho C18 se utilizaron diferentes disolventes en serie con el fin de obtener fracciones con diferentes polaridades; 2 x 5 mL de hexano para la fracción A, 2 x 5 mL de diclorometano/hexano (4:1 v/v) para la fracción B y 2 x 5 mL de MeOH/diclorometano (9:1 v/v) para la fracción C. Un esquema sobre el procedimiento se muestra en la figura II.8.

Por último todas las muestras se evaporaron mediante una corriente suave de nitrógeno y se reconstituyeron en una mezcla agua /ACN (9:1), que es una fase móvil apropiada para una posterior separación cromatográfica y análisis en LC-MS.

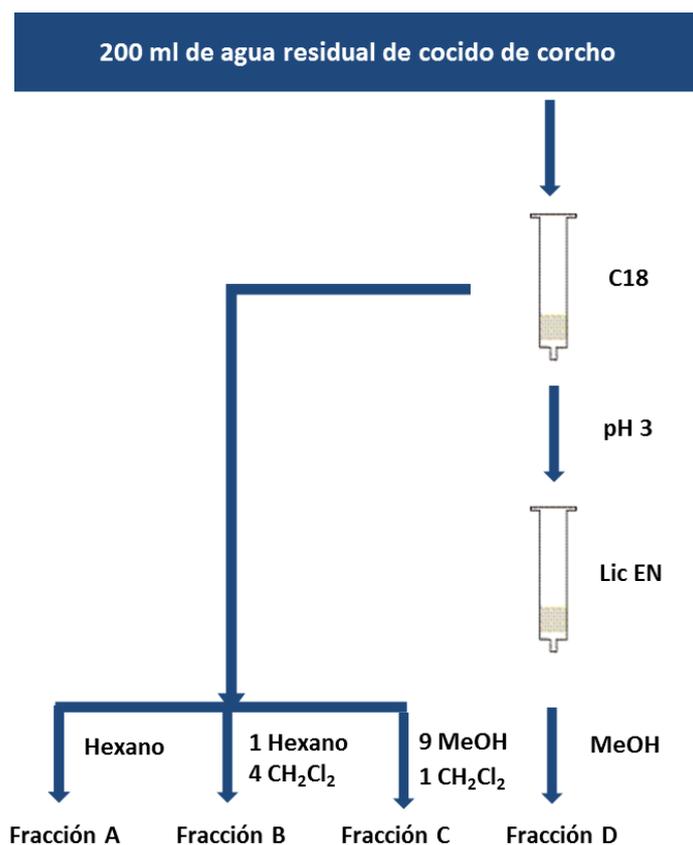


Figura II.8. Esquema de extracción SPE y SSPE utilizado para aguas residuales procedentes de la industria corchera.

II.3.3.1.2. Extracción en fase sólida dispersiva: método QuEChERS

Fundamento teórico

Los experimentos presentados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando como base la modificación EN 15662 del método QuEChERS, que consiste en la introducción de un tampón con sales de citrato en la primera etapa de extracción para ajustar el pH a valores de 5-5.5 donde la mayoría de los compuestos de interés presentan mayor estabilidad.

En este trabajo la etapa de “clean-up” se optimizó utilizando una mezcla típica de C18+PSA y dos materiales de reciente introducción, Zsep y Zsep+. El Zsep es un adsorbente basado en gel de sílice modificado con óxido de zirconio y el Zsep+ está compuesto de zirconio y C18 doblemente unidos sobre las mismas partículas de sílice. El C18 se une a las grasas a través de una interacción hidrofóbica, mientras que el

zirconio actúa como un ácido de Lewis, atrayendo compuestos con grupos dadores de electrones. Estas interacciones se pueden observar en la figura II.9.

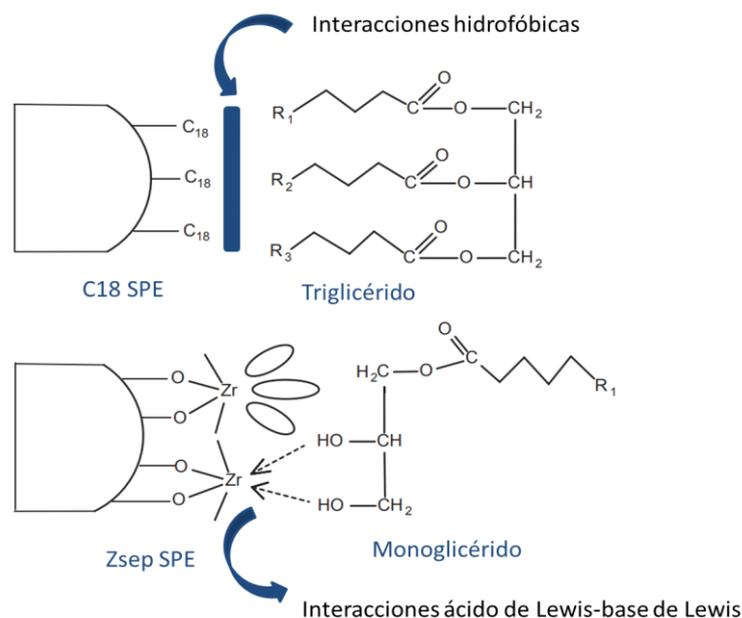


Figura II.9. Interacción de los adsorbentes C18 y Zsep con lípidos.

Procedimiento

En este estudio se utilizó el método QuEChERS para la extracción de plaguicidas en fangos activos procedentes de una industria agroalimentaria situada en Almería (España). Previo a la extracción, la fase sólida colectada de la depuradora de la industria agroalimentaria se congeló a $-50^{\circ}C$ y posteriormente se liofilizó durante 48 horas. La muestra se homogeneizó de forma manual en un mortero de ágata y se mantuvo a $-20^{\circ}C$ hasta que fue utilizada para la extracción. El procedimiento de extracción QuEChERS implicó una etapa de extracción y una segunda etapa de dSPE dispersiva en la que se probaron diferentes adsorbentes; a) C18 y PSA, b) Zsep y c) Zsep+.

Para la etapa de extracción se seleccionó una variante del método tradicional que implicaba el uso de tampón citrato basado en la obtención de buenos resultados en el uso de este método para la determinación de plaguicidas en suelos, sedimentos y aguas residuales de procedencia urbana. En cuanto la aplicación de esta metodología en muestras de fangos, Herrero y colaboradores (2014), realizaron una comparativa entre el método tradicional y esta variante utilizando citratos para la determinación de benzotriazol, benzotiazol y derivados de bencenosulfonamida. Aunque las diferencias

no fueron significativas en el uso de ambos métodos, el tampón citrato proporcionó mejores resultados con respecto al efecto matriz [Herrero y cols., 2014]. Por tanto, el uso de tampón citrato fue la opción seleccionada en este trabajo.

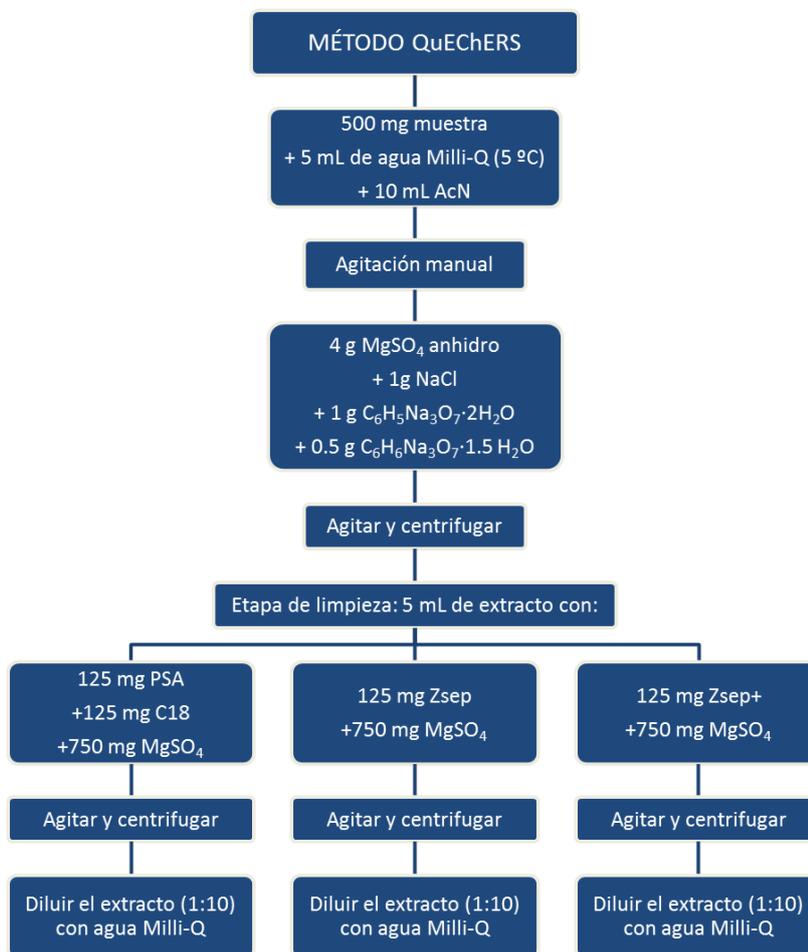


Figura II.10. Esquema del procedimiento de extracción QuEChERS aplicado a fangos de depuradora procedente de la industria agroalimentaria.

Para esta etapa de extracción se pesaron 500 mg de fango liofilizado y se transfirieron a un tubo de centrífuga de PTFE de 50 mL. A continuación se adicionaron 5 mL de agua Milli-Q (5°C) para hidratar la muestra. El tubo de PTFE se agitó en un vortex durante un minuto. Después, se añadieron 10 mL de ACN y la muestra se agitó vigorosamente y de forma manual durante 10 minutos. Posteriormente se añadió un paquete comercial de extracción “SupelTMQuE Citrate” (Supelco, Bellefonte, PA) descrito previamente, conteniendo citrato sódico dibásico sesquihidratado, citrato de sódico tribásico dihidratado, cloruro sódico y sulfato magnésico anhidro. A continuación la muestra se agitó durante 10 minutos de forma manual y el extracto se centrifugó durante 5 minutos

a 4000 r.p.m. Para la segunda etapa de dSPE dispersiva se separó una alícuota de 5 mL de sobrenadante y se transfirió a un tubo de PTFE de 15 mL conteniendo 750 mg de sulfato magnésico anhidro y a) 125 mg de PSA y 125 mg de C18; b) 125 mg de Zsep, c) 125 mg de Zsep+. El extracto se agitó en un vortex durante 60 segundos y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 4000 r.p.m. Finalmente, 100 µL del extracto se diluyeron con agua (1:10) para el posterior análisis LC-MS/MS. Antes del análisis, las muestras se filtraron con un filtro de PTFE de 0.45 µm (Millex FG, Milli-pore, Milford, MA, USA). En la figura II.10 se puede ver un esquema del proceso.

II.3.3.2. Analizador de triple cuadrupolo/Trampa de iones lineal (Q-TRAP)

Fundamento teórico

El analizador de triple cuadrupolo (Q-TRAP) consta de una configuración de tres cuadrupolos (Q1, Q2 y Q3, denominada QqQ) simples situados de forma secuencial, de forma que el primero y el último (Q1 y Q3) actúan como cuadrupolos normales, mientras que el Q2 se denomina celda de colisión. Existen diferentes configuraciones según el modo de actuar de los cuadrupolos, ofreciendo una gran versatilidad de operación (figura II.11). Las configuraciones más importantes se detallan a continuación:

- Barrido de iones (Full Scan): Todas las moléculas ionizadas llegan al detector a través de un barrido de iones en Q1, no actuando Q2 ni Q3 en el proceso.
- Adquisición de un ion seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM): Este modo de adquisición está dirigido a la medida de un solo ión, que se selecciona en Q1. En este caso Q2 y Q3 no intervienen en el proceso.
- Adquisición de la reacción seleccionada (Selected Reaction Monitoring, SMR): En este modo se monitoriza una transición concreta, es decir, se produce la fragmentación de un determinado ión precursor en Q1. Posteriormente en la celda de colisión (Q2) se aplica una energía determinada para fragmentar ese ión, y el último cuadrupolo (Q3) selecciona un ión producto concreto del precursor seleccionado.
- Barrido de iones producto (Product Ion Scan): En este caso se produce un barrido de iones en Q1 con una m/z concreta, denominado ión precursor. Este ión precursor

se fragmenta con una energía de colisión determinada en Q2 y todos los fragmentos generados (iones producto) son detectados.

La adquisición SRM es el modo más usual de trabajo en estos equipos, ofreciendo una alta selectividad y sensibilidad en los analitos de interés, minimizando al máximo la presencia de interferentes.

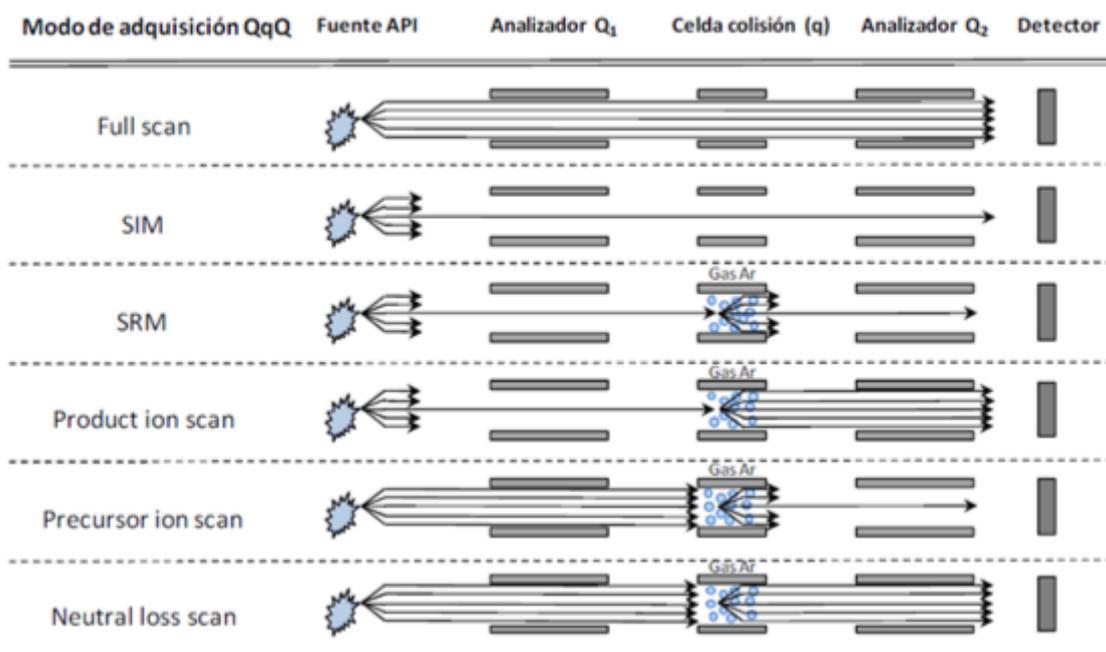


Figura II.11. Esquema de modos de adquisición permitidos en un instrumento QqQ.

Fuente: Grimalt Brea, S. (2009). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal.

Procedimiento:

El desarrollo de un estudio de validación de un método para la detección y cuantificación de una serie de plaguicidas (descritos en la sección II.3.2) presentes en fangos activos de una EDAR que trata aguas de procedencia industrial (industria agroalimentaria), se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo/trampa de iones lineal (sistema 5500 Q-TRAP[®] LC-MS-MS, AB Sciex Instrument, Foster City, CA). Para la separación cromatográfica se utilizó un sistema HPLC (serie 1200, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipado con una bomba binaria, un desgasificador y un

automuestreador (figura II.12). El sistema cromatográfico se conectó al analizador de masas mediante una interfase en electrospray (ESI) operando en modo de ionización positivo. Para el análisis se seleccionó una columna cromatográfica tipo C18 de fase reversa de 150 mm x 4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula (Agilent Zorbax Eclipse Plus). Los datos fueron analizados utilizando como software Analyst 1.5.1 y reprocesados utilizando MultiQuant 3.0.1 (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canadá).



Figura II.12. Sistema 5500 Q-TRAP[®] LC-MS-MS utilizado.

Una vez seleccionado el equipo de trabajo, las muestras procedentes de una etapa previa de extracción (descrita en la sección II.3.3.1) se introdujeron en el muestreador automático del mismo y se procedió al análisis. La fase móvil seleccionada fue ACN y agua Milli-Q acidificada con un 0.1% de ácido fórmico. El flujo se mantuvo constante durante todo el análisis a 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μL . El gradiente de fase móvil seleccionado se muestra en la figura II.13.

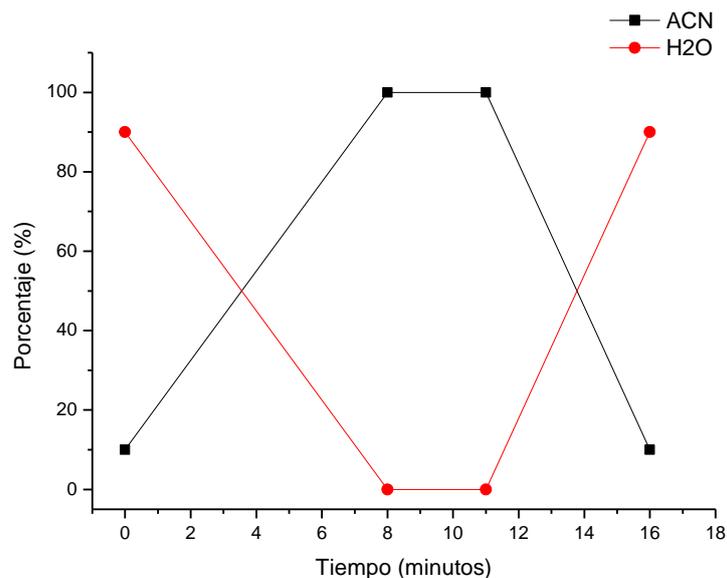


Figura II.13. Gradiente cromatográfico utilizado en el análisis LC-MS-MS.

Los parámetros de operación, incluida la optimización de dos transiciones SMR para cada analito, así como el potencial de defragmentación (DP, declustering potential), potencial de entrada (EP, entrance potential), energía de colisión (CE, collision energy) y el potencial de salida de la celda de colisión (CXP, Collision Cell Exit Potential) fueron ajustados mediante la infusión individual de patrones analíticos (compuestos objeto de estudio) en metanol a una concentración de 10 µg/L.

II.3.3.3. Analizador triple cuadrupolo / tiempo de vuelo (Q-TOF)

Fundamento teórico

Un analizador de tiempo de vuelo (TOF) se basa en el hecho que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren diferentes velocidades según su relación m/z , por tanto, tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia (tubo de vuelo). Las velocidades dentro del tubo varían inversamente proporcional a sus masas, así, los iones de masas más pequeñas llegan antes que las más pesadas. Esto requiere que los iones que llegan continuamente procedentes de la interfase sean enviados al TOF mediante un pulso, lo cual se consigue mediante la aceleración ortogonal de los mismos. Así, estos analizadores operan en modo discontinuo, ya que es necesario esperar a que los iones lleguen al detector antes de volver a lanzar otro pulso de iones. En los últimos tiempos,

el desarrollo tecnológico y la diversidad de equipos, permite la utilización de este tipo de detector para la obtención de masa exacta de los iones detectados. Para ello los equipos tienen que estar en continua calibración, permitiendo la asignación de una fórmula molecular concreta a cada ión con errores bajos.

Estos equipos tienen un coste elevado y por lo general presentan menor sensibilidad en comparación a los analizadores QTRAP, por tanto se han aplicado menos al análisis ambiental. Sin embargo, la preocupación por la determinación de compuestos desconocidos en muestras complejas, así como la determinación de metabolitos y productos de transformación que se generan en los tratamientos de aguas, han promovido un crecimiento exponencial de la aplicación de esta tecnología en estos campos. A modo de ejemplo, esta técnica ha sido aplicada con resultados satisfactorios en análisis de plaguicidas y metabolitos en aguas subterráneas y superficiales [Maizels y Budde, 2001].

Procedimiento:

Los análisis LC-ESI-QTOF-MS se realizaron en un sistema Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, Triple TOF 5600+ System (AB Sciex, Concord, ON, Canadá), trabajando en modo Full Scan y MS/MS simultáneamente (figura II.14).



Figura II.14. Sistema LC-ESI-QTOF-MS utilizado en este trabajo.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna analítica Poroshell 120 EC-C18 (2.7 μm , 4.6 x 50 mm). Las fases móviles fueron agua Milli-Q con ácido

fórmico al 0.1% (A) y ACN (B). Se programó un gradiente lineal que comenzó en un 10% de B (manteniéndose durante 1 minuto) y aumentó linealmente hasta un 100% de B en 9 minutos (esquema mostrado en la figura II.15). El gradiente se mantuvo durante 4 minutos y el tiempo de reequilibrio a las condiciones iniciales fue de 8 minutos. El volumen de inyección se fijó en 20 μ L y el caudal fue de 0.5 mL/min. Para el procesamiento de datos se utilizaron tres softwares AB SCIEX (PeakView TM 2.2, MasterView 1.1 y Markerview® V1.2.1).

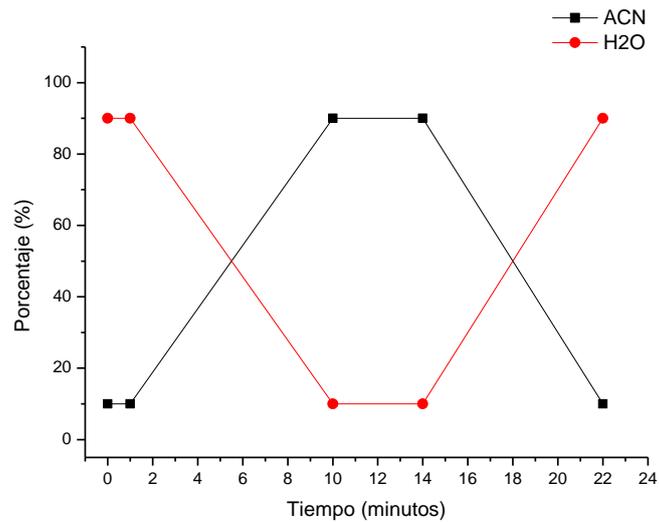


Figura II.15. Gradiente cromatográfico utilizado en el análisis LC-ESI-QTOF-MS.

II.4. Resultados y discusión

II.4.1. Determinación de plaguicidas en fango activo utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Este trabajo se basó en el desarrollo de una metodología para la determinación de una serie de plaguicidas previamente seleccionados (tabla II.1) en fangos activos de depuradora. Para ello se realizó un estudio analítico de validación basado en una extracción tipo QuEChERS y una posterior detección utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

II.4.1.1. Criterios de selección del tipo de fango activo para el desarrollo de la metodología

Para el estudio se seleccionaron dos tipos diferentes de fangos activos de depuradora, el primero de ellos procedente de una industria agroalimentaria y el segundo procedente de una EDAR convencional (aguas residuales urbanas). Los estudios de validación de una metodología apropiada para esta determinación se realizaron utilizando el fango activo de la industria agroalimentaria debido a que se trata de una matriz más compleja. Esta industria se encuentra situada en la provincia de Almería y fabrica productos con frutas y verduras de temporada durante todo el año. Estos productos incluyen zumos, cremas de verduras y sopas. El agua residual generada (con una producción anual de 134000 m³) se trata “in situ” utilizando un reactor biológico que opera en modo discontinuo (“SBR”, Sequencing Batch Reactor) y en ciclos de 8 horas. Cada ciclo incluye una etapa de alimentación con una duración de una hora y otra de aireación-reacción que tiene una duración de 4 horas. Después de esta fase, el flujo de aire se para durante 3 horas para permitir la sedimentación del fango activo y la fase de desnitrificación de forma conjunta. Finalmente se eliminan 10 m³ de fangos activos previamente a la recarga del reactor con objeto de mantener la edad del fango deseada en el sistema. En la industria se realizan tres ciclos diarios dando lugar al tratamiento de unos 500 m³ al día.

La optimización obtenida (estudio de validación) para este tipo de agua compleja se aplicó para la determinación de los mismos plaguicidas en fangos activos procedentes de una EDAR urbana de Almería. Dicha planta tiene una producción anual de aproximadamente 11.600.000 m³ y utiliza el mismo sistema SBR que la industria agroalimentaria.

II.4.1.2. Optimización de parámetros LC-MS/MS

Con el objetivo de obtener la máxima sensibilidad para la identificación y cuantificación de los plaguicidas objeto de estudio, se realizó una minuciosa optimización de los parámetros MS/MS. Para ello se prepararon estándares de cada uno de los plaguicidas en metanol y a una concentración de 10 µg/L y se inyectaron de forma individual en el analizador de masas. Se seleccionaron dos transiciones (SRM) para cada compuesto, la primera de ellas (SMR1) se utilizó para la cuantificación del compuesto y la segunda (SMR2) se utilizó para confirmar que se trataba del compuesto de interés. Se trabajó bajo ionización positiva y los modos de trabajo para los cuadrupolos Q1 y Q2 fueron “Low” y “Unit” respectivamente.

Para cada compuesto se estudiaron por separado los parámetros de operación, incluyendo el potencial de exclusión (DP, “Declustering Potential”), el potencial de entrada (EP “Entrance Potential), energía de colisión (EC, “Collision Energy”) y el potencial de salida de la celda de colisión (CXP, Collision Cell Exit Potential). Las transiciones seleccionadas, así como la optimización de los parámetros de operación para cada plaguicida se muestran en la tabla II.2.

Tabla II.2. Parámetros para las condiciones óptimas de análisis Q-TRAP/MS para los compuestos estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ion precursor (m/z)	DP (V)	SRM1	EC(V)	SRM2	CE(V)
Acetamiprid	8.47	223	100	126.1	28	56	30
Carbendazima	6.56	192	100	160.1	27	132	41
Dimetoato	8.49	230	100	199.1	15	171.2	20
Imazalil	8.23	297.8	125	255.9	24	158.9	34
Imidacloprid	8.35	256	100	175.1	27	209.1	35
Myclobutanil	11.28	289.1	100	70	23	125.1	46
Pirimicarb	7.85	239	100	72.1	38	182.1	23
Procloraz	11.35	378.1	100	310	16	268	22
Propamocarb	6.23	189.1	100	101.9	25	144.1	16
Pirimetamil	10.75	200.1	100	107	33	82.1	34
Tiabendazol	6.72	202	100	175.1	36	131.1	45

* DP, Potencial de exclusión (V); EC, energía de colisión; potencial de entrada, 10 V; CXP, potencial de salida de la celda de colisión, 4V.

II.4.1.3. Optimización del método de extracción QuEChERS utilizando diferentes adsorbentes como etapa de limpieza

En general, el análisis de fango activo de depuradora conlleva dificultades debido a la complejidad de la matriz. Por tanto, hay que optimizar una técnica de extracción que sea efectiva para reducir el “efecto matriz”. Para ello es fundamental la etapa de preparación de la muestra. Con este objetivo, se aplicó un procedimiento de extracción QuEChERS. Este procedimiento incluyó una etapa de limpieza o “clean-up”, donde se seleccionaron tres adsorbentes comerciales diferentes (C18+PSA, Zsep y Zsep+) para la minimización de posibles interferencias. La selección de estos materiales se basó en resultados favorables encontrados en literatura, presentando reducción de interferencias con la matriz en muestras con alto contenido en lípidos como aguacate y almendras [Rajski y cols., 2013]. La utilización de Zsep+ para la determinación de una serie de compuestos en una depuradora urbana convencional también presentó un efecto matriz menor del 20% para la mayoría de compuestos estudiados [Herrero y cols., 2014].

La optimización del método de extracción se evaluó mediante la determinación de las recuperaciones. Para ello, los extractos del fango de la industria agroalimentaria se fortificaron con los plaguicidas objeto de estudio y se aplicó todo el procedimiento analítico descrito en la sección II.3.3.1.2. Los resultados de recuperación obtenidos utilizando los tres adsorbentes seleccionados se muestran en la figura II.16.

En este estudio, las tres metodologías fueron capaces de extraer todos los plaguicidas objeto de estudio, con recuperaciones comprendidas entre el 76% y 118% para C18+PSA, del 71% al 95% para Zsep y del 56 al 117% para Zsep+. Zsep proporcionó una menor recuperación para imidacloprid (71%) y miclobutanil (76%). Por otro lado las recuperaciones para tiabenzadol e imazalil utilizando Zsep+ fueron bajas (56% y 65% respectivamente), por lo que se seleccionó como mejor opción para el estudio el C18+PSA como adsorbente en la etapa de “clean-up”.

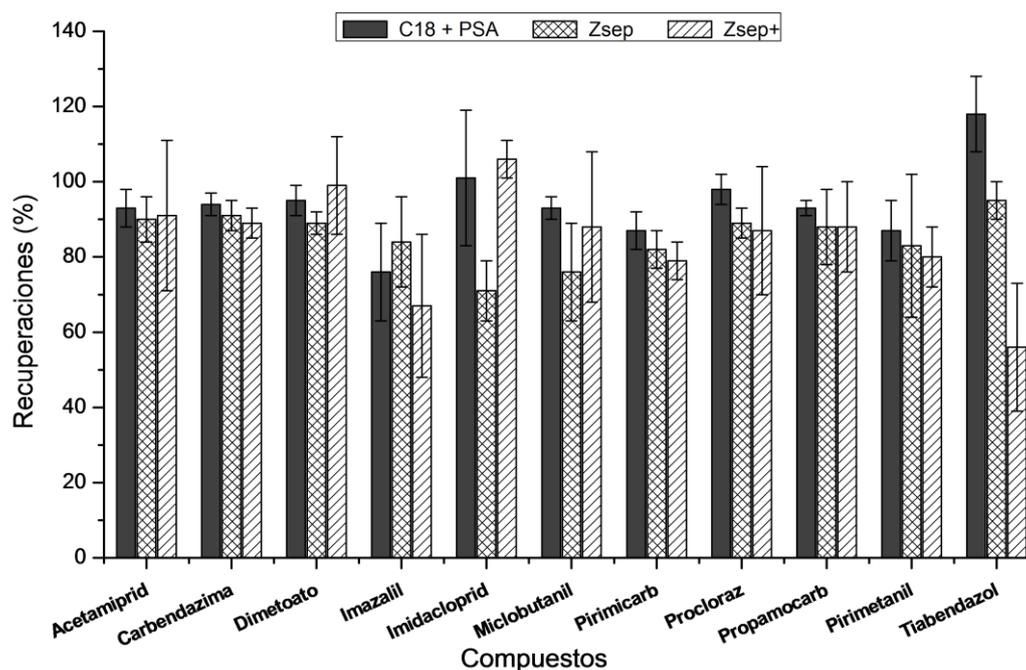


Figura II.16. Recuperaciones obtenidas en la extracción de fangos de depuradora fortificados y extraídos mediante el método QuEChERS con los tres adsorbentes seleccionados (C18+PSA, Zsep y ZSep+).

La eficiencia de la etapa de limpieza también se evaluó en términos de “efecto matriz”. Para ello se realizó una comparativa de las pendientes de las curvas de calibración preparadas en disolvente (compuestos preparados en la fase móvil agua/ACN (90:10)) y las curvas correspondientes obtenidas mediante la utilización de los extractos de fango con los tres adsorbentes propuestos. Para el cálculo del efecto matriz se utilizó la siguiente ecuación:

Efecto matriz, EM (%)

$$= \left(\frac{\text{Pte de la curva de calibración en matriz}}{\text{Pte de la curva de calibración en disolvente}} - 1 \right) * 100$$

Ecuación. II.1.

En todos casos el rango lineal expresado como coeficiente de regresión fue mayor al 0.998. Dependiendo del porcentaje de efecto matriz obtenido (EM, en valor absoluto |EM|) mediante el uso de esta ecuación, se pueden observar diferentes efectos en las muestras. Un porcentaje inferior al 20% puede considerarse irrelevante, ya que la

variación es cercana a los valores de repetibilidad de un método analítico. Sin embargo, un valor superior al 50% se considera un fuerte efecto matriz [Lozano y cols., 2016].

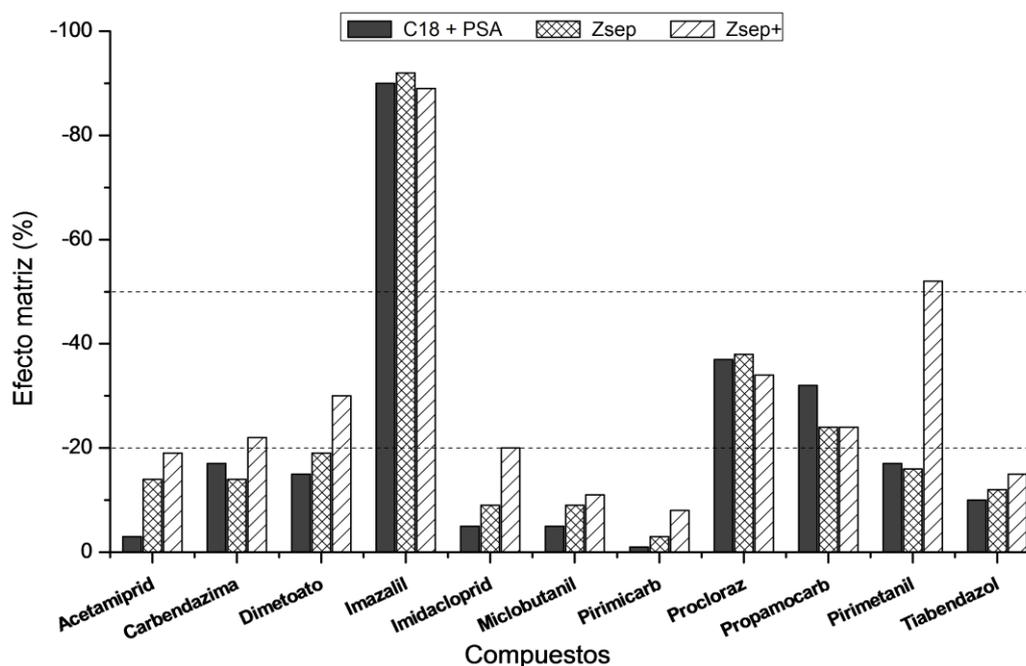


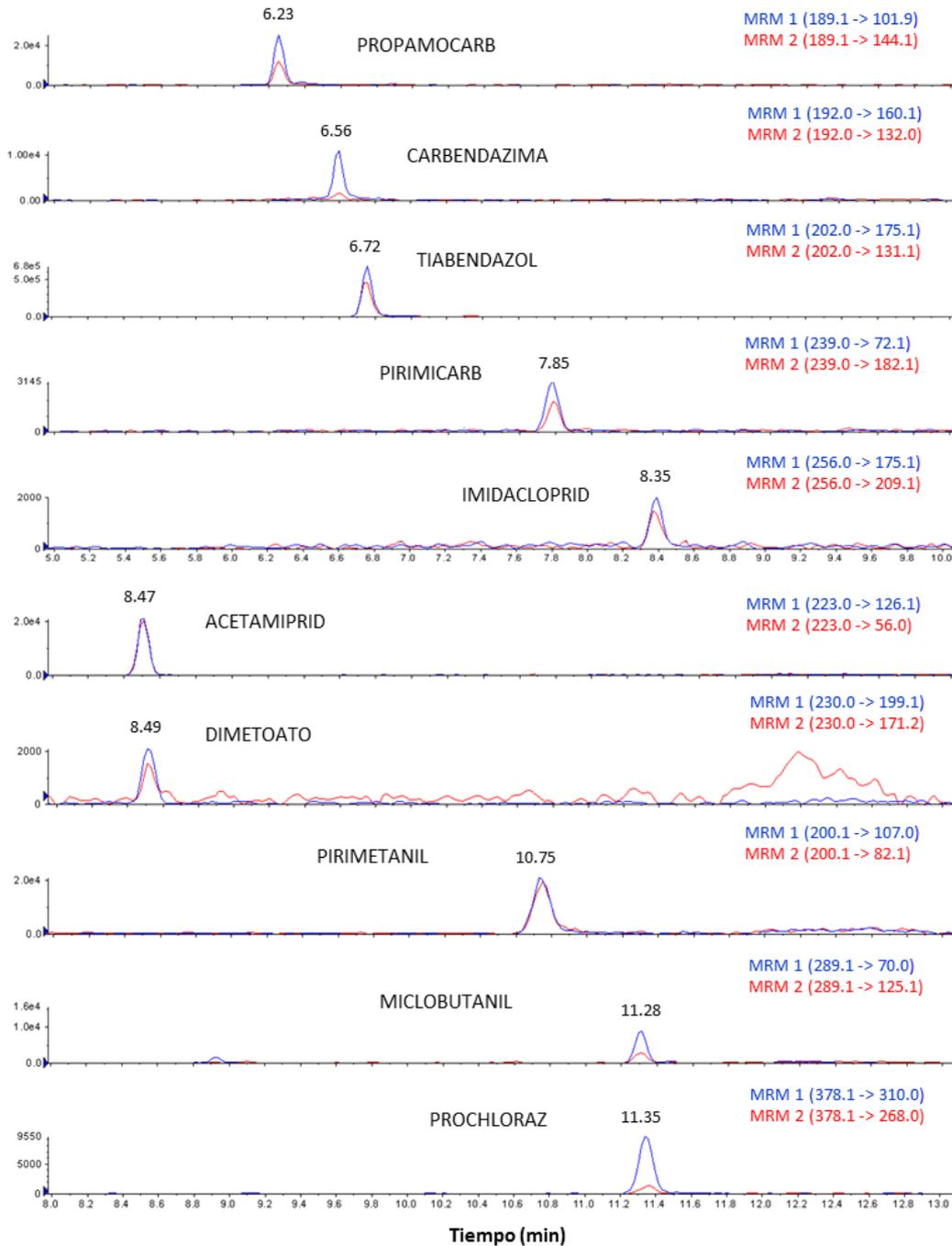
Figura II.17. Efecto matriz obtenido en la extracción de fangos de depuradora fortificados y extraídos mediante el método QuEChERS con los tres adsorbentes seleccionados (C18+PSA, Zsep y ZSep+).

Los resultados obtenidos en el estudio de efecto matriz para los plaguicidas analizados se muestran en la figura II.17. No se encontraron diferencias significativas entre los tres adsorbentes analizados. El efecto matriz fue menor al 20% en la mayoría de plaguicidas, mostrando los valores más bajos en el método utilizando PSA+C18 y Zsep. Los compuestos procloraz y propamocarb presentaron un efecto matriz medio con valores del 24% al 38% en ambos adsorbentes. Sin embargo, el imazalil presentó un fuerte efecto matriz en todos los casos. No se encontró ninguna explicación sobre el comportamiento de este compuesto en función de sus propiedades químicas, ya que tanto pK_{ow} (2.63) como el tiempo de retención (8.23) están en el rango medio en comparación con los demás compuestos. Por tanto, este fuerte efecto matriz podría sólo explicarse por la presencia de una interferencia de la matriz (otro compuesto desconocido) que coeluiría al mismo tiempo de retención que el compuesto de interés, compitiendo con el analito en la formación de iones en la fuente de ionización ESI. En

este trabajo esta hipótesis no pudo demostrarse mediante análisis de muestras en blanco, ya que el imazalil estuvo presente en todas las muestras analizadas durante este estudio.

Debido a la detección de este fuerte efecto matriz para imazalil, se aplicaron otras condiciones cromatográficas (cambios de gradiente o diferentes eluentes), sin embargo, la separación de este compuesto de la interferencia de la matriz no fue posible. Como alternativa y con el objetivo de mejorar el rendimiento cuantitativo de este compuesto, se adquirió un patrón interno marcado isotópicamente (imazalil-d₃). Sin embargo, el gran efecto matriz no se consiguió corregir. Por tanto, se decidió eliminar el imazalil del estudio de validación. Este no es un caso aislado, ya que diversos autores han publicado efectos matriz altos en muestras de fangos utilizando otros procedimientos de análisis [Tadeo y cols., 2010; Ghanem y cols., 2008; García-Varcácel y cols., 2009; Baugros y cols., 2009], lo que confirma que el fango activo de depuradora es una matriz altamente compleja con una composición muy variable. En consecuencia, la matriz de fango puede contener productos que afectan significativamente a la señal analítica. La reducción del efecto matriz en las muestras seleccionadas también se consiguió mediante el uso de una cantidad de muestra baja (500 mg) y la dilución 1:10 (ACN: H₂O) del extracto previa al análisis cromatográfico. La dilución es una práctica común en determinación de residuos de plaguicidas en alimentos [Rajski y cols., 2013].

En la figura II.18 se muestra la separación cromatográfica de los fortificados utilizados para el estudio de recuperaciones y efecto matriz. Teniendo en cuenta la extracción y la eficacia del método de limpieza, los resultados globales fueron mejores para el método que utiliza PSA+C18. Por tanto este procedimiento fue el seleccionado para los estudios de validación.



*La concentración de los fortificados se mostrará en apartados posteriores (tabla II.3).

Figura II.18. Cromatograma de fango activo procedente de la industria agroalimentaria fortificado con todos los plaguicidas.

II.4.1.4. Optimización de un método SPE para la extracción del sobrenadante de fangos activos

Para cumplimentar el estudio, se propuso una metodología para la evaluación del sobrenadante del fango activo procedente de la industria agroalimentaria. El objetivo fue establecer una correlación entre las concentraciones de plaguicidas tanto en los lodos (fase sólida) como en la fase líquida (sobrenadante).

Para ello, se seleccionó un método de extracción en fase sólida (descrito en la sección II.3.3.1.1). Al igual que en el apartado anterior (extracción QuEChERS), la optimización del método se evaluó mediante la determinación del valor de recuperaciones y efecto matriz mediante la fortificación de las muestras. En todos los casos las recuperaciones se mantuvieron en un rango entre el 90% y 120% y el efecto matriz fue menor del 11%. Estos resultados indicaron el buen funcionamiento del método de extracción seleccionado.

II.4.1.5. Estudio de validación (Rango lineal, efecto matriz, recuperación, límite de cuantificación, repetitividad y reproducibilidad en muestras)

El principal objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. [Guideline for Industry, Text on Validation of Analytical Procedures, 1995]. Para ello un procedimiento analítico debe tener la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que cabe esperar que estén presentes en la matriz seleccionada. Es de vital importancia la forma de realizar el análisis ya que cualquier cambio en el análisis nos conduciría a una situación en el que la validación no sería correcta. Por tanto hay que seguir unas pautas de validación. Tanto para los fangos de la industria agroalimentaria como para el sobrenadante del mismo, (matriz seleccionada en este trabajo), se realizó un estudio de validación en términos de linealidad, efecto matriz, recuperaciones, límites de cuantificación, precisión y exactitud.

La precisión de un procedimiento analítico expresa la similitud entre una serie de medidas obtenidas de diferentes alícuotas de la misma muestra en las condiciones establecidas. La precisión se mide en términos de repetitibilidad y reproducibilidad y se expresa como la desviación estándar de una serie de medidas.

Para la evaluación completa de todos los parámetros seleccionados, las muestras de fango activo de depuradora se fortificaron con cantidades conocidas de los plaguicidas objeto de estudio.

II.4.1.5.1. Validación en la fase sólida del fango utilizando la metodología QuEChERS como sistema de extracción

Una vez optimizada la etapa de extracción, se realizó un estudio completo de recuperaciones. Para ello, se seleccionaron dos niveles de concentración que difirieron en un orden de magnitud, con el objetivo de cubrir el rango de concentración de los compuestos de interés en muestras reales (ver tabla II.3). Por tanto, se pesaron 10 g de fango en un tubo de centrífuga de PTFE y se fortificaron con la mezcla apropiada de plaguicidas. A continuación la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la homogeneización, se tomaron alícuotas de 500 mg de fango y se procedió a la extracción de la muestra siguiendo la sección II.3.3.1.2. Las recuperaciones se determinaron como promedio de tres repeticiones de la extracción.

Estas recuperaciones se encontraron dentro del rango de 71-109% para el nivel bajo de concentración y entre 83-120% para el nivel más alto de concentración. Las recuperaciones más bajas fueron para el procloraz, pero aun así, la desviación estándar de las tres réplicas en todos los casos tuvo un coeficiente de variación inferior al 20%.

El rango lineal se obtuvo mediante el cálculo del coeficiente de regresión de las rectas de calibrado y en todos los casos se obtuvo un valor $R^2 \geq 0.998$. La precisión del método cromatográfico (expresado como desviación estándar relativa, RSD (%)) se evaluó mediante 5 inyecciones repetidas de las muestras fortificadas durante un mismo día (Interday), y mediante la inyección de las muestras durante 5 días consecutivos (Intraday). Los resultados mostraron una desviación estándar relativa menor del 20% en todos los casos.

Debido a que se encontraron plaguicidas en las muestras reales seleccionadas, los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon utilizando fangos reales. Para ello se seleccionó la primera transición optimizada para el MS/MS (SRM1) y se calculó la señal/ruido presente, determinando un valor de 10 como límite de cuantificación. Para compuestos que no dieron un resultado positivo en muestras reales, los límites de cuantificación fueron calculados evaluando la señal/ruido del primer punto de la recta

de calibrado en matriz. Los límites de cuantificación estuvieron en el rango de entre 0.4 ng/g para pirimicarb hasta 40 ng/g para dimetoato. Estos valores estuvieron en concordancia con datos previamente reportados en literatura [Masiá y cols., 2015]. Todos los resultados del estudio de validación se muestran en la tabla II.3.

Tabla II.3. Validación del método QuEChERS: Rango lineal, LOQ, recuperaciones a dos niveles de concentración y precisión.

Compuestos	Rango lineal, ng/g (R ²)	LOQ (ng/g)	Nivel bajo (ng/g)	Recuperaciones, % (RSD, %)	Nivel alto (ng/g)	Recuperaciones, % (RSD, %)	Precisión (RSD, %)	
							Mismo día	Días consecutivos
Acetamiprid	2-200 (0.999)	2	20	88 (11)	200	97 (2)	3	14
Carbendazima	2-40 (0.999)	2	4	109 (18)	40	86 (6)	7	14
Dimetoato	40-2000 (0.998)	40	50	95 (20)	500	89 (7)	16	20
Imidacloprid	6-600 (0.998)	6	60	90 (8)	600	94 (1)	5	12
Miclobutanil	1-2000 (0.999)	1	5	89 (5)	50	83 (2)	2	14
Pirimicarb	0.4-20 (0.998)	0.4	2	83 (8)	20	95 (2)	3	19
Procloraz	2-160 (0.998)	2	15	71 (11)	150	85 (4)	5	15
Propamocarb	1-100 (0.999)	1	10	88 (11)	100	120 (4)	5	10
Pirimetamil	10-100 (0.999)	10	20	80 (7)	100	88 (5)	2	17
Tiabendazol	6-600 (0.999)	6	10	100 (9)	100	95 (8)	12	16

II.4.1.5.2. Validación en el sobrenadante utilizando la tecnología SPE para la extracción de muestras

El estudio de validación del procedimiento SPE para el sobrenadante de fangos se evaluó siguiendo los mismos criterios que en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II.4.

El rango lineal expresado como coeficiente de regresión (R²) fue en todos casos mayor de 0.993. Los límites de cuantificación (considerando el factor de concentración de 5 procedente de la etapa de extracción) estuvieron en un rango entre 2 ng/L (tiabendazol) y 40 ng/L (imidacloprid). El valor de pre-concentración se seleccionó en función de la concentración de los plaguicidas esperada en muestras reales. La aplicación de altos valores de pre-concentración puede en la mayoría de los casos proporcionar valores de LOQ más bajos con efectos de matriz aceptables. Sin embargo, una dilución posterior de la muestra es necesaria si los compuestos no se encuentran en el rango lineal adecuado. Por otro lado, el uso de baja pre-concentración minimiza las interferencias de la matriz y puede mejorar la cuantificación a bajos niveles de concentración.

Tabla II.4. Validación del método SPE: Rango lineal, LOQ, recuperaciones a dos niveles de concentración y precisión.

Compuestos	Rango lineal, ng/g (R ²)	LOQ (ng/l)	Nivel bajo (ng/l)	Recuperaciones, % (RSD, %)	Nivel alto (ng/l)	Recuperaciones, % (RSD, %)	Precisión (RSD, %)	
							Mismo día	Días consecutivos
Acetamiprid	10-1000 (0.996)	10	100	94 (10)	900	95 (3)	5	15
Carbendazima	20-200 (1.000)	20	20	105 (15)	200	112 (5)	7	14
Dimetoato	10-1500 (1.000)	10	150	97 (19)	1500	105 (8)	10	19
Imidacloprid	40-3000 (0.999)	40	300	102 (2)	3000	104 (2)	4	19
Miclobutanil	10-300 (0.999)	10	20	105 (4)	200	107 (1)	4	13
Pirimicarb	5-100 (0.999)	5	10	95 (8)	100	90 (1)	4	16
Procloraz	5-800 (0.999)	5	70	104 (10)	700	120 (3)	3	16
Propamocarb	20-500 (0.998)	20	50	90 (10)	500	100 (4)	9	20
Primetanil	20-2000 (0.998)	20	50	99 (6)	500	97 (5)	7	18
Tiabendazol	2-800 (0.993)	2	20	100 (8)	200	110 (7)	5	15

Los valores de recuperación se obtuvieron como un promedio de tres réplicas a dos niveles de concentración que difieren en un orden de magnitud (ver tabla II.4). En este caso, alícuotas de 50 mL se fortificaron con 100 µL de una disolución de los plaguicidas objeto de estudio a una concentración adecuada. Las recuperaciones variaron en todos los casos entre 90 % (pirimicarb) y 120% (procloraz) con desviaciones estándar inferiores al 20% en todos los casos, confirmando el buen funcionamiento del método propuesto.

II.4.1.6. Aplicación a muestras reales utilizando fangos de una industria de cítricos y fangos procedentes de una EDAR

Para la realización de este estudio, se recolectaron muestras reales en diferentes periodos del año (mayo y octubre de 2016 y febrero de 2017). Este procedimiento también se aplicó a fangos activos procedentes de una depuradora urbana convencional para hacer una comparativa con respecto a ambas fuentes (muestreo realizado en mayo de 2016 y febrero de 2017).

Para ambas matrices, y siguiendo los criterios de estudio y validación de los métodos (tal y como se muestra en secciones anteriores), los criterios aplicados para la identificación de los plaguicidas en las muestras fueron:

- La adquisición de dos transiciones características para cada compuesto, donde los picos cromatográficos de ambos iones debían de superponerse completamente.
- El tiempo de retención y forma de pico coincidente con los obtenidos en los estándares de calibración con una tolerancia de ± 0.2 min.
- Misma abundancia relativa de las dos transiciones seleccionadas para la cuantificación y confirmación de los iones (MRM2/MRM1).

El cumplimiento de estos criterios fue necesario para una identificación adecuada de los analitos y así evitar los falsos positivos o falsos negativos en el análisis cuantitativo. La transición más intensa (MRM 1) se utilizó para la cuantificación y la segunda (MRM 2) se utilizó para la confirmación. Además se utilizó una curva de calibración realizada sobre la propia matriz para la cuantificación de los plaguicidas con el fin de minimizar efectos de la matriz y obtener resultados lo más precisos posibles. Las concentraciones de plaguicidas encontradas en los análisis se muestran en las tablas II.5 y II.6.

Tabla II.5. Concentración de plaguicidas en fangos activos de depuradora procedentes de una industria agroalimentaria (fase sólida y fase líquida).

FANGO DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA						
	Febrero 2017		Mayo 2016		Octubre 2016	
	Fango (s) (ngg ⁻¹)	Fase acuosa (ngL ⁻¹)	Fango (s) (ngg ⁻¹)	Fase acuosa (ngL ⁻¹)	Fango (s) (ngg ⁻¹)	Fase acuosa (ngL ⁻¹)
Acetamiprid	140	n.d.	40	140	40	15
Carbendazima	3	40	4	80	2	20
Dimetoato	n.d.	n.d.	n.d.	50	n.d.	n.d.
Imidacloprid	n.d.	380	n.d.	40	n.d.	40
Miclobutanil	8	n.d.	2	10	35	20
Pirimicarb	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prochloraz	5	n.d.	45	20	15	n.d.
Propamocarb	15	n.d.	15	25	5	n.d.
Pirimetanil	2400	80990	70	600	300	40
Tiabendazol	130	340	3000	640	590	35
CARGA TOTAL:	2702	81750	3176	1605	987	170

Tabla II.6. Concentración de plaguicidas en fangos activos de depuradora urbana convencional (fase sólida y fase líquida).

FANGO DE DEPURADORA URBANA				
	Febrero 2017		Mayo 2016	
	Fango (s) (ngg⁻¹)	Fase acuosa (ngL⁻¹)	Fango (s) (ngg⁻¹)	Fase acuosa (ngL⁻¹)
Acetamiprid	5	20	3	190
Carbendazima	6620	30	7	130
Dimetoato	n.d.	n.d.	n.d.	105
Imidacloprid	n.d.	240	n.d.	315
Miclobutanil	15	n.d.	n.d.	n.d.
Pirimicarb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prochloraz	160	5	n.d.	n.d.
Propamocarb	30	85	1	40
Pirimetanil	n.d.	110	n.d.	110
Tiabendazol	30	40	n.d.	55
CARGA TOTAL:	6860	530	11	945

La concentración de los plaguicidas detectados variaron con el periodo de muestreo (febrero, mayo y octubre), especialmente en los fangos activos procedentes de la industria agroalimentaria, ya que la actividad de la misma varía a lo largo del año, es decir, en cada periodo y estación del año el tipo de productos procesados es diferente, y por tanto los residuos y la actividad de la depuradora cambia. Según puede verse en las tablas II.5 y II.6, en general, las concentraciones más altas correspondieron a los plaguicidas detectados en fangos procedentes de la depuradora de la industria agroalimentaria, donde los valores de concentración detectados en las muestras variaron en un amplio rango de concentraciones, desde 0.9 ng/g para pirimicarb hasta 3000 ng/g para tiabendazol en el fango sólido y 10 ng/L de miclobutanil a 80990 ng/L para pirimetanil en la fase acuosa.

Respecto a la frecuencia de detección, algunos compuestos como dimetoato o pirimicarb sólo se detectaron eventualmente. Sin embargo otros compuestos como tiabendazol, pirimetanil, acetamiprid o carbendazima estuvieron presentes en la mayoría de las muestras analizadas. Es importante destacar las altas concentraciones de tiabendazol y pirimetanil en el fango sólido procedente de la industria agroalimentaria. Los resultados fueron coherentes ya que ambos compuestos son ampliamente utilizados

como fungicidas post cosecha en cultivos de cítricos, y la producción de zumo de naranja es una de las actividades más intentas en la industria agroalimentaria objeto de estudio. El compuesto que se encontró en concentraciones más altas en la fase acuosa de los fangos de la industria agroalimentaria fue el pirimetanil, alcanzando un máximo de 80990 ng/L en el muestreo llevado a cabo en febrero.

El tiabendazol se detectó en los fangos residuales de procedencia urbana, con concentraciones menores (0-30 ng/g). Esto concuerda con la bibliografía encontrada. García-Valcárcel y Tadeo en un estudio para evaluar la presencia de azoles en lodos de depuradora (2011) detectaron tiabendazol (7.2 ng/g) en una de las diecinueve EDAR urbanas analizadas. Estos autores además identificaron procloraz a concentraciones de 0.03 y 8.5 ng/g, menores a las encontradas en este estudio (hasta 163 ng/g) [García-Valcárcel y Tadeo, 2011]. El tiabendazol también se ha estudiado recientemente en 7 depuradoras urbanas en Alemania, donde no se encontraron trazas [Wluka y cols., 2016].

Derivados de azol (tiabendazol, procloraz y carbendazima) también fueron estudiados por Campo y colaboradores (2013) en un monitoreo realizado en 16 EDAR urbanas españolas [Campo y cols., 2013]. Los niveles medios en este estudio alcanzaron valores de 80 ng/g para tiabendazol, 17 ng/g para carbendazima y 6 ng/g para procloraz.

Por otro lado, los insecticidas neonicotinoides acetamiprid e imidacloprid también se detectaron en los dos tipos de fangos estudiados. Este grupo de compuestos tiene una especial importancia ya que están incluidos en la lista de sustancias sujetas a seguimiento por la Comisión Europea (Decisión de ejecución UE 2015/495) [Barbosa y cols., 2016]. El imidacloprid no se detectó en ningún caso en la fracción sólida de las muestras, pero sí en la fase acuosa a concentraciones de 40 a 380 ng/L. El uso de este compuesto se ha restringido recientemente debido a su efecto dañino en abejas [Ojeu y cols., 2013]. El acetamiprid se encontró principalmente en los fangos de la industria agroalimentaria (40-140 ng/g) y en una concentración mucho más baja en los fangos de procedencia urbana (0-5 ng/g). Sin embargo, no se ha encontrado referencias en literatura sobre la presencia de este compuesto en fangos de depuradora.

Otro compuesto relevante que mostró una contribución significativa a la contaminación fue el fungicida pirimetanil. Este compuesto se utiliza en agricultura y se clasifica como

contaminante orgánico persistente debido a su alta estabilidad química y fotoquímica, baja biodegradabilidad y fácil transporte en el medio ambiente. Las concentraciones encontradas en el fango activo de la industria agroalimentaria fueron de 70 a 2400 ng/g, mientras que en los fangos procedentes de la EDAR urbana no se detectó.

Por último, la comparación de la carga total de plaguicidas en los dos tipos de fango indicó que los fangos procedentes de la industria agroalimentaria acumulan una concentración mucho más alta de plaguicidas que los fangos urbanos, pudiendo ser una fuente puntual de contaminación.

II.4.2. Aplicación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para la búsqueda de compuestos desconocidos en aguas complejas

El objetivo del trabajo recogido en este apartado es el desarrollo de técnicas que permitan la identificación de compuestos desconocidos o “non-target” en muestras industriales complejas. Para ello, se seleccionó un agua residual compleja como es la procedente de la industria corchera. La composición de este tipo de aguas es parcialmente desconocida, y su vertido al medioambiente puede provocar grandes problemas en los ecosistemas. Además, debido a la alta complejidad de la matriz resulta muy complicada la identificación de contaminantes presentes en dicha agua residual.

II.4.2.1. Selección de una estrategia de extracción para el análisis de muestras complejas

La naturaleza de las aguas industriales, en concreto las aguas residuales procedentes de la industria de cocido del corcho, seleccionadas para este estudio, hace necesario la aplicación de una limpieza de matriz previa al análisis cromatográfico.

Con el fin de minimizar las interferencias presentes en los extractos y fraccionar los analitos en diferentes grupos según sus propiedades físico-químicas (rangos de polaridad), se seleccionó un método común de extracción de aguas industriales complejas propuesto por Castillo., y cols., 1999. Este método consistió en la utilización de la técnica de extracción SPE y SSPE descrita en la sección II.3.3.1.1.

El resultado de la utilización de este procedimiento fue la separación en 4 grupos de los componentes esenciales de la muestra (Fracciones A, B, C y D) en orden de polaridad creciente. Por tanto, según las características de los eluentes utilizados en el proceso (Hexano para fracción A, Diclorometano/hexano 4:1 v/v para fracción B, MeOH/diclorometano 9:1 para la fracción C y MeOH para la fracción D), la fracción D sería la fracción más polar y la fracción A la menos polar.

A continuación, la muestra percolada se acidificó a un pH de 3 y se pasó por el cartucho Lic EN a un caudal de 10 mL/min (fracción D). Para la desorción del cartucho C18 se utilizaron diferentes disolventes en serie con el fin de obtener fracciones con diferentes polaridades; 2 x 5 mL de hexano para la fracción A, 2 x 5 mL de diclorometano/hexano

(4:1 v/v) para la fracción B y 2 x 5 mL de MeOH/diclorometano (9:1 v/v) para la fracción C. Un esquema sobre el procedimiento se muestra en la figura II.8.

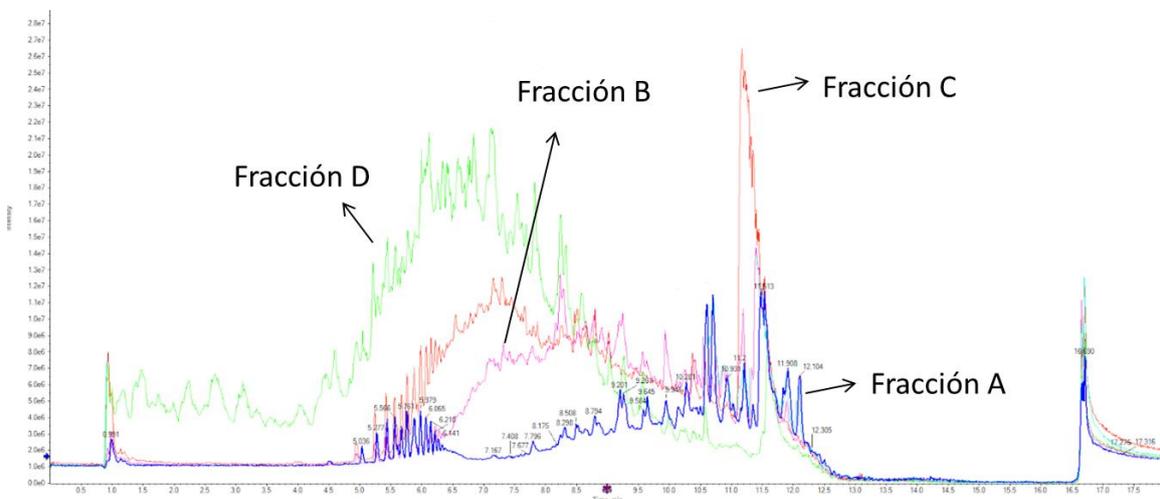


Figura II.19. Cromatograma obtenido tras la extracción de las diferentes fracciones del ARC seleccionada.

Como puede observarse en la figura II.19, la estrategia de extracción seleccionada resultó efectiva, dando perfiles cromatográficos diferentes, y por tanto compuestos químicos diferentes en cada fracción.

II.4.2.2. Estrategia para la monitorización de compuestos desconocidos mediante LC-Q-TOF/MS. Evaluación cualitativa

El uso de técnicas de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) permite el procesamiento de datos para considerar posibles compuestos desconocidos en una mezcla o durante un determinado tratamiento. Para ello, la determinación del número total de picos válidos LC-MS permite una búsqueda simple de información que podría representar masas exactas de compuestos desconocidos dentro de aguas industriales complejas, en este caso aguas residuales procedentes de la industria corchera.

Con este objetivo se aplicó un algoritmo para la generación de cromatogramas de iones extraídos (XIC) y búsqueda de picos elementales potenciales en muestras procedentes de ARC después del proceso de extracción (SSPE) seleccionado. Para ello se inyectó una muestra control (acetonitrilo) y se realizó una comparativa de las aguas residuales industriales objeto de estudio con dicha muestra, seleccionando solamente aquellos

picos que cumplieran los criterios que se listan a continuación con el objetivo de eliminar interferencias:

- Una señal 10 veces mayor que la muestra control.
- Picos con una intensidad superior a 2000 cuentas y una señal/ruido mayor de 20.
- Precisión de masa menor de 5 ppm.
- Relación de patrones isotópicos con diferencias inferiores al 10%,
- Fragmentación MS/MS de los picos seleccionados.

Con todo ello se obtuvieron espectros en modo FullScan de masa exacta y simultáneamente se utilizó un IDA para recoger los espectros MS/MS de los picos más abundantes en los cromatogramas.

El resultado fue una serie de picos LC-MS relevantes que corresponderían con los componentes del agua industrial objeto de estudio. Un total de 2187 picos fueron detectados, de ellos, aproximadamente un 13% corresponderían a la fracción A, un 26% a la fracción B, un 24% a la C y un 37% a la D (figura II.20). Por tanto, debido a la diferencia de polaridad de las muestras, se observó que los compuestos mayoritarios serían los de mayor polaridad, y los minoritarios los de menor polaridad.

Aunque se trata de una técnica sencilla, podría ayudar, a grandes rasgos, al control de un determinado tratamiento para la descontaminación de aguas residuales industriales, permitiendo la evaluación cualitativa de los procesos aplicados. Esta técnica implicaría la extracción fraccionada de varias muestras a lo largo de un tratamiento seleccionado. La reducción en cuanto al número de picos podría indicar la eficiencia del tratamiento elegido.

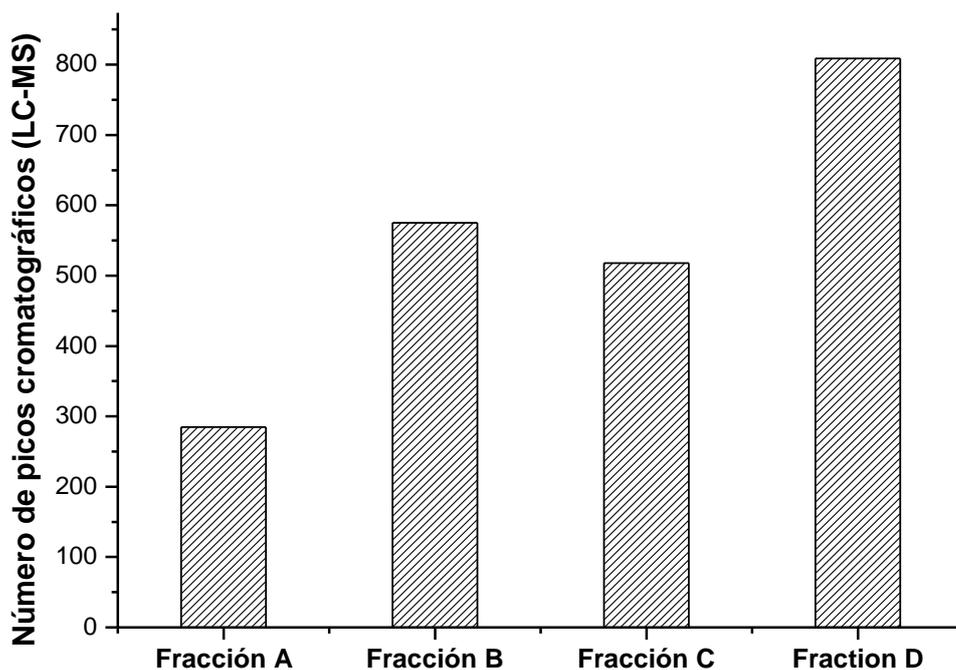


Figura II.20. Número de picos cromatográficos detectados para ARC extraída de forma fraccionada. La polaridad de los compuestos extraídos en cada fracción está ordenada de menor a mayor (A, B, C, y D).

II.4.2.3. Optimización de técnicas estadísticas “ómicas” para la búsqueda de marcadores en muestras complejas

Para establecer una estrategia de análisis de muestras complejas utilizando la metodología PCA descrita en la sección II.1.2.4, los cromatogramas obtenidos mediante el análisis LC-HRMS se importaron en el software MarkerView® versión 1.2. Los parámetros de búsqueda, filtración y alineación de máximos seleccionados aseguraron que se pudieran comparar todas las masas detectadas en las muestras analizadas, compensando variaciones menores en la relación masa/carga (m/z) y en el tiempo de retención. Los criterios de búsqueda seleccionados fueron los siguientes:

- Tolerancia máxima de tiempo de retención de 0.25 minutos.
- Tolerancia en masa de 10 ppm.
- Umbral de ruido de 150.

➤ Número máximo de picos de 10000.

En concordancia con los criterios seleccionados para la cromatografía, el tiempo de retención mínimo y máximo seleccionado fue de 0.8 y 16 minutos respectivamente. Se realizaron 5 inyecciones de cada muestra para minimizar los falsos positivos.

Después de realizar el pre-tratamiento de datos con estos parámetros, se realizó el PCA y se obtuvo el gráfico de clasificación, donde se muestra la agrupación entre varias muestras (figura II.21) y el gráfico de influencia, donde los iones de varias masas se grafican en función de su influencia en cada variable PCA (figura II.22).

La variabilidad del método se evaluó mediante el análisis de las 5 réplicas inyectadas, con el fin de obtener datos estadísticamente significativos. Además para el análisis PCA, se seleccionó como sistema de ponderación y escalado de datos el logarítmico y pareto respectivamente. Actualmente, la escala pareto es uno de los enfoques de datos más utilizados, utilizando la raíz cuadrada de la desviación estándar como factor de escala [Courant y cols., 2009; Antignac y cols., 2011]. El algoritmo de alineación de picos clasificó todas las señales en tres tipos: a) monoisotópicos (picos que muestran un ión molecular con un patrón isotópico reconocible); b) isotópicos (picos que tienen algunos isótopos reconocibles de un patrón pero no se encuentra un ión monoisotópico) y c) otros picos (picos que simplemente pasan las condiciones de alineación, pero no fue posible identificar ninguna otra característica reconocible). Con el fin de simplificar el análisis, sólo se tomaron en cuenta las masas monoisotópicas [Boccard y cols., 2010].

El análisis de PCA de todas las fracciones obtenidas resultó útil para verificar la disposición de las muestras y analizar su agrupamiento. El resultado del PCA indicó que los dos componentes principales para los que se organizan las muestras podrían explicar el 81.4% de su variación (50.2% PC1 y 31.2% PC2). Se observó además un estrecho agrupamiento de las 5 réplicas analizadas para cada fracción, demostrando la reproducibilidad del sistema (figura II.21).

En la gráfica de clasificación de muestras se puede observar que las fracciones A y B (fracciones de menor polaridad) mostraron una correlación en PC1 y PC2, por tanto podrían tener características comunes o compuestos similares. Las fracciones C y D mostraron una cierta similitud en PC2 mientras que en PC1 se mostraron muy diferentes y a su vez diferentes al resto de las muestras. Por tanto, este procedimiento resultó ser

útil para la identificación de similitudes/diferencias entre las diferentes fracciones desde un punto de vista global.

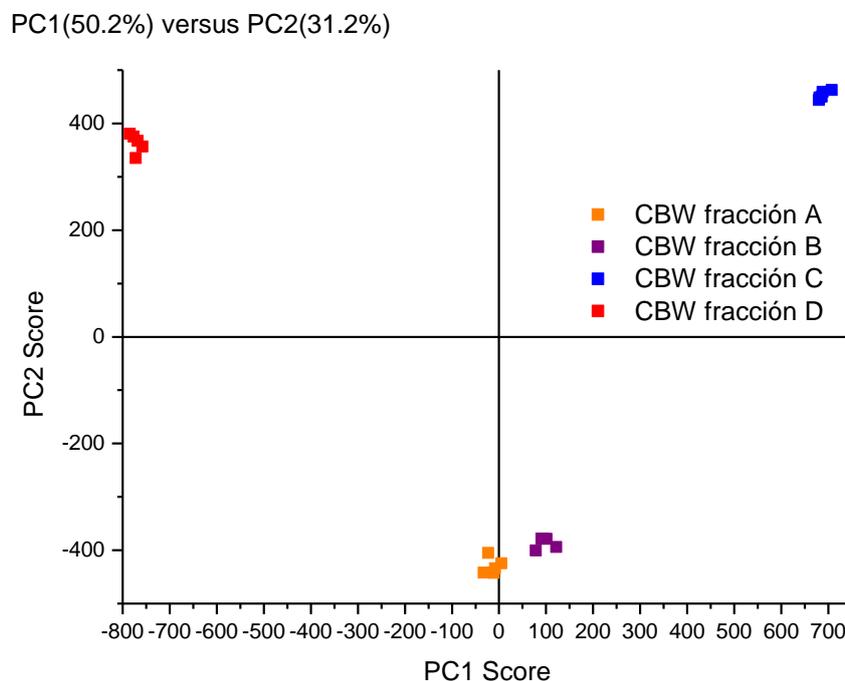


Figura II.21. Gráfica de clasificación de muestras generada por el PCA de las diferentes fracciones del agua residual de cocido de corcho.

Posteriormente, con el objetivo de identificar los compuestos específicos que marcan una diferencia en las muestras, se analizó el gráfico influencia (figura II.22). En este gráfico, las masas que compartan varias muestras se encontraran cerca del eje de coordenadas mientras que las masas que se encuentren en una sola muestra se encontrarán alejadas de este eje. El gráfico de influencia además está directamente relacionado con el gráfico de clasificación, de tal forma que las masas características de un cuadrante en el gráfico de influencia se corresponde con la muestra del mismo cuadrante en el gráfico de clasificación.

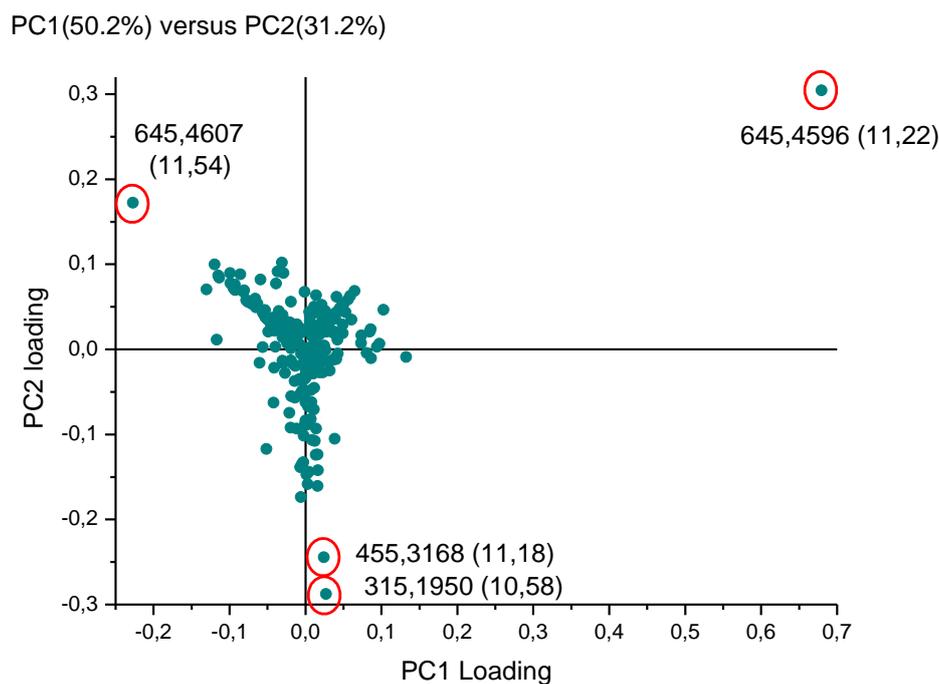


Figura II.22. Gráfico de influencia de variables obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones del ARC.

En el gráfico de influencia, se seleccionaron 4 masas: Masa 645.4607, que se encontraría en la fracción D; masa 645.4596 que se encontraría en la fracción C; y masas 455.3168 y 315.1950 que se encontrarían en las fracciones A y B o incluso en ambas. Mediante la selección de esas masas características, se pudo evaluar su presencia en las distintas fracciones, así como su intensidad. Como se observa en la figura II.23, la masa que tuvo mayor intensidad fue la 645.4596, a un tiempo de retención de 11.22, apareciendo en las fracciones A, B y C.

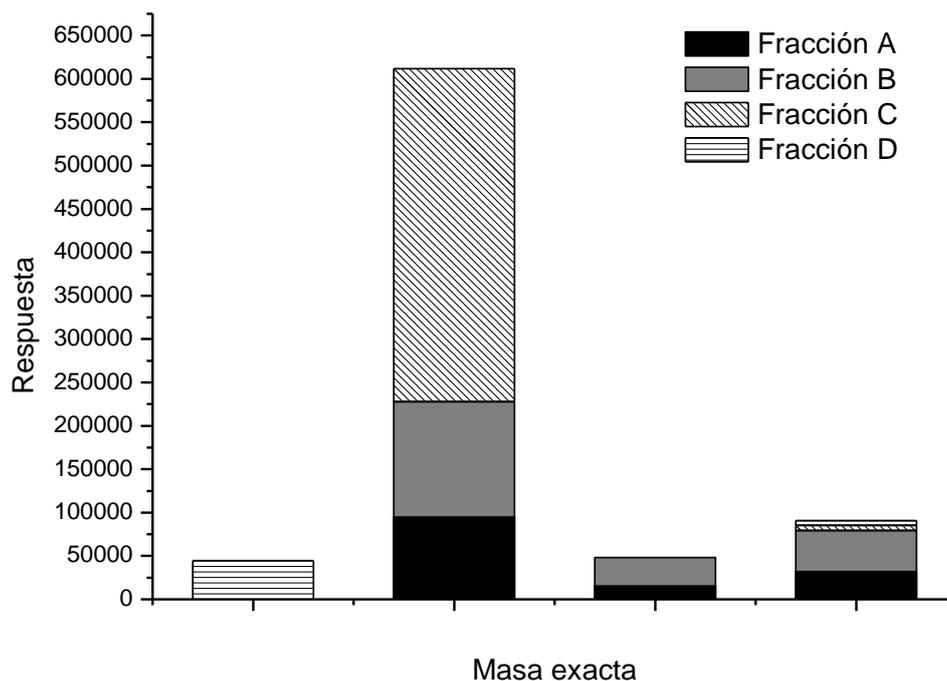


Figura II.23. Masas características y tiempo de retención de fracciones A, B, C, y D del ARC.

Por tanto, se pudieron encontrar masas características o “marcadores” en una determinada muestra, a los que podría asociarse una fórmula molecular empírica, reduciendo la complejidad del procesado de una gran cantidad de datos. Además, al separar varios iones isoméricos se pudo observar alta precisión del sistema, siendo capaz de diferenciar en un bajo intervalo de variación de masa (figura II.24).

Esta metodología desarrollada se aplicará en el capítulo III para la evaluación de una línea de tratamiento para la regeneración de ARC, dando información cualitativa acerca de la evolución cualitativa de las masas así como la determinación de masas específicas (eliminadas o formadas) durante la línea de tratamiento propuesta.

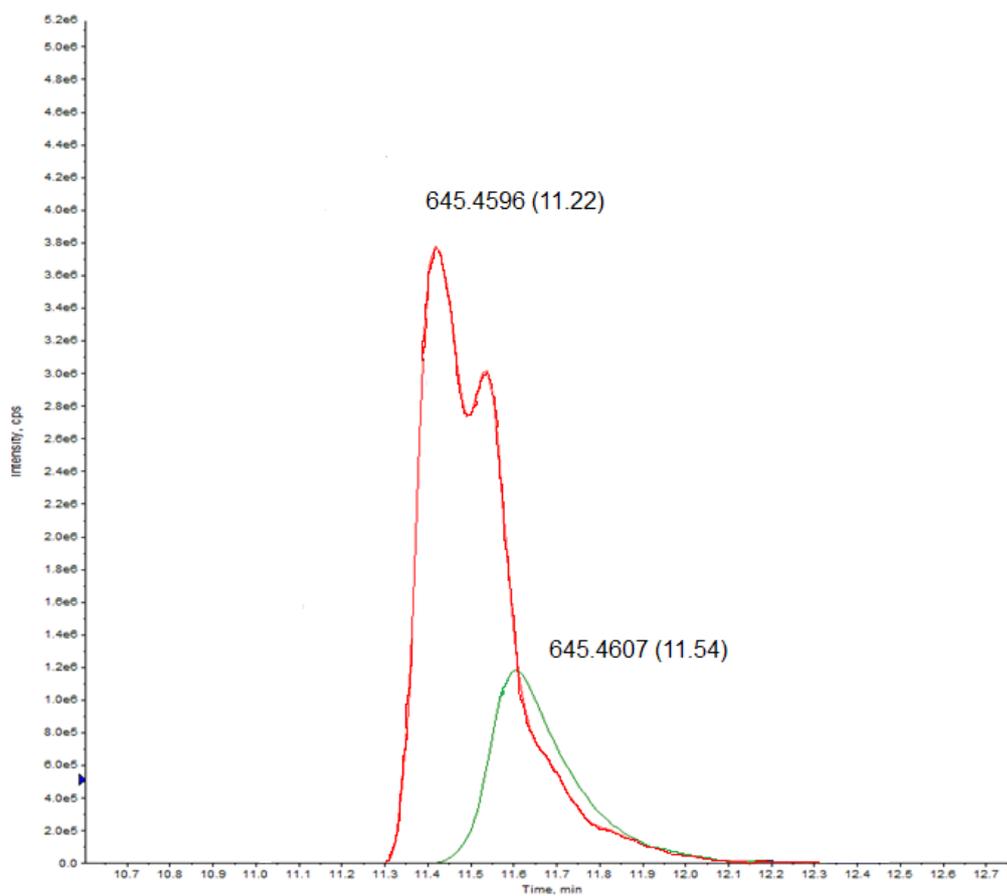


Figura II.24. Cromatograma de iones extraído (XIC) par a las masas 645 en ARC.

II.5. Conclusiones

El desarrollo de técnicas analíticas avanzadas es de vital importancia para evaluar el impacto medioambiental que las aguas residuales industriales pueden ocasionar en los ecosistemas terrestres. Y además para evaluar correctamente cualquier tratamiento que pretenda solventar precisamente el problema de estas aguas residuales.

En este trabajo se ha definido una estrategia para la determinación de compuestos conocidos o “target” y otra para la determinación de compuestos desconocidos o “non-target”.

La estrategia de determinación de compuestos conocidos o “target” consiste en la determinación y cuantificación de una serie de plaguicidas seleccionados en fangos activos de depuradora. La utilización del método de extracción QuEChERS ha resultado ser una alternativa rápida, simple y robusta para la extracción de plaguicidas en la fracción sólida. Para el desarrollo del método, se ha optimizado una etapa de limpieza utilizando diferentes adsorbentes (C18+PSA, Zsep y Zsep+). La mezcla C18+ PSA resultó ser la mejor opción para la reducción de interferencias con la matriz durante el análisis LC-MS/MS. El método seleccionado proporcionó un efecto matriz bajo (<20%) o medio (<50%), con recuperaciones en el rango de 76-118% en la mayoría de los casos. Sin embargo, el imazalil no presentó resultados reproducibles, probablemente como consecuencia de la compleja composición de los fangos procedentes de la industria agroalimentaria objeto de estudio.

Además, el método se ha aplicado con éxito tanto a la determinación de compuestos en fangos procedentes de una industria agroalimentaria como en fangos de una depuradora urbana. Los resultados demostraron la acumulación de altas concentraciones de plaguicidas en los fangos industriales, especialmente de tiabendazol y pirimetanil.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la industria de procesamiento de alimentos donde se utilizan grandes volúmenes de agua constituye una grave fuente de contaminación puntual de plaguicidas, cuya evaluación y seguimiento es aún muy deficiente.

Por otro lado, debido a la alta complejidad y naturaleza desconocida de las aguas residuales industriales, en concreto las ARC, la identificación de los componentes

orgánicos relevantes y desconocidos resulta muy complicada. Una opción satisfactoria es el fraccionamiento de las muestras. Para ello, una estrategia basada en una extracción SPE y SSPE ha revelado resultados satisfactorios, mostrando cromatogramas diferentes para cada fracción. La evaluación cualitativa de las muestras resulta ser una estrategia útil para la evaluación del número total de picos cromatográficos relevantes en una determinada muestra.

Finalmente, la utilización de un enfoque basado en la utilización de técnicas metabolómicas se puede considerar muy útil para la identificación de compuestos desconocidos relevantes en una serie de muestras concretas, permitiendo analizar y reducir la gran cantidad de información dentro de los conjuntos de datos HRMS. Esto ha permitido, además, encontrar sustancias atípicas en las aguas residuales objeto de estudio. Los XIC de los marcadores seleccionados han confirmado la alta precisión del método desarrollado.

Este enfoque desarrollado en este trabajo para la localización e identificación de las diferentes masas que se pueden encontrar en muestras acuosas de gran diversidad y complejidad, abre un campo de investigación y desarrollo muy amplio en la caracterización de muestras a lo largo de líneas de tratamiento de aguas residuales industriales y/o complejas.

II.6. Bibliografía

Agüera, A., Sirtori, C., Esteban, B., Cabrera, A., Carra, I., & Sánchez, J. A. P. (2013). Identification of biorecalcitrant micropollutants in food industry. Removal alternatives and characterization of generated transformation products, *proc. Micropol&Ecoazard*, Zurich Abstract IWA-11603.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86(2), 412-431.

Antignac, J. P., Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Elliott, C., & Le Bizec, B. (2011). Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 292-301.

Barbosa MO, Moreira NFF, Ribeiro AR, Pereira MFR, Silva AMT (2016) Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res* 94:257–279.

Baugros, J. B., Cren-Olivé, C., Giroud, B., Gauvrit, J. Y., Lantéri, P., & Grenier-Loustalot, M. F. (2009). Optimisation of pressurised liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(25), 4941-4949.

Belgiorno, V., & Rizzo, L. (2012). *Emerging Contaminants Into the Environment: Contamination Pathways and Control*. Lulu. com.

Bielicka-Daszkiwicz, K. (2016). Extraction techniques based on solid state and connected with liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(10), 477-487.

Bletsou, A. A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., & Thomaidis, N. S. (2015). Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 32-44.

Boccard, J., Veuthey, J. L., & Rudaz, S. (2010). Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. *Journal of separation science*, 33(3), 290-304.

Bourdat-Deschamps M, Leang S, Bernet N, Daudin J-J, Nélieu S (2014) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, . *J Chromatogr A*. 1349:11–23.

Bruzzoniti, M. C., Checchini, L., De Carlo, R. M., Orlandini, S., Rivoira, L., & Del Bubba, M. (2014). QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(17), 4089-4116.

Bueno, M. M., Gomez, M. J., Herrera, S., Hernando, M. D., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution*, 164, 267-273.

Campo, J., Masiá, A., Blasco, C., & Picó, Y. (2013). Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins. *Journal of hazardous materials*, 263, 146-157.

Canosa Rodríguez, M. D. P. (2009). Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Univ Santiago de Compostela.

Castillo, M., Alonso, M. C., Riu, J., & Barceló, D. (1999). Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters. *Environmental science & technology*, 33(8), 1300-1306.

CEN (European Committee for Standardization). (2008). Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method. EN, 15662, 2008.

Chen, Y., McPhedran, K. N., Perez-Estrada, L., & El-Din, M. G. (2015). An omic approach for the identification of oil sands process-affected water compounds using multivariate statistical analysis of ultrahigh resolution mass spectrometry datasets. *Science of the Total Environment*, 511, 230-237.

Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Antignac, J. P., & Le Bizec, B. (2009). Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst*, 134(8), 1637-1646.

Dass, C. (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry* (Vol. 16). John Wiley & Sons.

European Committee for Standardization, Lebensmittel P, Aliments Q (2008) CEN15662:2008 Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and / or LC-MS / MS following acetonitrile extraction / partitioning and cleanup by dispersive SPE — QuEChERS-method. 24:1–83.

Farré, M., Picó, Y., & Barceló, D. (2014). Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 1328, 66-79.

Ferhi S, Bourdat-Deschamps M, Daudin J-J, Houot S, Nélieu S (2016) Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. *Anal Bioanal Chem*. 408:6153–6168.

Food and Drug Administration. (1995). *Guideline for Industry, Text on Validation of Analytical Procedures*, 60 FR 11260. Center for Drug Evaluation and Research, 7500.

García-Valcárcel, A. I., & Tadeo, J. L. (2009). A combination of ultrasonic assisted extraction with LC–MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Analytica chimica acta*, 641(1), 117-123.

García-Valcárcel, A. I., & Tadeo, J. L. (2011). Determination of azoles in sewage sludge from Spanish wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 34(11), 1228-1235.

Ghanem, A., Bados, P., Perreau, F., Benabdallah, R., Plagellat, C., de Alencastro, L. F., & Einhorn, J. (2008). Multiresidue analysis of atrazine, diuron and their degradation products in sewage sludge by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(1), 345-352.

Hassani, S., Martens, H., Qannari, E. M., Hanafi, M., Borge, G. I., & Kohler, A. (2010). Analysis of-omics data: Graphical interpretation-and validation tools in multi-block methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 104(1), 140-153.

Herrero, P., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2014). A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method followed by liquid chromatography-(Orbitrap) high resolution mass spectrometry to determine benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, 1339, 34-41.

<http://quechers.cvua-stuttgart.de/>

<http://www.norman-network.net>

Ibáñez, G. R., Esteban, B., Ponce-Robles, L., López, J. C., Agüera, A., & Pérez, J. S. (2015). Fate of micropollutants during sewage sludge disintegration by low-frequency ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 280, 575-587.

Jiménez, M., Ignacio Maldonado, M., Rodríguez, E. M., Hernández-Ramírez, A., Saggioro, E., Carra, I., & Sánchez Pérez, J. A. (2015). Supported TiO₂ solar photocatalysis at semi-pilot scale: degradation of pesticides found in citrus processing industry wastewater, reactivity and influence of photogenerated species. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(1), 149-157.

Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., de Alda, M. L., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., & Barceló, D. (2013). Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the total environment*, 458, 466-476.].

Lehotay, S. (2007). AOAC official method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with Magnesium Sulfate. *Journal of AOAC International*, 90(2), 485-520.

Lehotay, S. J., Tully, J., Garca, A. V., Contreras, M., Mol, H., Heinke, V., ... & Poulsen, M. E. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90(2), 485-520.

Lewis, K., Tzilivakis, J., Green, A., & Warner, D. (2006). Pesticide Properties DataBase (PPDB).

Li Y, Kelley RA, Anderson TD, Lydy MJ (2015) Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 140:81–87.

Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., ... & Jarosova, B. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water research*, 47(17), 6475-6487.

Lozano, A., Kiedrowska, B., Scholten, J., de Kroon, M., de Kok, A., & Fernández-Alba, A. R. (2016). Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 192, 668-681.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., ... & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473, 619-641.

Mailler, R., Gasperi, J., Chebbo, G., & Rocher, V. (2014). Priority and emerging pollutants in sewage sludge and fate during sludge treatment. *Waste management*, 34(7), 1217-1226.

Maizels, M., & Budde, W. L. (2001). Exact mass measurements for confirmation of pesticides and herbicides determined by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 73(22), 5436-5440.

Majors, R. E. (2013). *Sample preparation fundamentals for chromatography*. Agilent Technologies, Mississauga, Canada.

Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J., & Picó, Y. (2015). Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. *Journal of Chromatography A*, 1378, 19-31.

Morris BD, Schriener RB (2015) Development of an automated column solid-phase extraction cleanup of QuEChERS extracts, using a zirconia-based sorbent, for pesticide residue analyses by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 63(21):5107–5119.

Nieto-García AJ, Romero-González R, GarridoFrenich A (2015) Multi-pesticide residue analysis in nutraceuticals from grape seed extracts by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Control* 47:369–380.

Ojeu. (2013). Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. *Ojeu*, 139, 12-14.

Olofsson U, Brorström-Lundén E, Kylin H, Haglund P (2013) Comprehensive mass flow analysis of Swedish sludge contaminants. *Chemosphere* 90(1):28–35.

Peréz, J. S., Carra, I., Sirtori, C., Agüera, A., & Esteban, B. (2014). Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at µg/L scale. *Water research*, 51, 55-63.

Pérez-Fernández, V., Rocca, L. M., Tomai, P., Fanali, S., & Gentili, A. (2017). Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 983, 9-41.

Peysson W, Vulliet E (2013) Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1290:46–61.

Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., & Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885(1), 17-39.

Rajski, Ł., Lozano, A., Uclés, A., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A. R. (2013). Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304, 109-120.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghae, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 1-9.

Rivas Ibáñez, G., Casas López, J. L., Esteban García, B., & Sánchez Pérez, J. A. (2014). Controlling pH in biological depuration of industrial wastewater to enable micropollutant removal using a further advanced oxidation process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(8), 1274-1282.

Ross, M. S., Pereira, A. D. S., Fennell, J., Davies, M., Johnson, J., Sliva, L., & Martin, J. W. (2012). Quantitative and qualitative analysis of naphthenic acids in natural waters surrounding the Canadian oil sands industry. *Environmental science & technology*, 46(23), 12796-12805.

Rossini D, Ciofi L, Ancillotti C, Checchini L, Bruzzoniti MC, Rivoira L, Fibbi D, Orlandini S, Del Bubba M (2016) Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites. *Anal Chim Acta*. 935:269–281.

Schenck FJ, Hobbs JE (2004) Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. *Bull Environ Contam Toxicol* 73 (1):24–30.

Sleighter, R. L., Liu, Z., Xue, J., & Hatcher, P. G. (2010). Multivariate statistical approaches for the characterization of dissolved organic matter analyzed by ultrahigh resolution mass spectrometry. *Environmental science & technology*, 44(19), 7576-7582.

Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., & García-Valcárcel, A. I. (2010). Determination of pesticide residues in sewage sludge: a review. *Journal of AOAC International*, 93(6), 1692-1702.

Wang L, Huang X, Wang D, Chen Y, Xu D, Zhou Y (2015) Determination of 32 sulfonylurea herbicide residues in sweet corns and green soybeans by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Se Pu* 33:501-507.

Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812.

Wluka, A. K., Rüdell, H., Pohl, K., & Schwarzbauer, J. (2016). Analytical method development for the determination of eight biocides in various environmental compartments and application for monitoring purposes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21894-21907.

Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107.

Zhao, X., Fu, L., Hu, J., Li, J., Wang, H., Huang, C., & Wang, X. (2009). Analysis of PAHs in water and fruit juice samples by DLLME combined with LC-fluorescence detection. *Chromatographia*, 69(11-12), 1385-1389.

**CAPÍTULO III:
TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES INDUSTRIALES
PROCEDENTES DE LA
INDUSTRIA DE COCIDO DE
CORCHO**

III.1. Introducción

III.1.1. Tecnologías para tratamientos de aguas industriales

Las aguas residuales procedentes de procesos industriales tienen composición variable y dependen del tipo de industria. Por tanto, la selección y aplicación de métodos de tratamiento debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y propiedades físico-químicas del efluente industrial a tratar. Para ello existen dos aspectos clave:

- Optimización del proceso mediante el diseño de instalaciones que permitan el correcto tratamiento.
- Evaluación, lo más completa posible, de la eficacia del proceso seleccionado.

Para la optimización del proceso, generalmente se necesita de la Ingeniería Química, y su importancia radica en el diseño de instalaciones que permitan el correcto tratamiento a bajo coste. La evaluación del tratamiento necesita de la Química Analítica, Toxicología e incluso la Microbiología. Una correcta evaluación tiene como fin no sólo controlar la efectividad del proceso de degradación, sino determinar la presencia de sustancias generadas en el proceso, y asegurar la inocuidad del vertido final, bien sea sobre el medioambiente o para aplicaciones de reúso.

Existen una gran variedad de diseños de reactores y procesos para el tratamiento de aguas residuales industriales. En este trabajo, se ha realizado un estudio detallado de procesos biológicos y PAOs (foto-Fenton solar y Ozono) para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria corchera. Asimismo, la evaluación y análisis de dichos procesos se ha llevado a cabo mediante la aplicación de la metodología analítica desarrollada en el capítulo anterior y otras toxicológicas y microbiológicas que se detallarán en este capítulo.

III.1.1.1. Tratamiento biológico para la descontaminación de aguas residuales industriales

En general, la tecnología de depuración más utilizada está basada en el uso de tratamientos biológicos en los que se produce la eliminación de la carga orgánica del agua a tratar de forma aerobia o anaerobia y/o anóxica [Ratola y cols., 2012]. Estos tratamientos, por lo general llevan asociados costes bajos de operación y mantenimiento

en comparación con tratamientos de oxidación química. La gran capacidad de adaptación y versatilidad que presentan estos sistemas hacen que sea la técnica elegida e implantada como primera opción en la mayoría de las EDAR. Los reactores biológicos se fundamentan en la capacidad de determinados microorganismos (entre los que destacan las bacterias) de metabolizar la materia orgánica y los nutrientes (nitrógeno y fósforo) contenidos en el agua residual a tratar, favoreciendo su propio crecimiento y provocando la disminución de la materia orgánica y por tanto la eliminación de contaminantes.

Los sistemas biológicos de tratamiento de aguas, generalmente se dividen en sistemas aerobios y anaerobios, aunque los más comunes son los sistemas aerobios. Estos sistemas se basan en la utilización de oxígeno molecular libre por parte de los microorganismos para asimilar impurezas orgánicas y convertirlas en agua y biomasa, provocando una importante generación de fangos debido al alto crecimiento de las bacterias aerobias.

No obstante, los procesos biológicos convencionales no dan siempre resultados satisfactorios, especialmente cuando se aplican al tratamiento de aguas residuales industriales, ya que las industrias pueden producir sustancias orgánicas tóxicas o resistentes a dicho tratamiento [Oller y cols., 2011; Pulgarín y Kiwi, 1996; Pulgarín y cols., 1999; Parra y cols., 2000; García y cols., 2001; Sarria y cols., 2004; Mantzavinos y Psillakis, 2004], provocando la inhibición de la actividad de los microorganismos presentes. Por tanto, en algunos casos es necesaria su combinación con otros tratamientos alternativos como tecnologías avanzadas basadas en la oxidación química. En el caso concreto del ARC, la presencia de ciertos contaminantes recalcitrantes (ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol, pentaclorofenol, etc.) pone de manifiesto la ineficiencia de su tratamiento mediante sistemas biológicos convencionales. En consecuencia, la práctica normal en la gestión de este tipo de aguas residuales es su almacenamiento en balsas en las EDAR para su progresiva dosificación y mezcla con la corriente de entrada (altamente biodegradable), lo que se conoce como efecto dilución. Esta dilución es necesaria para evitar efectos tóxicos (a corto plazo) en los fangos convencionales de una depuradora, lo cual no garantiza que posteriormente no aparezca un efecto de toxicidad crónica tras posibles acumulaciones de contaminantes altamente bio-recalcitrantes.

Las tendencias actuales en la mejora de procesos biológicos convencionales se centran en la adaptación de poblaciones de microorganismos específicos a las aguas residuales complejas objeto de estudio, que podrían soportar y depurar ciertos contaminantes orgánicos con muy baja biodegradabilidad y presentes en el agua residual. El diseño de estos tratamientos biológicos avanzados (capaces del tratamiento de aguas residuales industriales complejas como por ejemplo las aguas residuales procedentes de la industria petrolera), requieren la adaptación y desarrollo de nuevas poblaciones microbianas formando una nueva comunidad capaz de metabolizar contaminantes específicos e inicialmente recalcitrantes.

III.1.1.1.1. Importancia de la población bacteriana en un tratamiento biológico

El conjunto de microorganismos presente en un fango activo de un tratamiento biológico es muy variado en especies. Estos microorganismos normalmente se agrupan formando flóculos y su composición exacta depende de las características del agua residual que se esté tratando y las condiciones del proceso, ya que se trata de un ecosistema que se encuentra en un continuo cambio.

Los fangos activos están constituidos por dos tipos de componentes: los no biológicos, como son partículas de materia orgánica e inorgánica y los componentes biológicos (microorganismos). Estos sistemas están constituidos principalmente por bacterias, protozoos, algas, hongos y pequeños metazoos. La importancia de estos microorganismos para la depuración de aguas residuales industriales ha sido estudiada y documentada desde hace muchos años [Curds y Vandyke, 1966; Curds, 1973; Curds, 1982; Klimowicz, 1970; Madoni y Ghetti, 1981; Madoni, 1986]. La relación entre los diferentes componentes bióticos de las poblaciones de microorganismos constituye lo que se denomina red trófica, y va cambiando con el tiempo en función de las condiciones del sistema. Esta red trófica está basada en las relaciones de competencia y/o dependencia establecidas en base a las necesidades tróficas (de alimentación) de los microorganismos presentes. En un sistema estabilizado, la red trófica se podría esquematizar de la siguiente forma:

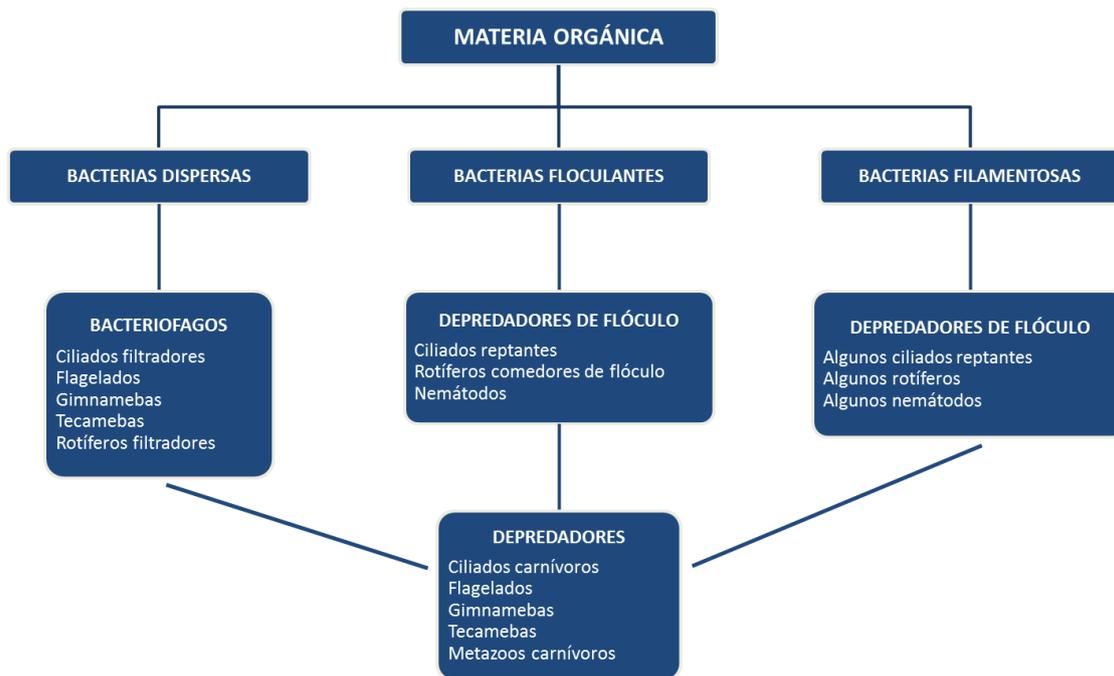


Figura III.1. Interacciones tróficas entre los diferentes microorganismos que componen un sistema de fango estabilizado.

Así, la cantidad de alimento que se encuentre en el sistema determinará la biomasa que el sistema pueda soportar, mientras que el tipo de alimento determinará el grupo nutricional que se puede desarrollar. Dada la gran cantidad de interrelaciones que se pueden dar en el sistema y los parámetros físico-químicos presentes, la modificación de alguna variable que altere dichas interrelaciones puede alterar gravemente su correcto funcionamiento.

La presencia de bacterias filamentosas también juega un papel importante en los sistemas biológicos. La presencia moderada de ellas permite la formación de flóculos grandes y compactos, así como la captura de pequeñas partículas durante la sedimentación del fango, proporcionando un efluente con menor turbidez. Sin embargo, si la concentración de estas bacterias es demasiado alta, el sistema biológico puede presentar diferentes problemas:

- Esponjamiento o “bulking” filamentoso: Se produce cuando predominan los microorganismos filamentosos sobre las bacterias floculantes, impidiendo la compactación del fango. La gravedad de un proceso de bulking depende del tipo de

filamento predominante y la cantidad del mismo. En general, las bacterias filamentosas de mayor tamaño (longitud y robustez) son las que producen los efectos más graves.

- Formación de espumas o “foaming”: Se produce cuando los microorganismos tienden a acumularse en la superficie por floculación, ayudados por las burbujas de aire. La consecuencia es la formación de espumas densas que pueden llegar a tener gran consistencia, constituyendo en ocasiones un problema para su eliminación.

Por tanto, mediante el estudio y control de la población microbiana y la selección de una línea de tratamiento adecuado, se puede favorecer la formación o eliminación de diferentes especies en la estructura del fango activo, ayudando a la estabilidad y eficacia del proceso [Harms y cols., 2003].

III.1.1.1.2. Técnicas microbiológicas para el estudio de un tratamiento biológico

Hasta la fecha, la mayor parte del conocimiento acerca de la composición de comunidades microbianas y su dinámica en sistemas de tratamiento de aguas residuales proviene de estudios que emplean métodos de cultivo tradicionales (determinación de huellas genéticas o técnicas moleculares). Sin embargo, la frecuencia de aparición de problemas en los procesos biológicos obliga a la utilización de un gran abanico de técnicas microbiológicas para la evaluación de poblaciones microbianas. Mediante el empleo de microscopía óptica, recuento en placa y de otras técnicas avanzadas como qPCR (quantitative polymerase chain reaction) o en la actualidad las técnicas metagenómicas, se puede identificar la presencia de microorganismos, relacionándolos con los efectos que producen en un determinado tratamiento biológico.

La observación mediante microscopía óptica y los estudios basados en medios de cultivo (recuento en placa) ayudan a identificar las poblaciones predominantes presentes en fangos activos. El estudio de una muestra de fango activo en un microscopio óptico es una herramienta indispensable que permite no solamente la identificación y cuantificación de distintas especies, sino el conocimiento de características relacionadas con la estructura del flóculo. Esta información es útil para la detección de problemas en la depuradoras como “bulking” o “foaming” [Jenkins y cols., 1993]. Por otro lado, el recuento en placa permite proporcionar información acerca del crecimiento de

determinados microorganismos en un medio específico previamente seleccionado [Cyzdik-Kwiatkowska y Zielińska, 2016].

Otra técnica útil para el análisis cuantitativo de microorganismos específicos presentes en muestras ambientales es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o qPCR. Esta técnica está basada en la amplificación y detección de fragmentos específicos de ADN. La principal ventaja y a la vez inconveniente de esta técnica es su carácter específico, siendo necesario el uso de sondas y cebadores o “primers” para un determinado fragmento de ADN.

Recientemente, ha surgido la necesidad del desarrollo de metodologías que faciliten el estudio de la diversidad microbiana del ADN en muestras de fango activo sin la necesidad de aislar y realizar cultivos de laboratorio. Esta necesidad surgió de numerosos intentos para cultivar una gran diversidad de organismos, demostrándose que la mayoría de ellos (más del 99%) no son cultivables [Rappé y Giovannoni, 2003]. Es por ello que actualmente se están aplicando técnicas novedosas basadas en la secuenciación del genoma con el objetivo de determinar poblaciones predominantes y comunidades microbianas complejas [Ansorge y cols., 2009]. Estas nuevas tecnologías podrían resultar útiles para el estudio de la diversidad microbiana en ambientes comunes como fangos activos y muestras marinas [Hugenholtz y cols., 2008], ayudando al conocimiento de la función, evolución, y relación de poblaciones que componen un sistema determinado.

Estas nuevas técnicas se enmarcan en el campo de la metagenómica, y suponen un cambio de rumbo en cuanto a las técnicas microbiológicas debido a su alto potencial, convirtiéndose en una herramienta útil para conocer la elevada biodiversidad de las muestras medioambientales. La propiedad más valiosa de esta técnica es por tanto la obtención de secuencias del genoma de los diferentes microorganismos (en la mayoría de los casos bacterias) que componen una determinada comunidad, extrayendo y analizando su ADN de forma global, sin necesidad de cultivar los microorganismos, y por tanto obviando las dificultades encontradas en el cultivo de laboratorio para ciertos microorganismos.

III.1.2. Tratamientos para la regeneración de aguas residuales industriales procedentes del cocido de corcho

Los estudios realizados sobre el tratamiento de aguas de cocido de corcho comprenden metodologías simples y combinadas basadas principalmente en procesos físico-químicos tales como ultrafiltración y/o nanofiltración [Bernardo y cols., 2011; Benítez y cols., 2008 y 2009; Geraldés y cols., 2009; Oliveira y cols., 2009 y Teixeira y cols., 2009], floculación / flotación / ultrafiltración [Minhalma y cols., 2009], ozono y filtración por membranas [Benítez y cols., 2008], ozonización combinada con peróxido de hidrógeno y radiación UV [Lan y cols., 2008; Acero y cols., 2004], fotocátalisis solar [Pintor y cols., 2011; Vilar y cols., 2009] o reacciones de Fenton acopladas a tratamientos de coagulación / floculación [Beltran De Heredia y cols., 2004]. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos tienen elevado coste y además pueden dar lugar a la generación de subproductos que en muchos casos pueden presentar altos valores de toxicidad, incluso mayores que los de los compuestos orgánicos iniciales.

Una alternativa podría ser la utilización de procesos biológicos. Sin embargo, el vertido de este tipo de aguas residuales en una EDAR implica bajos rendimientos debido a su contenido biorecalcitrante. Algunos estudios sobre metodologías basadas en tratamientos biológicos incluyen el aislamiento de bacterias aeróbicas para la degradación de compuestos fenólicos [Del Castillo y cols., 2012], oxidación química combinada con biodegradación (mediante enriquecimiento de cultivos) para la mejora de la biodisponibilidad de materia orgánica [Dias-Machado y cols., 2006], utilización de cepas para la detoxificación del agua residual, desarrollo de cepas específicas, [Mendoça y cols., 2004], y la ozonización acoplada a degradación aeróbica en un sistema de fangos activos [Benítez y cols., 2003].

En la actualidad, la combinación de PAO y sistemas de membrana como la nanofiltración [Oliveira y cols., 2009; Teixeira y cols., 2009], junto con procesos físico-químicos utilizados como pre-tratamiento [Dias-Machado y cols., 2006], son los métodos más prometedores e innovadores para tratamiento de aguas residuales industriales. Una de las principales ventajas de la aplicación de procesos avanzados de oxidación es la generación de radicales hidroxilo que pueden atacar a los contaminantes orgánicos de forma no selectiva, siendo capaces de mineralizar de forma completa el contenido orgánico y/o eliminar el contenido polifenólico. En concreto, el proceso de

foto-Fenton Solar ha resultado ser una buena opción para el tratamiento de aguas residuales industriales [Oller y cols., 2011; Nascimento y cols., 2007; Pouran y cols., 2015; Prieto-Rodríguez y cols., 2017]. Para el tratamiento de aguas residuales complejas y por tanto la mejora de la calidad de los efluentes industriales, una alternativa podría ser la combinación de diferentes tecnologías [Oller y cols., 2011]. En este campo, Vilar y cols. (2009) y De Torres Socias y cols. (2014), estudiaron la combinación de fotocátalisis solar y oxidación biológica para el tratamiento de aguas residuales de la industria corchera a escala planta piloto. Van Aken y cols. (2015), estudiaron el proceso de ozonización como etapa de pre-tratamiento anterior a un sistema biológico, evaluando la toxicidad y biodegradabilidad y centrándose en un contaminante modelo (2,4-diclorofenol). Fernandes y cols. (2014), estudiaron la oxidación anódica con un ánodo de boro dopado con diamante con el objetivo de mejorar la biodegradabilidad de este tipo de aguas y mineralizar las muestras, obteniendo valores de DQO cercanos al límite legal de descarga (150 mg/L). Gomes y cols., (2013), utilizaron el proceso de ozonización como etapa de pre-tratamiento, estudiando la influencia del pH en la toxicidad y biodegradabilidad de las ARC.

Las EDAR presentes hoy en día en casi todas las ciudades, pueblos o zonas industriales, están basadas en la utilización de procesos biológicos naturales de alta eficiencia y capacidad mediante la utilización de fangos activos o bio-tratamientos alternativos. Sin embargo, estos procesos no resultan efectivos ante vertidos industriales conteniendo sustancias tóxicas y/o biorecalcitrantes. Por otro lado, los PAOs con el objetivo de mineralizar completamente sustancias tóxicas y/o biorecalcitrantes presentan costes de operación elevados debido fundamentalmente a: i) Un consumo elevado de reactivos; ii) La velocidad de degradación de los contaminantes disminuye conforme se generan intermedios más oxidados; iii) Suelen precisar de un consumo elevado de energía. Por tanto, la alternativa más atractiva sería una combinación de ambas tecnologías.

Por tanto, el objetivo principal sería el diseño de un tratamiento integrado (químico-biológico) que minimice los costes del proceso global. Dado que los PAO son mucho más costosos que los tratamientos biológicos, la clave está en minimizar el tiempo de tratamiento y el consumo de reactivos en el PAO utilizándolo como pre-tratamiento, siempre y cuando sea posible, mejorando la toxicidad y biodegradabilidad de ciertas aguas residuales. [Oller y cols., 2011]. Normalmente, durante el proceso de oxidación se

generan productos de transformación que, en general, son más biodegradables que los contaminantes iniciales, y por tanto susceptibles de ser tratados por un sistema biológico posterior, por ejemplo, en una EDAR cercana a la industria en particular.

III.2. Objetivos y plan experimental

III.2.1. Objetivos

El objetivo general de este capítulo de la tesis doctoral es el diseño y desarrollo de una estrategia de tratamiento eficiente para aguas residuales industriales complejas. Para ello se utilizó como modelo el agua residual procedente de la industria de cocido de corcho, agua residual real representativa de aguas residuales industriales poco biodegradables. Se realizaron ensayos a escala de laboratorio y a escala planta piloto, además de la utilización de técnicas analíticas avanzadas y bioensayos con el objeto de evaluar, de la forma más completa posible, la estrategia de tratamiento propuesta para la posible reutilización de estas aguas residuales en la propia industria de cocido del corcho.

A continuación se detallan los objetivos específicos secuenciados en el desarrollo del plan experimental.

- Caracterización físico-química y toxicológica de las ARC.
- Evaluación de la capacidad de depuración de un sistema biológico aerobio adaptado de forma específica a las ARC. Análisis de parámetros químicos y microbiológicos.
- Optimización de un pre-tratamiento físico-químico basado en técnicas de coagulación/floculación para la reducción de color y carga de sólidos totales en las ARC.
- Análisis comparativo de diversos PAO (foto-Fenton solar y ozono) tras la etapa de pre-tratamiento físico-químico.
- Evaluación de la efectividad de un sistema biológico aerobio específicamente adaptado a ARC parcialmente tratadas mediante coagulación/floculación seguida de una fase de oxidación química. Aplicación de técnicas analíticas y microbiológicas avanzadas.
- Estudio avanzado de la toxicidad (aguda y crónica) y biodegradabilidad de las ARC, así como el efluente de cada uno de los tratamientos aplicados.

- Aplicación de técnicas analíticas avanzadas basadas en LC/Q-TOF para la determinación de compuestos desconocidos o “non-target” generados durante los tratamientos aplicados.
- Selección de la mejor estrategia de depuración (sistema biológico, PAO o combinación de ambos) para las aguas residuales industriales objeto de estudio.

III.2.2. Plan experimental

Para llevar a cabo los objetivos expuestos en el apartado anterior, fue necesario realizar el siguiente plan experimental.

- Aclimatación y adaptación de fangos activos procedentes de una EDAR municipal para maximizar la eficiencia de depuración de un proceso biológico aerobio específico para aguas residuales procedentes de la industria del corcho, evaluando la variación de la flora microbiana presente en el biorreactor a través de diversas tecnologías: microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN, qPCR y técnicas metagenómicas.
- Aplicación de procesos de coagulación-floculación (C/F) para la reducción, principalmente del color y la turbidez de las aguas residuales bajo estudio. Para ello se seleccionaron diferentes coagulantes y floculantes comerciales y se utilizó un sistema “jar test” a escala de laboratorio. El coagulante seleccionado por obtener los mejores resultados fue empleado como pre-tratamiento al desarrollo y evaluación de la siguiente etapa de depuración mediante la aplicación de PAOs.
- Análisis comparativo de diferentes PAO (foto-Fenton solar, O_3 , O_3/H_2O_2) a escala planta piloto para el tratamiento de las ARC tras la etapa de C/F.
- Aclimatación y adaptación de fangos activos procedentes de una EDAR municipal en un bioreactor aerobio alimentado con ARC parcialmente tratadas mediante C/F y foto-Fenton solar. Evaluación de la efectividad del tratamiento biológico mediante parámetros químicos y técnicas microbiológicas avanzadas (microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN y qPCR).
- Análisis mediante técnicas respirométricas de toxicidad y biodegradabilidad de las aguas objeto de estudio a lo largo de la línea de tratamiento propuesto. Puesta a

punto de nuevos bioensayos de toxicidad aguda y crónica en diversos organismos (*Vibrio-Fisheri*, *Artemia*, *Daphnia magna* y el protozoo *Tetrahyema Thermophyla*).

- Desarrollo de un nuevo método selectivo de análisis mediante LC-TOF-MS basado en técnicas ómicas con el fin de evaluar la variación de analitos “non-target” o desconocidos durante los tratamientos aplicados.

III.3. Materiales y métodos

III.3.1. Reactivos

Las ARC utilizadas en este trabajo se recogieron en una planta de procesado de corcho ubicada en San Vicente de Alcántara (Extremadura, España). El fango activo utilizado se recogió en una EDAR municipal convencional situada en El Toyo (Almería).

Para la optimización del pre-tratamiento físico-químico se utilizaron ocho coagulantes: FeCl_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, QUIFLOC 225-K, ECOTAN BIO, QUIFLOC NT-520, QUIFLOC E-500, ECOMIX PX, QUIFLOC HA y tres floculantes: QUIFLOC AC/9800, QUIFLOC 2030-W y QUIFLOC AC-6010, todos ellos comercialmente disponibles en el mercado. Ecomix PX y ECOTAN BIO fueron suministrados por Serviecogrup, Alcora (Castellón). El resto de coagulantes y floculantes fueron suministrados por MPMedioambiente S.L (Sevilla). El cloruro férrico anhidro (FeCl_3) y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fueron suministrados por Panreac. Los reactivos utilizados para el ajuste de pH (H_2SO_4 y NaOH) fueron suministrados por Panreac y Merck.

En el estudio de los PAOs se utilizó H_2O_2 proporcionado por Panreac. Los kits de toxicidad comerciales (Protoxkit FM, Artokit M y Daphtoxkit FTM magna) fueron suministrados por Microbio Test Inc. (Bélgica). BioFix® Lumitest fue suministrado por GmbH y Co. KG (Düren, Alemania).

III.3.2. Técnicas analíticas convencionales

III.3.2.1. Medida de pH

Las medidas se realizaron utilizando un pH-metro Mettler Toledo con un electrodo Inlab® Expert Pro integrado con un sensor de temperatura. Para la calibración semanal del pH-metro se utilizaron disoluciones tamponadas o “buffers” de pH 7 y pH 4 (Crison). Las medidas de pH se realizaron de forma directa hasta conseguir la estabilización de las mismas.

III.3.2.2. Medida de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) en suspensión

Fundamento teórico

Los “sólidos totales” (ST) es el término usado para la materia residual que permanece en un recipiente después de la evaporación de la muestra en un horno a una temperatura determinada. Los sólidos totales engloban a los sólidos suspendidos totales (SST) que es la porción de sólidos totales retenidos en un filtro de tamaño de poro específico. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son los sólidos que pueden ser volatilizados e incinerados se lleva a cabo una calcinación a una temperatura de $500\pm 50^{\circ}\text{C}$. La concentración de sólidos volátiles se suele considerar como una medida aproximada del contenido de materia orgánica en la muestra [Metcalf y Eddy, 2003].

En este trabajo se empleó la medida de SSV y SST para la evaluación del tratamiento biológico a escala de laboratorio con el objetivo de conocer la variación de biomasa durante los experimentos.

Procedimiento

Se filtró un volumen conocido de muestra de fango homogeneizada a través de un filtro de microfibras de vidrio (150 mm, Grado GF / A-1,6 μm , Whatman®) previamente lavado con agua destilada y secado en el horno a una temperatura de 106°C hasta tener un peso constante. El filtrado se llevó a cabo mediante un sistema de vacío con un matraz kitasatos. La muestra retenida sobre el filtro se secó en la estufa a una temperatura de 106°C durante 2 horas. A continuación el filtro se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Este proceso de secado, enfriado y pesado se repitió hasta que el peso obtenido era constante o tuvo una variación inferior al 4%. El cálculo de SST se realizó a partir de los pesos del filtro vacío y con el residuo a través de la ecuación III.1.

$$SST \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A-B)}{\text{volumen de muestra (mL)}} \times 1000 \quad \text{Ec. III.1}$$

Donde:

A= Peso del filtro + el residuo (mg) después de la estufa a 106°C

B= Peso del filtro previamente secado (mg)

Para la medida de SSV el filtro procedente de la medida anterior se introdujo en la mufla a 550°C durante 30 minutos, se dejó enfriar nuevamente en el desecador y se registró el peso hasta llevarlo a peso constante. El cálculo de SSV se realizó mediante la ecuación III.2.

$$SSV \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(A-C)}{\text{volumen muestra (mL)}} \times 1000 \quad \text{Ec. III.2}$$

Donde:

C: Peso del filtro + el residuo (mg) después de la mufla a 550°C

III.3.2.3. Medidas de turbidez

Descripción del equipo y fundamento teórico

La medida de turbidez se define como la falta de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión. La turbidez es considerada como una forma de medida de la calidad del agua, cuanto más turbia, menor será su calidad. La turbidez se mide en Unidades Nefelométricas de Turbidez o Nephelometric Turbidity Unit (NTU) en inglés.

La mayoría de los turbidímetros aplican la detección nefelométrica de 90°, una técnica considerada extremadamente sensible a partículas dispersas, de una amplia diversidad de tamaños de partícula. En concreto, los turbidímetros nefelométricos miden la intensidad de luz dispersada a 90° cuando un rayo de luz pasa a través de una muestra acuosa. Existen algunas interferencias a considerar en las mediciones de turbidez, como la presencia de residuos flotantes o sedimentos, la coloración de las muestras y las burbujas de aire.



Figura III.2: Turbidímetro Hach modelo 2100N.

El modelo de equipo utilizado (figura III.2) cumple con el método 180.1 de la EPA. Dispone de una LED como fuente emisora de luz a 525 nm y dos sensores dispuestos con ángulos a 90° y 180° para la luz dispersa y luz transmitida. La medida de la turbidez se calcula teniendo en cuenta las dos señales que llegan al detector, mediante un cálculo algorítmico.

Procedimiento

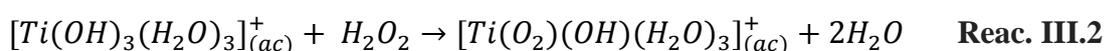
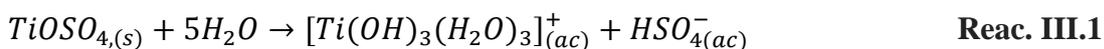
En este trabajo, las medidas de turbidez se utilizaron para la evaluación y optimización de procesos de coagulación/floculación (C/F). El procedimiento consistió en la introducción de la muestra en un vial compatible con el turbidímetro y la recogida de los valores de NTU correspondientes. Las medidas se tomaron inmediatamente después de la introducción del vial en el equipo para evitar la sedimentación de partículas en suspensión.

Previo a las medidas, la calibración del equipo se realizó utilizando un Kit de calibración (StablCal™), que contiene estándares de formazina (0.1, 20, 200, 1000 y 4000 NTU). Estos estándares se mantienen estables durante un año. La calibración se realizó al menos cada tres meses o en función del uso.

III.3.2.4. Determinación de peróxido de hidrógeno mediante volumetría yodométrica

Fundamento teórico

Existen diferentes métodos para determinar la concentración de H₂O₂. En este trabajo se ha utilizado un método espectrofotométrico basado en la utilización de oxisulfato de titanio (IV) conforme a la norma DIN38402H15. El método está basado en la formación de un complejo estable de color amarillo debido a la reacción entre H₂O₂ y el TiOSO₄ (reacciones III.1 y III.2). El complejo formado se mide espectrofotométricamente teniendo una absorción máxima a 410 nm [Muñoz, 1990].



Procedimiento

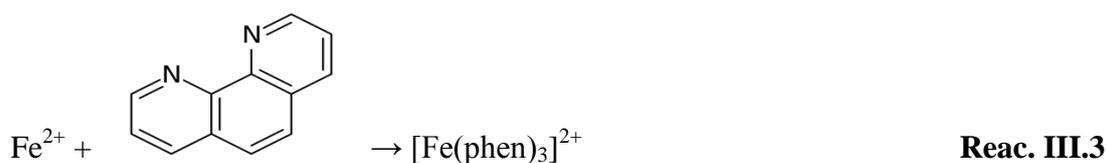
El procedimiento consiste en tomar un volumen de muestra filtrada (filtro de jeringa Nylon MilliporeMillex® de 0.22µm) de 5 mL y añadir 500µL de solución de oxisulfato de titanio (IV). Cuando el complejo se forma se observa un color amarillo, siendo estable hasta un máximo de 10 horas. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Unicam II). La concentración de H₂O₂ en las muestras se calculó a través de una recta de calibrado (ecuación III.3) obtenida a partir de los datos de absorbancia medidos.

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (mg/L)} = 43.501 \times \text{Absorbancia} + 0.0538 \quad \text{Ec. III.3}$$
$$R^2 = 0.9998$$

III.3.2.5. Determinación de hierro mediante espectrofotometría (ISO 6332)

Fundamento teórico

La determinación de hierro en disolución está basada en la formación de un complejo quelato de Fe²⁺ con fenantrolina (1,10-fenantrolina) siguiendo el método espectrofotométrico reflejado en la norma ISO 6332:1988. El complejo formado (reacción III.3) adquiere un color naranja-rojizo y presenta un máximo de absorbancia a 510 nm. La formación del complejo se da en un intervalo de pH comprendido entre 2 y 9. Aunque el rango de pH es amplio, para asegurar la formación del complejo Fe²⁺-fenantrolina es necesario trabajar utilizando una disolución tamponada (tampón ácido acético/acetato). La absorbancia del complejo Fe²⁺ con 1,10-fenantrolina es proporcional a la concentración de ión ferroso.



Durante los experimentos de foto-Fenton solar, debido a la presencia del agente oxidante H₂O₂, la mayor parte del hierro disuelto existe como ión férrico. Una estrategia para medir el hierro total es agregar un agente reductor tal como ácido ascórbico para reducir el hierro férrico al hierro ferroso. La medida del hierro ferroso antes y después de añadir el agente reductor permite determinar la concentración de hierro férrico y ferroso.

Existen diversos metales pesados que pueden interferir en la medida, ya que forman complejos con la fenantrolina, como son Zn^{2+} , Co^{+2} , Cu^{2+} , Ni^{2+} o Cr^{3+} y otros que pueden precipitarla (Ag^{+2} , Bi^{+3} , Cd^{+2} , MoO_4^{2-}). Existen publicados diferentes procedimientos que se aplican para la eliminación de estas interferencias [APHA, 1998], sin embargo, en este trabajo de investigación las principales interferencias fueron debidas al color de las muestras.

Procedimiento

Para la medida de hierro total en disolución se tomaron 4 mL de muestra previamente filtrada por un filtro de Nylon de 0.22 μm de tamaño de poro y se añadió 1 mL de una disolución de 1g/L de 1,10-fenantrolina. A continuación se añadió 1 mL de una disolución tampón (250 g/L de acetato amónico y 700 ml/L de ácido acético en agua destilada) y una espátula de ácido ascórbico para favorecer que el ión férrico se reduzca a ión ferroso y se pueda medir la absorbancia del complejo Fe^{2+} -fenantrolina a 510 nm. Para muestras coloreadas, es de vital importancia la medida de un blanco, preparado de la misma forma que las muestras, reemplazando la fenantrolina por agua, compensando así las interferencias de color.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se calculó la concentración de hierro total en disolución mediante una recta de calibración externa realizada en el rango de concentraciones de 0.25 a 10 mg/L hierro. Para concentraciones superiores a 10 mg/L se efectuó la correspondiente dilución de la muestra (ecuación III.4).

$$Fe_{TOTAL} \text{ (mg/L)} = (7.7447 \times \text{Absorbancia} - 0.0781) \times \text{factor dilución} \quad \text{Ec. III.4}$$

$$R^2 = 1$$

Hay que tener en cuenta, que en reacciones de foto-Fenton y ozono la medida de hierro puede verse afectada por la presencia de peróxido de hidrógeno u ozono en las muestras, ya que éstos pueden oxidar todo el Fe^{2+} a Fe^{3+} , variando el equilibrio entre las dos especies. Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue la medida de hierro total en disolución a lo largo de los experimentos de foto-Fenton solar y ozono, por lo que la distinción entre Fe^{2+} o Fe^{3+} fue irrelevante.

III.3.2.6. Método de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico total en una muestra

Fundamento teórico

El ensayo de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reaccionar con agentes oxidantes. Contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que da lugar al ácido fosfomolibdotúngstico formado por las dos sales en el medio ácido, de color amarillo que reacciona con los compuestos fenólicos dando lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 765 nm para evaluar el contenido de polifenoles totales (figura III.3). La reacción se produce a pH básico y se cuantifica el contenido polifenólico total en base a una recta patrón de ácido gálico, tánico o cafeico.

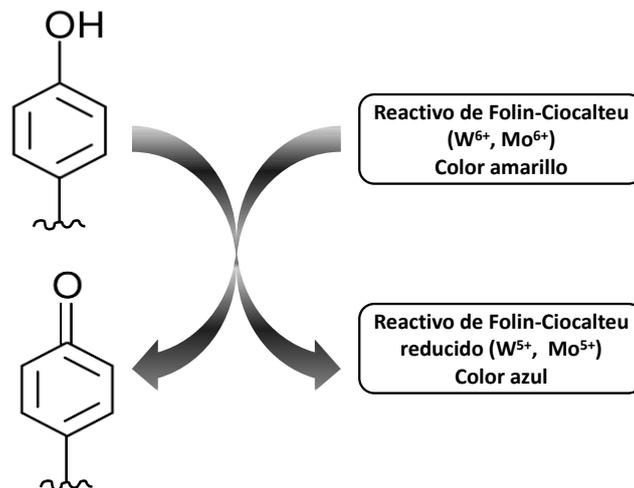


Figura III.3. Mecanismo de actuación de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Procedimiento

Para la obtención de un pH básico durante el proceso de medida de polifenoles totales, se utiliza una disolución de carbonato sódico, que se prepara disolviendo 200 gramos de carbonato sódico anhidro en un litro de agua en ebullición. La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y por último se filtra antes de su uso.

Para el procedimiento de medida de contenido polifenólico total de las muestras, en un matraz de 100 mL se vierte 1 mL de muestra. A continuación se adicionan 60 mL de agua destilada y se agita la solución. Se añaden 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita de nuevo la solución y se deja en reposo durante 2-3 minutos. Por último se

añaden 15 mL de la disolución de carbonato sódico preparada previamente, se completa el volumen del matraz con agua destilada y se deja en reposo durante 2 horas a 20°C. El contenido de polifenoles totales se determina por interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva de calibrado utilizando un material de referencia. El aumento del color azul es directamente proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra (figura III.4).



Figura III.4. Coloración de muestras en función de la concentración de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En este trabajo se utilizó el ácido gálico como material de referencia para la preparación de la recta de calibración. Para ello, en matraces de 100 mL se viertieron 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mL de una disolución stock de ácido gálico que se preparó disolviendo 0.5 g de ácido gálico en un matraz de 100 mL con agua destilada. La concentración de fenoles en estos matraces expresada como equivalentes de ácido gálico fue de 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 500. A continuación se realizó el procedimiento de medida de polifenoles descrito anteriormente. Para comprobar la fiabilidad del método, se utilizó un estándar de referencia de concentración conocida (fenol), dando un porcentaje de error en la medida de menos del 7 %.

$$\text{Absorbancia} = 0.1241 \times \text{Concentración (mg/L)} + 0.001$$

Ec. III.5

$$R^2 = 0.9997$$

III.3.2.7. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO)

Descripción del equipo y fundamento teórico

La DQO determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua residual bajo condiciones específicas de agente oxidante, temperatura y tiempo. Para ello, las sustancias oxidables presentes en la muestra se

oxidan en una solución caliente y fuertemente ácida con un exceso conocido de dicromato potásico en presencia de sulfato de plata que actúa como agente catalizador. Después de dos horas de digestión a 148°C, la concentración de iones Cr^{3+} de color verde generados a partir del dicromato consumido (color amarillo-naranja) son determinados por espectrofotometría. La norma que regula el protocolo de esta metodología es la ISO 15705, y es análogo a EPA 410.4 y la reacción global que tiene lugar en el proceso es la siguiente:



Reac. III.4

Para esta determinación, existen kits comerciales asociados a sistemas de digestión que permiten una rápida detección y cuantificación de los valores de DQO en muestras reales. En este trabajo se utilizaron tres kits comerciales Spectroquant® de Merck que difieren en el rango de medida: 4-40 (ref. 1.114560.0001) mg O_2/L , 25-1500 mg O_2/L (ref. 1.14541.0001) y 500-10000 mg O_2/L (ref. 1.14555.0001). Para la digestión se utilizó un Termorreactor TR 300 de Merck y para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro Spectroquant® NOVA 30 de Merck (figura III.5).

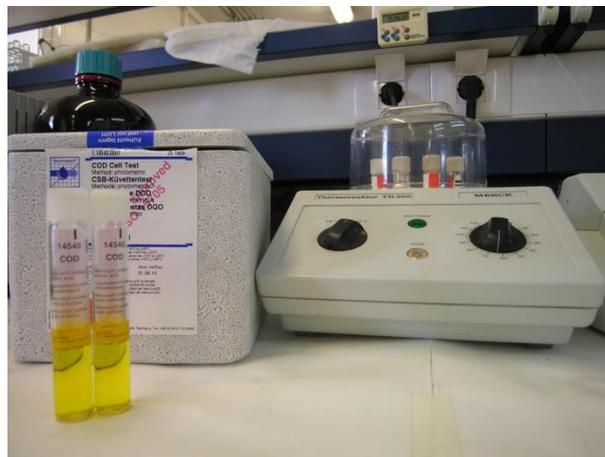


Figura III.5. Termorreactor TR 300 de Merck y espectrofotómetro marca NOVA 30 de Merck para la medida de la DQO.

Procedimiento:

El procedimiento de medida consiste en primer lugar en la homogeneización y filtrado de las muestras (filtros de jeringa Nylon MilliporeMillex® de 0.22 μm). A continuación, se agita por balanceo el tubo de reacción conteniendo dicromato de

potasio y sulfato de plata, hasta que los sólidos depositados en el fondo (sulfato de plata) se disuelven completamente. En este tubo se añaden 3 mL de muestra al tubo, se agita vigorosamente y se introduce en el termorreactor a 148°C durante 2 horas. Pasado el tiempo de digestión, se saca la cubeta caliente y se coloca en un soporte estable para su enfriado. Pasados 10 minutos, se agita la cubeta por balanceo y se deja enfriar a temperatura ambiente (por lo menos 30 minutos). Por último se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 445 nm.

El buen funcionamiento y calidad de las medidas se evaluó mediante el uso de rectas de calibrado externas para cada uno de los kits de medida. Para ello se prepararon disoluciones de concentración conocida de hidrógeno ftalato potásico, que se corresponde con una DQO teórica conocida (todas las medidas se hicieron por triplicado). Las rectas de calibrado calculadas a partir de dichos datos son las siguientes (Ecuaciones III.6, III.7 y III.8):

Rango 4-40 mg O₂/L

$$\text{DQO (mg/L)} = -45.15 \times \text{Absorbancia} + 47.249 \quad \text{Ec. III.6}$$
$$R^2 = 0.9909$$

Rango 25-1500 mg

$$\text{DQO (mg/L)} = 1674.6 \times \text{Absorbancia} - 39.024 \quad \text{Ec. III.7}$$
$$R^2 = 0.9989$$

Rango 500-10000 mg O₂/L

$$\text{DQO (mg/L)} = 4498.5 \times \text{Absorbancia} - 157.98 \quad \text{Ec. III.8}$$
$$R^2 = 1$$

III.3.2.8. Análisis de carbono orgánico disuelto (COD) y nitrógeno total (NT)

Descripción del equipo y fundamento teórico

La cantidad de materia orgánica disuelta en una muestra acuosa se determina mediante diferencia entre el carbono total (CT) y el Carbono Inorgánico Total (CIT). En este trabajo, para llevar a cabo esta determinación, se empleó un Analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu, modelo TOC-VCSN equipado con un muestreador automático (ASI-V) y un detector infrarrojo no dispersivo. (Figura III.6)



Figura III.6. Analizador de carbono orgánico total Shimadzu TOC-VCSN con el sistema TNM-1 utilizado en este trabajo.

En este equipo, el análisis de CT se lleva a cabo mediante la combustión de las muestras en un tubo relleno de un catalizador de platino soportado sobre bolas de alúmina, a una temperatura de 680°C. El CT presente en las muestras se oxida generando una cantidad equivalente de CO₂, que es arrastrada por aire de alta pureza (flujo de 150 mL/min), enfriándose y secándose mediante un deshumidificador. Posteriormente el CO₂ es analizado mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR), que genera picos cuya área es proporcional a la cantidad de carbono presente en la muestra. Esta área es integrada por un procesador de datos acoplado al sistema. Para la medida de CIT, la muestra se introduce en un recipiente de reacción en el que se burbujea aire en presencia de ácido fosfórico (25% p/V). La descomposición de los carbonatos y bicarbonatos (CIT) presentes en la muestra genera CO₂ que se procesa en el NDIR de la misma forma que el CT.

La medida de nitrógeno total (NT) presente en las muestras se realizó en el mismo equipo mediante un Módulo de Nitrógeno Total Shimadzu TNM-1. En este caso, el fundamento de la medida consiste en la descomposición de la muestra para dar monóxido de nitrógeno que mediante ozonización se convierte en nitrito. La medición comienza cuando la muestra entra al tubo de combustión a una temperatura de 720°C. El nitrógeno que forma parte de algún compuesto pasa a monóxido de nitrógeno, oxidándose posteriormente a nitrito en presencia de ozono, y generando picos en el detector de quimioluminiscencia. El área de pico es proporcional a la concentración de NT.

La relación lineal existente entre el área calculada por el procesador de datos y la concentración correspondiente de CT, CIT y NT permite una cuantificación basada en rectas de calibración internas. Estas rectas se elaboran utilizando disoluciones estándar preparadas en agua ultra pura (sistema Milli-Q), de hidrógeno ftalato de potasio para el CT (conteniendo unas gotas de ácido sulfúrico para evitar la contaminación atmosférica de CO₂), una disolución de carbonatos que procede de la mezcla de carbonato sódico y bicarbonato sódico para el CIT y una disolución de nitrato potásico para el NT.

Los rangos correspondientes a las cinco rectas de calibración realizadas para el CT y el CIT respectivamente, fueron los siguientes: 1-10, 10-50, 50-250, 250-1000, 1000-2500 mg/L y 0.5-5, 5-20, 20-80, 80-200, 200-500 mg/L. Mientras que para el NT las rectas de calibración fueron de 1-10 y 10-100 mg/L. Para todas las rectas los coeficientes de regresión lineal se encontraron próximos a 1 y la desviación estándar del equipo fue del 1%. La comprobación del correcto funcionamiento del equipo se llevó a cabo mediante la medida periódica de disoluciones patrón.

Procedimiento

La medida de COD y NT requiere un sencillo tratamiento previo, que consiste en la filtración de unos 15-20 mL de muestra a través de un filtro de Nylon con un tamaño de poro de 0.22 µm (MilliporeMillex® GN). Con este proceso de filtrado se retiran los sólidos en suspensión presentes en la muestra. A continuación las muestras se introducen en un vial específico compatible con el muestreador y se produce la inyección automática de la muestra.

III.3.2.9. Cromatografía iónica. Determinación de aniones, cationes, ácidos carboxílicos y aminos

Fundamento teórico y descripción del equipo

La Cromatografía Iónica (CI) es un método eficaz para la separación y determinación de iones basado en el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio iónico. Esta técnica puede ser utilizada para la mayoría de las moléculas cargadas, incluyendo grandes moléculas como proteínas, pequeños nucleótidos o aminoácidos. Las columnas cromatográficas poseen grupos de anclaje cargados como sitios activos que retienen en mayor o menor grado a los analitos en función de sus

interacciones iónicas (polaridades). Existen dos tipos diferentes de resinas dependiendo de la naturaleza del ión retenido: las resinas de intercambio catiónico, cuyos puntos activos más comunes son los grupos de ácido sulfónico (H^+SO_3^- , ácido fuerte) y de ácidos carboxílicos (H^+COO^- , ácido débil) y por otro lado las resinas de intercambio aniónico, que contienen grupos de amina cuaternaria ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$) o grupos de amina primaria (NH_3^+OH^-). La fase móvil empleada consiste en una solución acuosa (agua ultrapura Milli-Q) provista de iones que compiten con los analitos de los puntos activos de la fase estacionaria (resina). Las fases móviles más utilizadas para la medida de aniones normalmente contienen hidrógeno carbonato/carbonato, hidróxido o una mezcla de ácido bórico y tetraborato, mientras que las fases móviles utilizadas para la medida de cationes contienen normalmente grupos ácidos. En este trabajo se utilizó bicarbonato sódico (0.53 g/L) como fase móvil para medida de aniones y ácidos carboxílicos y una mezcla de acetona (9%), piridina (0.75%) y ácido nítrico 2N (0.085%) disueltos en agua Milli-Q como fase móvil para cationes y aminas. Además se utilizó una disolución de ácido sulfúrico (1%) en agua Milli-Q como disolución regeneradora para la columna de aniones.

En CI existe una amplia gama de detectores (conductímetro, amperométrico, UV, etc) donde se registra la señal obtenida respecto al tiempo. El resultado es un cromatograma donde la posición de los máximos indica el ión presente (análisis cualitativo) y el área corresponde a la concentración de cada ión en la disolución (análisis cuantitativo). El detector más utilizado en cromatografía iónica es el detector de conductividad, que registra cualquier aumento en la conductividad eléctrica de la fase móvil cuando el analito va pasando por el detector una vez separado de la columna de intercambio iónico. Estos detectores son universales para especies cargadas respondiendo de una forma predecible a los cambios de concentración, por tanto pueden tener una elevada sensibilidad. Sin embargo, existe una limitación procedente de la alta concentración de electrolito requerido para eluir la mayoría de los iones o analitos en un tiempo razonable. Por esta razón la conductividad de los componentes de la fase móvil puede enmascarar a los analitos reduciendo así la sensibilidad del detector. Este problema se resolvió en 1975 mediante el uso de una supresora de membrana en la que el eluyente y la disolución supresora fluyen en direcciones opuestas a ambos lados de unas membranas permeables de intercambio iónico, convirtiendo el eluyente en una forma no

iónica de tal forma que los analitos pueden detectarse por su conductividad con mayor sensibilidad..

En este trabajo, para la detección de aniones, cationes, aminas y ácidos carboxílicos se utilizó un cromatógrafo iónico Metrohm IC850 provisto de un muestreador automático Metrohm 858 (6.2041.440), (figura III.7).



Figura III.7. Fotografía del cromatógrafo iónico módulo de Metrohm IC850 y Metrohm 858.

Esta técnica se empleó en este trabajo para la caracterización de aguas residuales y como parte de la evaluación del grado de mineralización de muestras tratadas mediante fotocátalisis solar a través de la medida de iones inorgánicos y la concentración de ácidos carboxílicos formados durante los experimentos. Por otro lado, la medida de ciertas especies como NH_4^+ , NO_3^- y ácidos carboxílicos permitió conocer el nivel de nitrificación y de los tratamientos biológicos estudiados. En la tabla III.1 se muestran todos los iones analizados así como las condiciones de operación del sistema.

En este sistema, las columnas se encuentran durante todo el análisis termostatazadas a una temperatura constante de 45°C. El caudal fijado para los análisis fue de 0.9 mL/min y el tiempo total de análisis 47 minutos.

La señal emitida por el detector del equipo genera un pico cuya área se evalúa mediante una calibración interna. Para ello se realizan rectas de calibrado en un rango determinado. Para aniones, cationes y aminas el rango de concentración fue de 0.1-20 mg/L mientras que en el caso de ácidos carboxílicos estuvo comprendido entre 0.1-5 mg/L.

Tabla III.1. Fase móvil y condiciones de operación (caudales y columnas utilizadas para la medida de aniones, cationes, aminas y ácidos carboxílicos).

IONES	COLUMNA	ELUENTES
Cationes (Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ⁺² , Ca ⁺²)	METROSEP C4-250/4.0 (250 x 4.0 mm) y 5µm	Solución compuesta por: 90mL acetona, 850µL ácido nítrico 2N, 7.5 mL/L ácido piridina-2.6 dicarboxílico
Aminas (Metilamina, etilamina, dimetilamina + propilamina, trimetilamina)		
Aniones (F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻)	METROSEP A Trap 1-100/4.0 (100 x 4 mm) y 570 µm	Solución Na ₂ CO ₃ 5mM (0.53 g/L)
Ácidos carboxílicos (Glicolato, acetato, propionato, formiato, piruvato, dicloroacético (DCA), maleato, oxalato)		

Procedimiento

Para el análisis, las muestras se filtraron previamente con un filtro de Nylon con un tamaño de poro de 0.22µm (MilliporeMillex® GN) y se introdujeron en el muestreador automático del equipo analítico. Las muestras que tuvieron un alto contenido en iones se diluyeron previamente a su filtración. El buen funcionamiento y calibración del equipo se comprobó diariamente mediante disoluciones patrón de cada uno de los iones analizados.

III.3.3. Técnicas de cuantificación microbiana

III.3.3.1. Microscopía óptica

Fundamento teórico:

La microscopía óptica es una técnica de recuento directo y observación de microorganismos en muestras de diversa naturaleza utilizada de forma rutinaria en laboratorio. Esta técnica, aplicada al campo de microbiología del fango, permite realizar un control de la “calidad” del fango mediante la caracterización visual de su estructura, conocida como “flóculo”. La parametrización de diversas características del floculo permiten determinar, en cierta medida, la actividad de dicho fango. El examen microscópico de un fango permite además identificar un amplio número de microorganismos, en especial microorganismos filamentosos, protozoos y metazoos, cuya presencia/ausencia caracteriza también el funcionamiento del sistema de fangos activos de una EDAR.

En este trabajo experimental, el microscopio óptico se utilizó con el objeto de caracterizar de manera visual las comunidades biológicas presentes en un sistema de fango activo, así como la evolución de la población durante el tratamiento biológico de aguas procedentes de la industria corchera, describiendo los posibles cambios en la población durante el estudio.

Procedimiento:

La observación microscópica en fresco es el primer paso hacia la caracterización microscópica de un sistema biológico. Para ello, las muestra de fango activo en contacto con aguas objeto de estudio se agitan con suavidad, con el fin de garantizar una suspensión lo más homogénea posible, evitando alteraciones de la estructura flocular. A continuación se toma una gota con ayuda de una pipeta Pasteur, se deposita sobre un porta-objeto y se coloca encima un cubre-objetos. En este trabajo, la muestra preparada se observó en un microscopio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado con una cámara Nikon DS (figura III.8). Para muestras vivas o sin teñir como es el caso de fangos de depuradora se realizaron observaciones en campo claro y contraste de fases.



Figura III.8. Microscopio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a una cámara Nikon DS utilizado en este estudio.

III.3.3.2. Cultivo microbiano: Recuento en placa

Fundamento teórico:

La técnica de recuento en placa es una de las más empleadas para la cuantificación de poblaciones microbianas debido al fácil manejo y la fiabilidad de resultados. Actualmente este método se utiliza de forma rutinaria en diferentes industrias como la alimentaria (leches o jugos) o en la hospitalaria para el control de procesos patológicos infecciosos. Se basa en la premisa de que cada célula microbiana crece y se divide de forma aislada para generar una sola colonia. Esta premisa no siempre se cumple en el caso de bacterias, ya que pueden crecer formando cadenas o grupos. Por tanto, una colonia no se forma a partir de una sola bacteria, sino de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Se asume que el recuento final de colonias depende de la interacción de los microorganismos presentes en la muestra a analizar y las colonias obtenidas mediante esta técnica pueden surgir de pares, cadenas, clústeres o células individuales, estando todo incluido en el término Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

Esta técnica se basa en la adición de un volumen conocido a una placa Petri conteniendo un medio de cultivo adecuado para el tipo de microorganismo que se desea contabilizar. El crecimiento de un número limitado de colonias en cada placa nos da información

acerca de la población que contiene la muestra. El recuento del número de colonias se expresa en UFC por mililitro o CFU (por sus siglas en inglés), y el cálculo se efectúa mediante la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ de colonias} \times \frac{\text{dilución utilizada}}{\text{volumen de muestreo (mL)}} = \text{UFC/mL} \quad \text{Ec.III.9}$$

El número apropiado de colonias que pueden ser contadas en una sola placa normalmente debe de oscilar entre 30 y 300 UFC. Cuando la concentración microbiana es superior a esa cifra, la muestra debe de ser diluida mediante un proceso de dilución seriada, es decir, disoluciones sucesivas de la muestra manteniendo constante el volumen y permitiendo la reducción progresiva de la concentración.

En este trabajo experimental se ha utilizado el recuento en placa heterotrófico, anteriormente conocido como recuento en placa estándar [Apha Method 9215: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater]. Esta técnica permite estimar el número de bacterias heterótrofas vivas en agua y determinar posibles cambios en la estructura de la población microbiana producidos durante los diferentes tratamientos biológicos. El medio de cultivo utilizado para el recuento en placa de dichos fangos fue TGYE (Tryptone Glucose Yeast Extract Agar). La triptona y el extracto de levadura suministran las fuentes de nitrógeno y vitaminas que se requieren para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos y la glucosa actúa como fuente de energía. La transparencia del medio y el buen tamaño de las colonias al crecer facilitan el recuento bacteriano.

Procedimiento:

El procedimiento comienza con la preparación del medio de cultivo TGYE, para el que se utiliza Triptona (5g/L), extracto de levadura (2.5 g/L), Glucosa (1g/L), Agar (15g/L), a pH 7±2 y se esteriliza en autoclave (121°C, 15 min). Esta disolución se deja enfriar hasta una temperatura de 45-50°C y se vierte el contenido en placas de Petri esterilizadas hasta su completa solidificación. Posteriormente, el medio de cultivo en placa se almacena a 5-8°C hasta su uso, que no excede de un mes desde la fecha de preparación del medio de cultivo.

Las muestras de fangos obtenidas fueron diluidas de acuerdo a un proceso de dilución seriada con PBS (desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶) con el objeto de facilitar el recuento posterior de

colonias. A continuación, sobre la superficie de una placa conteniendo el medio de cultivo sólido se adicionó un volumen de muestra o dilución de 500 μ L, y se extendió suavemente empleando un asa de siembra esterilizada y desechable con una forma típica de “L”. El recuento de colonias se realizó tras 7 días de incubación a una temperatura de 25°C, de acuerdo con el método 9215, dando lugar a los recuentos más altos de esta técnica [Apha, 1995]. Transcurrido este periodo de incubación se seleccionaron las diluciones más apropiadas para el recuento de colonias y se procedió a identificar el número y tipo de colonias que aparecieron en cada dilución.

III.3.4. Técnicas de biología molecular. Análisis genético

III.3.4.1. Extracción y cuantificación del ADN

Fundamento teórico:

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un ácido nucleico que forma parte de las células y contiene la información genética utilizada para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos. La estructura del ADN fue descubierta por el zoólogo James Watson y el físico Francis Crick en 1953 y consiste en dos cadenas o hebras que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada hélice se conforma de una cadena de estructura básicas conocidas como nucleótidos, cada uno de ellos contiene un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada (Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Timina (T)) y un grupo fosfato. Debido a su composición y estructura química, las bases nitrogenadas son complementarias entre sí (A-T y C-G). El orden de estas bases nitrogenadas o secuencia determina las instrucciones biológicas que están contenidas en cada hebra de ADN.

La extracción de ADN constituye la primera etapa de cualquier método de biología molecular. Se trata de un proceso de lisis que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma celular, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen y otra etapa de aislamiento/purificación del ADN que implica la retirada del resto de elementos celulares que pueden interferir en posteriores análisis. El proceso de extracción de ADN es una etapa crítica dado que del rendimiento de la extracción dependerá el éxito en el análisis posterior.

En la actualidad se han comercializado una gran variedad de kits de extracción de ADN específicos para diferentes tipos de muestras, incluyendo sangre, tejidos animales y vegetales, bacterias, levaduras, etc., ya que la extracción de ADN depende del tipo de muestra a analizar [Yoshikawa y cols., 2011].

Tras el proceso de extracción, se lleva a cabo una cuantificación de la concentración de ADN obtenida. Existen varias técnicas como fluorimetría, electroforesis capilar utilizando gel de agarosa, hibridación con sonda o espectrofotometría. Estas técnicas permiten determinar el rendimiento de la extracción y la optimización del proceso. La espectrofotometría es una técnica sencilla basada en la medida de la cantidad de luz ultravioleta que absorben las bases nitrogenadas ($\lambda=254$ nm) del ADN.

Este procedimiento experimental se ha utilizado con el objetivo de extraer (para posterior análisis genético) y cuantificar el ADN presente en muestras de fangos, evaluando la posible variación en la concentración de este ADN en muestras de fangos en contacto con ARC.

Procedimiento:

La extracción de ADN de fangos (figura III.9) se llevó a cabo utilizando el kit comercial FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) y el preparador de muestras FastPrep® (MP Biomedicals). Este kit es específico para suelos, sin embargo se utilizó para la extracción de fangos por similitud entre matrices, ya que no existe un kit específico para la extracción de ADN en fango y se ha demostrado en la literatura su adecuación para este tipo de muestras [Harms y cols., 2003]. El preparador de muestras es un instrumento adicional que favorece la lisis y homogeneización de las muestras de ADN mediante impacto multidireccional con partículas esféricas de cerámica de un tamaño de ¼ de pulgada, favoreciendo por tanto el rendimiento de la extracción de ADN en este tipo de muestras heterogéneas.



Figura III.9. a) Kit comercial utilizado para la extracción de ADN (FastDNA™ SPIN Kit for Soil) b) FastPrep® utilizado para favorecer la extracción del ADN.

Previamente a la utilización de este kit específico, se produce una etapa de preparación de la muestra. Para ello se cogió 1 mL de muestra de fango y se centrifugó a 12000 r.p.m durante 2 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante, dejando 250 µL, que son los que se utilizaron en la extracción.

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo rigurosamente las instrucciones y el material contenido en el kit de extracción, obteniendo finalmente de cada muestra extraída 75 µL conteniendo el ADN. Los principales pasos llevados a cabo para la obtención de ADN de fangos se muestran de manera resumida en la figura III.10. Cada muestra de fango se analizó por duplicado.

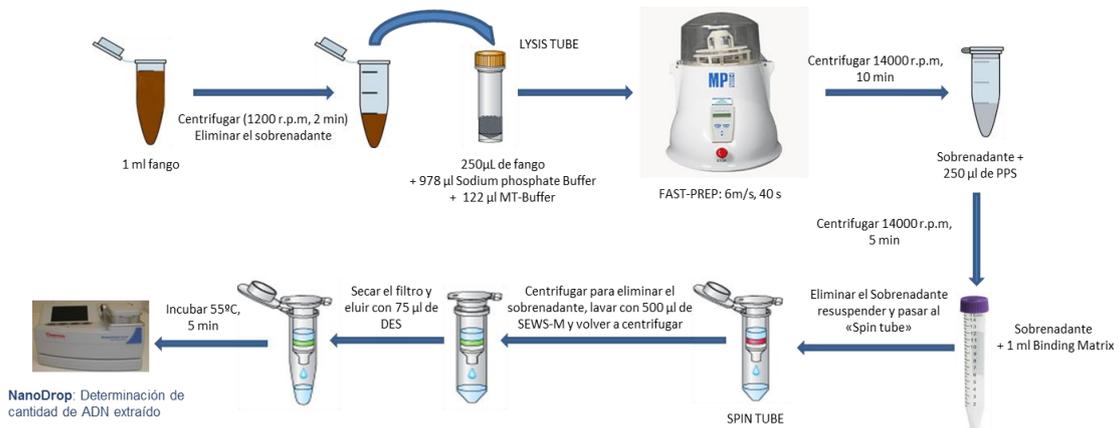


Figura III.10. Procedimiento completo de la extracción de ADN utilizada.

La concentración de ADN extraído y contenido en un volumen de 75 µL se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (ThermoFisher Scientific). Este equipo mide la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm. El procedimiento consiste

en depositar 1 μL de muestra sobre el pedestal del equipo, permitiendo un pipeteo estable y reproducible y utilizando una mínima cantidad del volumen de muestra de ADN. El equipo proporciona directamente la concentración de interés en $\text{ng}/\mu\text{L}$. Las medidas se realizaron por duplicado. El ADN obtenido mediante este procedimiento se conservó a -4°C para su posterior utilización en otras técnicas como PCR, secuenciación masiva y cualquier otra aplicación deseada.

III.3.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

Fundamento teórico:

Desde el descubrimiento de los ácidos nucleicos, han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN. Una de las más importantes es la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction). Esta tecnología fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, que recibió el premio Nobel en 1993 y revolucionó la biología molecular de la época, permitiendo estudiar y manipular el ADN. Desde su aparición, esta técnica ha tenido un gran impacto en diversos campos como en medicina clínica, biología evolutiva y biología forense.

La PCR es una reacción enzimática “*in vitro*” que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, obteniendo copias de la secuencia objeto de estudio. Los equipos en los que se realiza la reacción de PCR se conocen con el nombre de termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo donde las condiciones de temperatura y tiempo sean idénticas para todos los ciclos.

Una de las formas recientes para la detección y cuantificación de los ácidos nucleicos es la conocida como PCR en tiempo real o qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Se trata de una modalidad de PCR convencional que tiene como objetivo la evaluación cuantitativa de las muestras obtenidas en la amplificación del ADN. Las medidas se realizan en tiempo real, es decir, en cada ciclo de amplificación, mediante la detección de fluorescencia liberada por el producto amplificado. Las ventajas frente a la PCR convencional son: método de detección rápido con alta sensibilidad y especificidad, bajo riesgo de contaminación y simplificación del análisis dado que la amplificación y detección del ADN se realiza en el mismo recipiente de reacción.

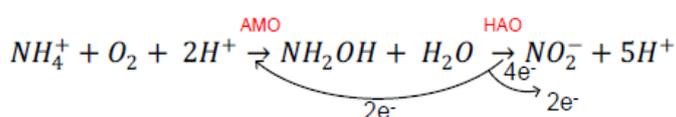
Además del ADN a analizar, los componentes fundamentales para llevar a cabo la qPCR son:

- ADN polimerasa: enzima encargada de la catálisis de la reacción PCR, agregando bases nitrogenadas complementarias para la creación de cadenas completas de ADN. Esta enzima debe de ser capaz de mantener su funcionalidad a temperaturas altas (termoestabilidad) para lograr la especificidad del proceso y que la reacción transcurra exitosamente.
- Primers o cebadores: secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia determinada que se quiere amplificar y son complementarios a dicha secuencia. Se requiere de una pareja de primers, una denominada “forward” o sentido y otra llamada “reward” o antisentido para delimitar la parte del ADN que se quiere amplificar. Las secuencias de los primers específicos para un gen se obtienen mediante técnicas de secuenciación masiva y análisis informáticos. En la actualidad existen laboratorios específicos encargados del diseño y validación de primers de alta especificidad, por lo que se pueden obtener primers con gran facilidad en el mercado.
- Disoluciones tamponadas: para mantener en condiciones óptimas el ADN-polimerasa.
- Sondas fluorescentes: existen numerosos tipos de sondas en el mercado, siendo la TaqMan o Molecular Beacon una de las más utilizadas por su especificidad. Se trata de un oligonucleótido lineal complementario a una secuencia de ADN específico, que contiene un fluoróforo unido al extremo 5' de la cadena y un atenuador o “quencher” en el extremo 3'. A medida que la sonda se hibrida con las bases nitrogenadas se produce una liberación en el extremo 5' del “quencher” produciéndose una emisión de fluorescencia. Esta cantidad de fluorescencia se acumula durante los ciclos indicando la concentración de ADN. Estos valores de fluorescencia se expresan como logaritmos, con el fin de estudiar fácilmente la fase exponencial de la amplificación.

El proceso de PCR consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten, llamados ciclos. Cada ciclo comienza con la desnaturalización o separación de la doble cadena de ADN molde mediante un aumento de temperatura (rango 90-95 °C). Al bajar la temperatura hasta un rango 45-70 °C, tiene lugar la etapa de hibridación entre los

primers añadidos y sus secuencias diana complementarias, uno a cada cadena complementaria del ADN desnaturalizado. A continuación, la temperatura se mantiene entre 60-70°C permitiendo que se lleve a cabo la etapa de extensión y formación de una nueva cadena complementaria mediante la actuación de la enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Cada cadena inicialmente desnaturalizada produce una nueva doble hélice, de tal forma que a partir del ADN molde se obtienen 2^n copias, siendo “n” el número de ciclos en la reacción (figura III.15).

Mediante la correcta elección de todos estos componentes de la reacción qPCR, se obtiene la capacidad de amplificar y cuantificar fragmentos específicos de ADN. En los últimos años esta técnica ha tenido un desarrollo exponencial en análisis de comunidades bacterianas específicas en sistemas de depuración biológicos. La abundancia de estas comunidades es crítica en el diseño y operación de los sistemas de tratamiento de aguas, en especial en comunidades bacterianas que forman parte del proceso de nitrificación. Un ejemplo son las AOB (Ammonium Oxidazing Bacteria), que contienen sistemas enzimáticos del tipo AMO (Amonio monooxigenasa) y HAO (Hidroxilamina oxidoreductasa) capaces de oxidar el amonio para convertirlo en nitrito (Ec. III.10).



Ec. III.10

En este trabajo experimental se ha utilizado la técnica qPCR con el objeto de evaluar la población bacteriana de un fango. Para ello se ha realizado la amplificación y cuantificación de dos tipos de genes: ADN 16S bacteriano y AOB 16S ARNr en las muestras de fango seleccionadas. Así mismo se ha utilizado esta técnica para la realización de una comparativa entre el número total de bacterias y bacterias amino-oxidantes en experimentos biológicos a escala de laboratorio con aguas procedentes de la industria corchera en diferentes etapas del tratamiento.

Procedimiento:

El análisis por qPCR de las muestras de ADN procedentes de los fangos y extraídas mediante el procedimiento descrito anteriormente se realizó utilizando un equipo 7500/7500 Fast Real-time PCR System de Applied Biosystem (figura III.11) que utiliza

una placa de 96 pocillos y una plataforma de cinco colores basados en fluorescencia para proporcionar la detección cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos diana (objetivos) usando análisis en tiempo real. Este equipo recopila datos de fluorescencia en los diferentes ciclos de la PCR en tiempo real y está acoplado a un software 7500 para el procesamiento de datos. El procedimiento sigue los siguientes pasos:

- **Excitación:** El instrumento ilumina todos los pocillos de la placa de reacción dentro del instrumento, excitando los fluoróforos en cada reacción.
- **Emisión:** El instrumento recoge la fluorescencia residual emitida desde los pocillos de la placa de reacción. La imagen resultante recopilada por el dispositivo consiste en un haz de luz que corresponde al rango de longitudes de onda de emisión.
- **Recolección:** El instrumento realiza una representación digital del residuo de fluorescencia recogido durante el intervalo de tiempo analizado, y almacena la imagen para el análisis.

El software 7500 acoplado al equipo utiliza una región de interés y calibraciones internas para determinar la ubicación y la intensidad de la fluorescencia de cada lectura.

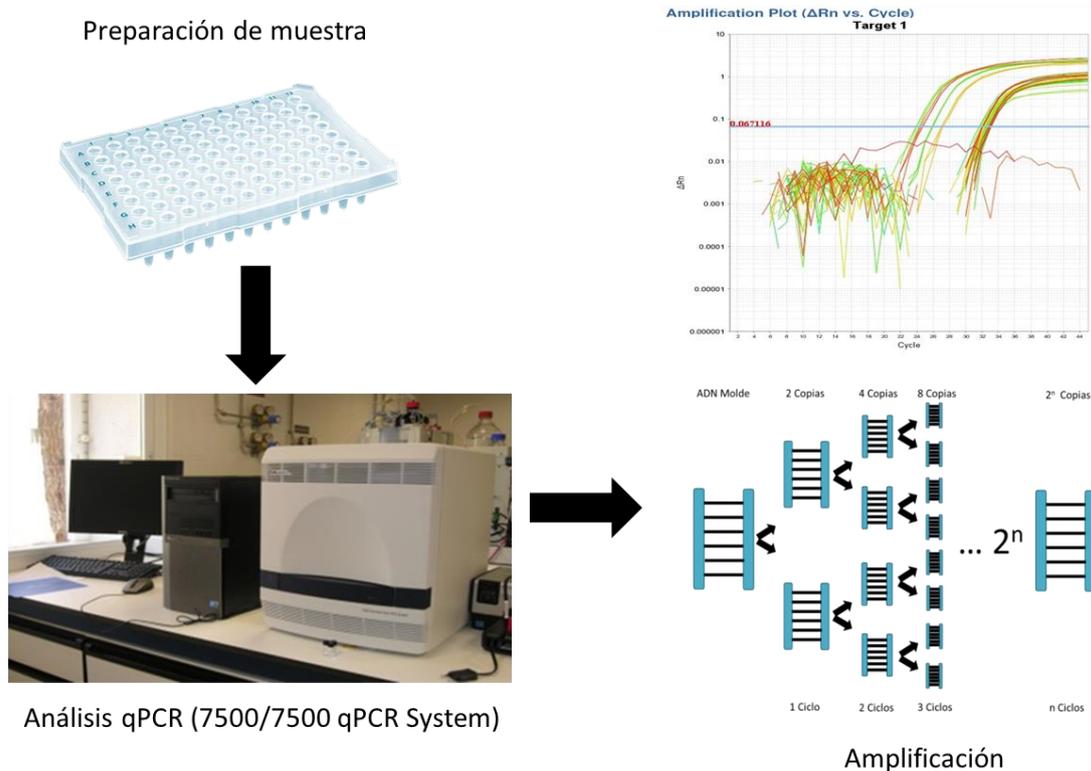


Figura III.11. Esquema del procedimiento qPCR.

En este trabajo de tesis se han analizado y comparado dos tipos de genes: ADNr 16S bacteriano y AOB 16S ARNr de cada una de las muestras de ADN procedentes de los fangos. Cada muestra (diluida 1:10 para evitar la saturación del equipo) se analizó por duplicado. En cada análisis se incluyó el correspondiente control negativo con objeto de verificar la ausencia de contaminación en los resultados obtenidos. El control negativo consta de los mismos componentes que la reacción de PCR seleccionada pero sin ADN muestra. Los componentes y requisitos para llevar a cabo la amplificación de cada uno de los genes seleccionados se obtuvo de la literatura [Harms y col., 2003]. Esta información se resume en las tablas III.2 y III.3.

La cuantificación relativa de las muestras de ADN de fangos se estimó utilizando una curva estándar de amplificación de ADN de concentración conocida reportada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación [Polo-López y cols., 2017]. Para ello se realizaron diluciones seriadas y se aplicó el mismo procedimiento de amplificación de ADN. Los valores de fluorescencia obtenidos tanto en la curva estándar como la cuantificación de resultados se expresaron como logaritmo.

Tabla III.2. Secuencia 5'-3' de los primers y sondas utilizadas para la amplificación de ADNr 16S bacteriano y gen AOB 16S ARNr (Harms y cols., 2003).

Ensayo	Medida	Primer/sonda	Secuencia (5'-3')
16S rDNA	Número total de bacterias (16S rDNA)	1055 f	5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'
		1392 r	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'
		16STaq1115	5'-(6-FAM)-CAACGAGCGCAACCC-(TAMRA)-3'
AOB	Bacterias amino-oxidantes	CTO 189fA/B	5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3'
		CTO 189fC	5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'
		RT1r	5'-CGTCCTCTCAGACCARCTACTG-3'
		TMP1	5'-(6-FAM)-CAACTAGCTAATCAGRCATCRGC-CGCTC-(TAMRA)3'

Tabla III.3. Mezcla de componentes y programa de qPCR para amplificación de ADNr 16S bacteriano y gen AOB 16S ARNr (Harms y cols., 2003).

	16S rDNA	AOB
<i>Componentes</i>		
Primers	1055f (0.4µL) 1392r (0.4µL)	CTO 189fA/B (0.05 µL) CTO 189fC (0.025µL)
Sonda	TaqMan 16S Taq1115 (0.0625 µL)	TaqMan TMP1 (0.03125 µL)
Master Mix	Platinum SuperMix-UDG (12.5 µL)	Universal PCR Master Mix (12.5 µL)
Tampón	MgCl ₂ (2.5µL)	RTlr (0.075 µL)
Agua	8.1375µL	(11.31875 (µL)
ADN	1 µL (Dilución 1:10)	1µL (Dilución 1:10)
Volumen total de reacción/pocillo	25 µL	25 µL
<i>Programa PCR</i>		
Estabilización y desnaturalización	3 minutos a 50°C 10 minutos a 95°C	2 minutos a 50°C 10 minutos a 95°C
Ciclos	45 ciclos: 95°C durante 30 segundos y 72°C durante 20 segundos	40 ciclos: 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 60 segundos

III.3.4.3. Metagenómica. Técnicas de secuenciación masiva

Fundamento teórico:

El término metagenómica se describió teóricamente en 1998 por Handelsman y se utilizó para definir el conjunto de genomas que podían encontrarse en un entorno determinado, aunque su aplicación ha sido bastante posterior. La metagenómica es una tecnología que se basa en el estudio de todo el ADN que podemos encontrar en un sistema específico, permitiendo el estudio de sus comunidades microbianas, y por tanto la capacidad de caracterizar, de forma eficaz, la diversidad genética presente en ciertas muestras. En la actualidad, la metagenómica puede entenderse desde dos perspectivas diferentes: desde el punto de vista filogenético o taxonómico (basado en el estudio del

ADN 5S y del ARNr 16S) y desde el punto de vista funcional (basado en la secuenciación de todo el genoma).

Desde el primer trabajo presentado con datos metagenómicos [Rondon y cols, 2000] hasta ahora, esta tecnología ha tenido un gran desarrollo gracias al uso de nuevos sistemas de análisis y el desarrollo de herramientas bioinformáticas que facilitan el procesado de datos, ofreciendo respuestas más rápidas, económicas y de mayor precisión sobre la información genética contenida en muestras ambientales.

En este desarrollo tecnológico, un gran avance ha sido el establecimiento de las técnicas de secuenciación masiva, (NGS por sus siglas en inglés “Next Generation Sequencing”), permitiendo multiplicar por varios millones el número de bases nitrogenadas obtenidas mediante otras metodologías anteriores (Sanger). Estas NGS se pueden dividir en plataformas con tecnologías de secuenciación de lectura corta o tecnologías de segunda generación (AB Solid, Illumina, 454 Roche y Oxford Nanopore). En este trabajo, se utilizó la plataforma “Illumina” para los estudios de secuenciación masiva. En esta plataforma las reacciones de PCR se llevan a cabo uniendo fragmentos de ADN a cebadores inmovilizados sobre una superficie sólida. Los nucleótidos que se agregan mediante la polimerización del ADN en la reacción se modifican químicamente quedando etiquetados de manera fluorescente. Por tanto, al incorporarse a la amplificación del ADN emiten una señal que se mide mediante TIRF (Fluorescencia de reflexión interna total).

En general, el desarrollo exponencial en los últimos años de las técnicas NGS reside en su alto rendimiento, permitiendo acceder al genoma de numerosos microorganismos eliminando la necesidad de realizar cultivos específicos y laboriosos. Esto constituye una gran ventaja, ya que se cree que con los métodos tradicionales basados en el aislamiento y cultivo previo de microorganismos se “pierde” hasta un 99% de la diversidad bacteriana de una muestra. El conocimiento del metagenoma de un ambiente en particular permite conocer aspectos de la vida microbiana que se esté generando en un sistema concreto, incluyendo la variabilidad de la población microbiana o interacciones ecológicas de cada sistema particular.

El objetivo de la utilización de esta técnica es identificar y/o clasificar las especies microbianas (taxones disponibles y abundancia relativa de cada uno de ellos) presentes

en muestras de fangos, así como determinar el impacto sobre dicha población microbiana durante el tratamiento biológico de aguas procedentes de la industria corchera permitiendo describir los posibles cambios de dicha población sufre a lo largo de dicho proceso.

Procedimiento:

Mediante esta técnica se abordó la identificación de especies a través de la secuenciación de la región 16S a partir del ADN extraído en fases previas del proceso (sección III.3.4.1), de muestras de fangos procedentes de los tratamientos biológicos a escala de laboratorio.

Las muestras de ADN obtenidas en este trabajo experimental fueron enviadas para su análisis por secuenciación masiva a STAB VIDA (laboratorio de análisis genético, en Portugal), donde se utilizó un analizador MiseQ Illumina de Applied Biosystems (figura III.12) para su análisis metagenómico.



Figura III.12. Analizador genético MiseQ Illumina.

El procedimiento llevado a cabo por el laboratorio STAB vida se describe brevemente a continuación:

- Control de calidad de las muestras de ADN enviadas. El objetivo de este análisis previo es garantizar la integridad y cantidad del ADN para obtener una óptima amplificación. Este control consiste en una electroforesis en gel de Agarosa al (1%) de las muestras de ADN, utilizando un campo magnético de 120V y una duración de 20 minutos. Tras ello, se realiza una cuantificación del ADN presente en la muestra

mediante fluorimetría. La concentración necesaria para una óptima amplificación del ADN en cada muestra debe de ser igual o superior a 50 ng/ μ L.

- A continuación se lleva a cabo una amplificación de las regiones variables del gen 16S, V3 y V4, en función de cuya secuencia se clasifican las especies presentes en la muestra. Este paso del procedimiento se realiza mediante el uso de kits comerciales y reacción PCR en termociclador, para este caso en particular, el 16S Metagenomic Sequencing Library preparation.
- La amplificación de estas regiones se secuencia utilizando otro kit comercial, MiSeq Kit v2 empleando la plataforma Illumina MiSeq platform (Figura III.12).
- Por último, los resultados generados durante la secuenciación se analizan utilizando el software Illumina 16S Metagenomics workflow versión 1.0.1, lo que proporciona información sobre la clasificación taxonómica de las muestras analizadas mediante comparación con huellas genéticas conocidas, publicadas y almacenadas en bases de datos específicas y contempladas en el software empleado en este procedimiento analítico.

III.3.5. Bioensayos de toxicidad

El vertido de efluentes, en concreto los industriales, puede ocasionar graves problemas en los ecosistemas acuáticos. Tradicionalmente, el control de los efluentes industriales ha sido regulado midiendo parámetros globales, como la medida de carbono orgánico disuelto (COD) o demanda química de oxígeno (DQO). Sin embargo, estos métodos no proporcionan información suficiente sobre los efectos biológicos que estos efluentes pueden causar al medio ambiente. En la actualidad, los ensayos de biotoxicidad tienen un interés creciente en la evaluación de la peligrosidad potencial de muestras ambientales. Existen diversos ensayos de laboratorio que permiten la determinación experimental de esta biotoxicidad. El uso de una gran diversidad de bacterias en los bioensayos que engloban diferentes especies a modo de bioindicadores y el uso de diferentes especies situadas en diferentes niveles tróficos del ecosistema, es una forma eficiente y esencial para detectar sustancias peligrosas o potencialmente peligrosas en los sistemas acuáticos. Los bioensayos para medir la toxicidad pueden ser clasificados según la especie utilizada, y los efectos provocados por ciertas sustancias en las especies pueden ser inmediatos (agudos) o a largo plazo (crónicos).

En este trabajo se ha realizado un estudio de toxicidad para la evaluación de los efectos reales que podría provocar el vertido directo de ARC, así como la evaluación de los diferentes tratamientos propuestos (sistema biológico aerobio, PAOs, etc) para la correcta descontaminación de las aguas residuales de la industria corchera. Para ello se calculó el porcentaje de inhibición que sufrían ciertas especies al ponerse en contacto con el ARC antes y después de diversos tratamientos.

Para el estudio se utilizaron diferentes kits comerciales, así como técnicas respirométricas como una aproximación real a los valores de toxicidad que las aguas residuales objeto de estudio pueden provocar sobre un tratamiento biológico aeróbico convencional. En todos los casos, el porcentaje de inhibición se calculó mediante la relación entre la respuesta de los bioensayos en muestras reales y un control siguiendo la ecuación III.11.

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{\text{respuesta del control} - \text{respuesta de la muestra}}{\text{respuesta del control}} \right] * 100 \quad \text{Ec. III.11}$$

III.3.5.1. Ensayos de respirometría. Inhibición de fangos activos procedentes de una EDAR

Fundamento teórico y descripción del equipo

Un método muy utilizado para caracterizar el funcionamiento de un sistema de fangos activos es la medida de su actividad respiratoria [Elnabarawy y cols., 1988]. La respirometría se define como la medida de la tasa de respiración (OUR, Oxygen Uptake Rate) de la biomasa viva, y es un indicador de la actividad microbiológica presente en dicha biomasa. Se basa en la medida del consumo de oxígeno de los microorganismos que se encuentran formando parte de un sistema biológico de fangos activos. El consumo de oxígeno puede verse rápidamente afectado en presencia de ciertos inhibidores o contaminantes. Esto se debe principalmente a que ciertos inhibidores afectan a los procesos de respiración bacteriana, generando en ocasiones la muerte de la célula.

En esta técnica, además de conocer la salud del fango activo de un sistema biológico, pueden evaluarse otros parámetros indicadores del buen funcionamiento del sistema como por ejemplo la cantidad de oxígeno requerida para el tratamiento, la capacidad de eliminación de la DQO biodegradable, el carácter degradable del agua a tratar, la

capacidad de eliminación de amonio (proceso de nitrificación) o porcentaje de inhibición (toxicidad) que ciertas aguas pueden provocar en un sistema biológico. Por todas estas características, las técnicas respirométricas pueden ser indicadoras de toxicidad aguda y crónica.

En este trabajo los ensayos de respirometría se llevaron a cabo en un respirómetro BMT-Advance (Surcis S.L), (figura III.17). Este sistema está compuesto por un reactor biológico de 1 L de capacidad, que se subdivide en dos espacios separados por una pequeña membrana que proporciona un espacio en fase anóxica y otro en fase de aireación, existiendo un sistema de recirculación entre ambos espacios mediante una bomba peristáltica. El sistema además está equipado con una sonda de temperatura, un sistema de control de pH y un difusor cerámico para proporcionar la aireación necesaria en el sistema. El sistema de medida de la actividad del fango en función de la tasa de respiración es controlado mediante una sonda de oxígeno (Protos 3400, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG).

El respirómetro dispone de una herramienta informática para el registro de datos y cálculo de los parámetros correspondientes a cada ensayo. Una de las ventajas más importantes de este sistema, es la facilidad de configurar los ensayos mediante el cambio de condiciones (temperatura, pH, oxígeno disuelto) para que sean lo más parecidas posibles a las de un proceso real.



Figura III.13. Fotografía del respirómetro BMT-Advance instalado en el laboratorio.

Procedimiento

Para los análisis de toxicidad (aguda y crónica), la temperatura del sistema se fijó en 20°C y se mantuvo en aireación y agitación hasta alcanzar un valor de oxígeno disuelto constante y en saturación. En ambos casos, la toxicidad se evaluó mediante la comparación de la tasa máxima de respiración de una referencia o control (OUR_{max-ref}) con la obtenida mediante el contacto del agua residual con el fango activo (OUR_{max-muestra}) siguiendo la ecuación III.11.

Para la evaluación de los valores de toxicidad aguda, el sistema trabajó en modo dinámico, es decir, la aireación y recirculación estuvieron activas durante todo el ensayo. El método de análisis consistió en la adición de 1 L de fango activo procedente de una EDAR convencional (sin adaptación previa a los efluentes que iban a recibir) al reactor biológico del sistema respirométrico. A continuación, el fango se mantuvo en continua aireación hasta su saturación de oxígeno. Finalmente, se introdujo la muestra en el reactor y comenzó el análisis. La concentración de biomasa del fango activo fue necesaria para la realización de las medidas, por tanto se realizó un cálculo previo de SST y SSV del fango activo.

La preparación de la referencia consistió en la adición de 30 mL de agua destilada conteniendo 0.5 g de acetato sódico por cada gramo de sólidos volátiles, a un litro de fango activo. La preparación de la muestra consistió en la adición de 30 mL de agua residual a un pH 6.5-7.5 a 1L de fango activo con condiciones idénticas a la referencia.

En todos casos los tiempos de respuesta fueron inferiores a 30 minutos debido a que el interés fue medir la toxicidad aguda de los fangos y no la velocidad de adaptación de los mismos a las aguas residuales. Es importante que los fangos activos no pierdan actividad durante la realización de los diferentes ensayos, para ello, se repitieron varios ensayos de referencia (que dieron la misma respuesta), asegurando así que cualquier efecto de inhibición era debido a la toxicidad de las muestras estudiadas y no al estado de los fangos activos.

Para la evaluación de los valores de toxicidad crónica, el sistema trabajó en modo estático. En este modo de trabajo, una vez programado el ensayo, la bomba peristáltica y la aireación paran de forma automática. En este caso, se realizó una comparación entre la relación de pendientes de un control (fango activo) con respecto al mismo fango

activo en contacto con las aguas residuales objeto de estudio en diferentes puntos representativos de la línea de tratamiento propuesta. Tras los tiempos de contacto elegidos, se llevaron a cabo las medidas de las pendientes correspondientes a la tasa de respiración (cuando se detiene la aireación del sistema). Por tanto, se trata de una medida de la capacidad de adaptación de los fangos a las aguas residuales objeto de estudio. Al igual que en ensayo dinámico, fue necesario el cálculo previo de los valores de SST y SSV.

III.3.5.2. Bioensayo basado en la actividad bioluminiscente de la bacteria *Vibrio fischeri* (30 minutos y 24 horas)

Fundamento teórico

Vibrio fischeri (*Photobacterium phosphoreum*, NRRL B-11177), es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa de la familia Vibrionaceae, cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción e luz por parte de ciertos organismos vivos) (figura III.14). Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz, así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas. En general, las especies pertenecientes a esta familia se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce, en asociación simbiótica con otros organismos, como por ejemplo peces teleósteos que habitan en zonas profundas del mar [Baumann y cols., 1980].

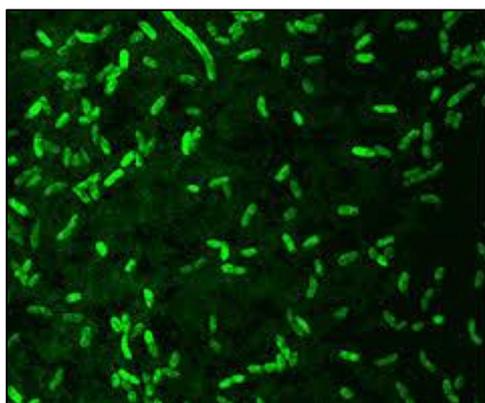


Figura III.14. Imagen de luminiscencia de *Vibrio fischeri*.

Las reacciones de luminiscencia se basan en la oxidación química de compuestos orgánicos catalizada por la enzima luciferasa en la que se libera energía en forma de luz verde-azulada a una longitud de onda de 490 nm. Las diferencias en la cantidad de luz

producida se correlacionan con el metabolismo del organismo. Esta característica se usa para evaluar la toxicidad. Los productos químicos o una mezcla de productos químicos presentes en muestras acuáticas pueden afectar el metabolismo del microorganismo, y por lo tanto, reducir la cantidad de luz emitida.

Procedimiento

En este trabajo se han empleado kits comercialmente conocidos como BioFix®Lumi “Multi-shot” de bacterias luminiscentes para 200 determinaciones de Macherey-Nagel (referencia 945 007), que incluyen una solución reconstituyente. La preparación y medida de muestras se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y el método estándar ISO 11348-3, 1998. La bacteria liofilizada contenida en el kit comercial se mantuvo a -20°C en el congelador hasta su uso, activándose mediante el procedimiento de operación estándar incluido en el kit. Se realizó un control positivo utilizando una disolución de NaCl y un control negativo utilizando una disolución de K₂CrO₇ (18.7 g/L Cr⁶⁺). Además se utilizó NaCl para la corrección de la salinidad de las muestras (concentración final de 20 g/L).



Figura III.15. Termoblock, Luminómetro Biofix®Lumi-10, kit BioFix®Lumi “Multi-shot” (solución reconstituyente, viales de bacteria liofilizada y solución salina 2% de NaCl 20g/L).

La bioluminiscencia se midió después de 30 minutos de exposición para evaluar la toxicidad aguda y tras 24 horas de exposición para la evaluación de la toxicidad crónica.

El Luminómetro utilizado para las medidas es conocido comercialmente como Biofix®Lumi-10 (Macherey-Nagel) y dispone de un detector “Ultra Fast Single Photon Counter” (contador ultra rápido de fotones) con un rango espectral de 380 a 630 nm. La señal detectada fue registrada mediante porcentaje de inhibición. La temperatura se mantuvo constante durante el ensayo a 15°C en un termoblock (figura III.15).

III.3.5.3. Bioensayo basado en el crustáceo de medio salino-salobre *Artemia franciscana* (24 horas)

Fundamento teórico

La *Artemia franciscana* (figura III.16) es una especie de pequeño crustáceo perteneciente al orden Anostraca que habita en aguas con altas concentraciones de sal. El uso de esta especie se ha extendido en aplicaciones toxicológicas debido a su disponibilidad comercial en forma de quistes secos, los cuales pueden eclosionar en condiciones estandarizadas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH [Sogeloos y cols., 1987; Nunes y cols., 2006; Carballo y cols., 2010; Kokkali y cols., 2011].



Figura III.16. Imagen de la especie *Artemia Franciscana*.

Procedimiento

En este trabajo se ha realizado un bioensayo (24 horas) basado en la especie *Artemia Franciscana*. Estos análisis de toxicidad aguda se fundamentan en la determinación de la mortalidad “in vivo” de la especie. Para ello emplearon kits comerciales Artoxkit M (figura III.17) y se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante.



Figura III.17. Kit Artoxkit M utilizado.

Los quistes se almacenaron en oscuridad y a una temperatura de 5°C hasta su utilización. Previo al análisis, los quistes se incubaron durante 30 horas a 25°C para su eclosión. Se realizó un control negativo utilizando un estándar de agua marina y un control positivo utilizando K_2CrO_7 (Panreac, Barcelona, pureza 99%, 3.2 mg/L Cr^{6+}).

El ensayo se realizó en pequeñas placas Petri contenidas en el kit comercial. El procedimiento consistió en poner en contacto la especie con las muestras en la placa Petri. Después de 24 horas de contacto con las muestras, se midió la población superviviente para detectar el porcentaje de inhibición utilizando un microscopio de disección. La especie se consideró muerta si no se observaba movimiento a partir de 10 segundos.

III.3.5.4. Bioensayo basado en el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna* (48 horas)

Fundamento teórico

La especie *Daphnia Magna* es un invertebrado planctónico, que se encuentra dentro del grupo de los cladóceros y es denominada comúnmente como lía de agua o pulga de agua por su pequeño tamaño y forma característica de nadar en medio acuoso. Esta especie representa uno de los organismos comúnmente utilizados para análisis de toxicidad debido a su facilidad de cultivo en laboratorio, la sensibilidad a condiciones ambientales, la reproducción partenogénica (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida que presenta con la producción de un elevado número de crías. Los análisis de toxicidad con *Daphnia magna* (figura III.18), se basan en la determinación del porcentaje de inhibición (medida de la ausencia de movilidad) de esta especie causada por la exposición a las muestras.



Figura III.18. Imagen de la especie *Daphnia magna*.

Procedimiento

En este trabajo se ha realizado una prueba de inmovilización de 48 horas basada en la especie *Daphnia magna* de acuerdo con el procedimiento operativo estándar de Daphtoxkit FTM magna (1996) [Daphtoxkit, 1996] y el procedimiento estandarizado de la OECD 202,2004. Para ello se emplearon kits comerciales (figura III.19). Con estos kits se puede valorar la ecotoxicidad en vertidos industriales utilizando individuos juveniles de *Daphnia magna* desarrollados en 3-4 días a partir de huevos de resistencia (efipias) uniformes, obtenidos después de tres generaciones partenogenéticas.



Figura III.19. Kit Daphtoxkit FTM magna utilizado.

Para la preparación de las muestras se siguieron las especificaciones del kit comercial. Se realizó un control positivo y otro negativo de las muestras. El negativo se basó en la utilización de un medio estándar de agua dulce y el positivo consistió en la utilización de K_2CrO_7 (Panreac, Barcelona, pureza 99%, 3.2 mg/L Cr^{6+}). Las muestras se

mantuvieron a una temperatura constante de 20°C. Después de 48 horas de exposición, se registró el número de organismos inmóviles y se calculó el porcentaje de inhibición.

III.3.5.5. Bioensayo basado en la actividad del protozoo ciliado *Tetrahymena termophyla* (24 horas)

Fundamento teórico

Tetrahymena termophyla (figura III.20) es un protozoo ciliado libre-nadador y su tamaño es aproximadamente 20 x 50 µm. Se encuentra con frecuencia en estanques de agua dulce y su abundancia puede indicar ambientes acuáticos saludables. También juega un papel importante como consumidor de microorganismos en ambientes acuáticos y del suelo, controlando la producción de bacterio-plancton [Gerhardt y cols., 2010]. Este protozoo es fácilmente cultivable en grandes cantidades a escala de laboratorio en un medio químicamente definido y es por ello uno de los organismos recomendados para el análisis de riesgo ambiental [Pauli y Berger, 2000].

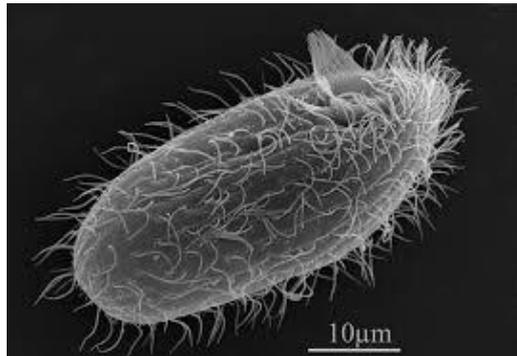


Figura III.20. Imagen de la especie *Tetrahymena termophyla*.

Procedimiento

En este trabajo se ha utilizado un kit comercial Protoxkit F (figura III.21) basado en la especie *Tetrahymena termophyla* para realizar una prueba de crecimiento de 24 horas de esta especie según el procedimiento operativo estándar Protoxkit F, 1998. Este bioensayo se basa en la medida de lecturas de densidad óptica. La inhibición del crecimiento de los cultivos bajo estrés de toxicidad se refleja por la permanencia de la turbidez del sustrato-alimento suspendido (con una consecuente mayor densidad óptica) en comparación con un control.

Para la realización del test se siguieron las instrucciones marcadas por el kit comercial. El inóculo del protozoo a una concentración inicial de 100 células/mL se expuso a las muestras de agua residual durante 24 horas. La densidad óptica se midió al comienzo y al final de la prueba. Se utilizó agua desionizada como control negativo y K_2CrO_7 (56 mg/L Cr^{6+}) como control positivo. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se calculó el porcentaje de inhibición.



Figura III.21. Kit Protoxkit F utilizado.

III.3.6. Análisis de biodegradabilidad mediante respirometría

En las aguas residuales están contenidas una serie de sustancias que pueden ser utilizadas como alimento por los microorganismos presentes, siendo eliminadas de esta forma de las aguas residuales, denominándose, por esta razón biodegradables.

La respirometría es una técnica eficaz a la hora de caracterizar un agua residual, ya que la carga orgánica de un agua residual es proporcional tanto a la tasa de respiración como a la DQOb (fracción biodegradable de la DQO). Cuanto mayor sea la DQOb mayor será la tasa de respiración máxima. Además, para una misma carga orgánica, el aumento progresivo de la tasa de respiración es indicativo de un aumento de la actividad del fango activo. La relación de la DQOb con la DQO total (ecuación III.12) nos indica el carácter biodegradable de una muestra a tratar.

$$\text{Biodegradabilidad} = \frac{DQO_{total}}{DQO_b} \quad \text{Ec. III.12}$$

La respirometría es una técnica complementaria a las medidas de DBO_5 o DQO. En este caso se analiza el comportamiento del fango cuando una muestra pasa a mezclarse con

el mismo, por tanto, la demanda de oxígeno se mide a partir del comportamiento del fango y no por una medida química en la muestra.

Procedimiento

Para los ensayos de respirometría se ha utilizado el respirómetro respirómetro BM-Advance (Surcis S.L) descrito en la sección III.3.5.1., trabajando en modo dinámico. El método de análisis consistió en la adición de 900 mL de fango activo procedente de una EDAR convencional (sin adaptación previa a los efluentes que iban a recibir) al reactor biológico del sistema respirométrico. A continuación, el fango se mantuvo en continua aireación hasta su saturación de oxígeno. Finalmente, se introdujeron 100 mL de muestra (pH 6.5-7.5) en el reactor y comenzó el análisis. Para la determinación de la DQOb, fue necesaria además la adición previa al sistema de un inhibidor de la nitrificación (Allil Tiourea) en la proporción de 2 - 3 mg por cada gramo de SSV.

Según las instrucciones del sistema utilizado, una muestra es considerada altamente biodegradable cuando la relación DQO/DQOb es mayor de 0.8; biodegradable si el valor está comprendido entre 0.7 y 0.8; lentamente biodegradable cuando el ratio es de 0.3-0.7; ligeramente biodegradable cuando la proporción está entre 0.1-0.3 y no biodegradable cuando es menor de 0.1.

III.3.7. Pre-tratamiento físico-químico de muestras: Coagulación/floculación

En general, las aguas residuales industriales presentan color y turbidez, causado principalmente por la presencia de partículas muy pequeñas denominadas partículas coloidales que permanecen en suspensión durante tiempos prolongados. Por ello, una parte importante del tratamiento de aguas residuales está relacionada con la eliminación de estas partículas. Los tratamientos físico-químicos basados en procesos de coagulación/floculación (C/F) permiten la disminución o eliminación de color y turbidez en aguas residuales, así como una pequeña fracción de CT.

El proceso consiste en la alteración del estado físico de determinadas partículas coloidales, convirtiéndolas en partículas susceptibles de un proceso de separación por sedimentación o filtración. Este proceso se lleva a cabo mediante la adición al agua residual de determinados compuestos químicos denominados coagulantes y floculantes, y su posterior mezclado (agitación) en unas determinadas condiciones. Los coagulantes

provocan la desestabilización de las partículas coloidales debido a la eliminación de las dobles capas eléctricas que las rodean, dando lugar a la formación de núcleos microscópicos. Los floculantes provocan la aglomeración de los núcleos microscópicos, formando aglomerados de mayor tamaño denominados flóculos. En general, el proceso de C/F consta de 3 etapas:

- **Mezcla rápida:** Permite la interacción del agua residual con el coagulante o floculante mediante una agitación física rápida, promoviendo el choque de partículas y favoreciendo la desestabilización de partículas coloidales.
- **Mezcla lenta:** Consiste en un proceso de agitación física de la masa coagulada a una velocidad baja, favoreciendo la agrupación de partículas y la formación de aglomerados capaces de sedimentar con facilidad.
- **Sedimentación:** Consiste en dejar la mezcla en reposo durante un tiempo determinado para la sedimentación de aglomerados, favoreciendo la clarificación del agua residual para su posterior decantación o filtrado.

El resultado es un agua residual con menores valores de color, turbidez y generalmente COD que la inicial. Sin embargo, es importante que el proceso de C/F se optimice correctamente para cada tipo concreto de agua residual, ya que la formación de un flóculo muy pequeño o ligero produce una decantación insuficiente y por tanto el proceso puede no ser efectivo. Entre las variables fundamentales que afectan al proceso de C/F se encuentran el tipo de coagulante o floculante utilizado, la dosis en que se emplea, el pH del medio y el tiempo de agitación de la mezcla coagulante/floculante/agua residual. Entre estas variables, la dosis es uno de los factores más importantes, ya que altas cantidades de coagulante o floculante podrían producir la inversión de la carga de la partícula coloidal, conduciendo a la formación de una gran cantidad de microflóculos con tamaños muy pequeños cuya velocidad de sedimentación es baja, por tanto, se produciría el aumento de la turbidez en las muestras.

Generalmente, los tratamientos físico-químicos se utilizan como una etapa de depuración complementaria a otros tratamientos, siendo capaces de aumentar la eficiencia de posteriores procesos de oxidación química [Wang y cols., 2011; Papaphilippou y cols., 2013].

En este trabajo se optimizó un pre-tratamiento físico-químico basado en experimentos de C/F para ARC, como etapa previa a diversos PAOs (foto-Fenton solar y ozono). Para ello se utilizaron coagulantes y floculantes comerciales. La optimización se llevó a cabo a escala de laboratorio en un sistema “Jar-test” (en inglés). Las condiciones óptimas se utilizaron para llevar a cabo el proceso a escala planta piloto. La turbidez y COD se seleccionaron como parámetros de respuesta, pudiendo evaluarse la eficacia del proceso mediante el porcentaje de eliminación. Para ello se utilizó la ecuación III.13.

$$\% \text{ Eliminación} = \frac{\text{COD o turbidez inicial} - \text{COD o turbidez final}}{\text{COD o turbidez inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. III.13}$$

III.3.7.1. Coagulantes y floculantes seleccionados

En este trabajo, se seleccionaron seis coagulantes comerciales (QUIFLOC 225-K, ECOTAN BIO, QUIFLOC NT-520, QUIFLOC E-500, ECOMIX PX y QUIFLOC HA), así como dos coagulantes comúnmente utilizados para el tratamiento de C/F en aguas residuales (FeCl_3 anhidro y $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Los floculantes comerciales seleccionados fueron QUIFLOC AC/9800, QUIFLOC 2030/W y QUIFLOC AC-6010. En la tabla III.4 se presentan algunas características de los coagulantes y floculantes comerciales seleccionados.

QUIFLOC 225-K: Se trata de una sustancia de aspecto líquido transparente incoloro, efectiva en un amplio rango de pH. Es un producto muy utilizado en depuración de aguas y deshidratación de fangos, siendo capaz de sustituir total o parcialmente a los coagulantes inorgánicos. Su uso está recomendado en la decantación secundaria de fangos biológicos procedentes de digestiones, tanto aerobias como anaerobias, favoreciendo su rápida sedimentación y respetando la flora bacteriana presente en el sistema. Además es eficaz en la precipitación de tensoactivos aniónicos.

ECOTAN BIO: Es un coagulante natural de carácter catiónico que se extrae de la corteza de la Acacia Negra (*Acacia mearnsii*). Presenta una fuerte acción coagulante que actúa en sistemas de partículas coloidales en aguas residuales neutralizando las cargas y aglutinando (coagulando) las partículas en suspensión. Debido a su carácter natural y que no presenta metales en su estructura, no consume alcalinidad del medio, ya que no sufre hidrólisis en solución y su eficacia como coagulante es óptima.

Tampoco altera el pH del sistema ni aporta productos tóxicos, favoreciendo los procesos biológicos y posterior reutilización del fango.

Tabla III.4. Características físico-químicas de los coagulantes y floculantes comerciales seleccionados.

Nombre	Descripción	pH	Rango efectivo pH	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (cp)
COAGULANTES					
QUIFLOC 225-K	Homopolímero de cloruro de dialildimetilamonio en solución acuosa	4-7	Amplio	1.05	500-2000
ECOTAN BIO	Coagulante de base natural vegetal derivado de la Acacia	4.5-9	-	-	-
QUIFLOC NT-520	Polímero catiónico en solución acuosa	2-3	-	1.02-1.10	-
QUIFLOC E-500	Mezcla de coagulantes orgánicos e inorgánicos en solución acuosa	1-3	Amplio	1.27	200-1500
ECOMIX PX	Coagulante en base de aluminio y sin cloruros	-	4.5-9	-	-
QUIFLOC HA	Policloruro de aluminio (17±5%)	-	-	1.38	-
FLOCULANTES					
QUIFLOC AC/9800	Copolímero catiónico de acrilamida en emulsión base hidrocarburos	-	Amplio	1.05	<3000
QUIFLOC 2030/W	Copolímero aniónico de acrilamida en dispersión acuosa	3-5	6-14	1.20	<3000
QUIFLOC AC-6010	Copolímero catiónico de acrilamida en emulsión base hidrocarburos	-	Amplio	1.03-1.05	300-1500

QUIFLOC NT-520: Es un coagulante natural de bajo peso molecular y color marrón oscuro que actúa sustituyendo total o parcialmente a los coagulantes inorgánicos. Se

puede utilizar como “emulsión breaker” y como agente quelatante de metales en disolución. Es muy efectivo en la industria papelera, metalúrgica, curtidos e industria química, aunque se puede utilizar también en plantas convencionales de tratamiento de aguas. En cuanto a los fangos, se utiliza para espesar lodos primarios y para incrementar la carga de sólidos en procesos de desbaste mecánico.

QUIFLOC E-500: Se trata de un coagulante de amplio espectro, efectivo en un amplio rango de pH y que actúa mejorando la clarificación de aguas en cualquier tratamiento en combinación con floculantes de alto peso molecular. Se utiliza con éxito en numerosas industrias tales como: industria química, alimentaria, textil, de curtidos, pinturas, petroleras, industrias de lavado de envases, metalurgia y galvanía. Además puede actuar como agente decolorante en efluentes con elevado contenido en tintes y colorantes.

ECOMIX PX: Es un coagulante sintético de color amarillento y de naturaleza orgánica. Su materia activa se compone de un copolímero catiónico y otros componentes, como agua y alumbre aluminico. Es un coagulante exento de cloruros y diseñado para procesos de separación físico-química por decantación o flotación. Se caracteriza por una elevada acción coagulante y parcialmente floculante. Está diseñado para el tratamiento de aguas residuales sobre todo de la industria textil y papelera.

QUIFLOC HA: Se trata de una disolución de policloruro de aluminio que presenta una riqueza (Al_2O_3) del $17 \pm 0.5\%$. Se puede emplear sólo o en combinación con floculantes.

QUIFLOC AC/9800-P: Es un floculante catiónico de alto peso molecular y efectivo en un amplio rango de pH. Por su estructura altamente reticulada este producto está especialmente indicado para su aplicación en centrífugas de alta velocidad ya que combina la formación de un flóculo grande y resistente con un excelente desbaste. Puede actuar sólo o en combinación con otros productos muy utilizados en tratamientos de aguas como sulfato de alúmina, policloruro de aluminio, cloruro férrico o poliamina. Si se combina con un floculante aniónico se obtiene una floculación más completa y resistente (tratamiento dual). Su alto contenido en centros activos lo hace especialmente interesante para aquellas aplicaciones donde el consumo de floculante es elevado.

QUIFLOC 2030/W: Es un floculante catiónico de alto peso molecular y eficaz en un amplio rango de pH (6-14), que puede actuar sólo o en combinación con otros productos habituales en tratamientos de aguas (sulfato de alúmina, policloruro de aluminio, cloruro férrico o poliamina). Tiene un aspecto de líquido opaco blanco lechoso. Se utiliza con éxito en numerosas industrias como por ejemplo la industria química, textil, curtidos, alimentaria, pinturas, petróleo, lavado de envases, mataderos, metalúrgica y galvánica. Esta sustancia es especialmente útil en tratamientos de efluentes donde la separación debe realizarse por flotación.

QUIFLOC AC-6010: Es un líquido blanquecino opaco de carácter catiónico y peso molecular muy alto. Resulta útil en un amplio abanico de aplicaciones proporcionando buenos resultados en procesos de deshidratación de fangos, especialmente en centrífugas. Es efectivo en un amplio rango de pH y al igual que el QUIFLOC 2030/W puede actuar sólo o en combinación con otros productos habituales en los tratamientos de aguas (sulfato de alúmina, policloruro de aluminio, cloruro férrico o poliamina). Su alto contenido en centros activos lo hace especialmente interesante para aquellas aplicaciones donde el consumo de floculante es elevado.

III.3.7.2. Ensayos a escala de laboratorio utilizando un sistema “Jar-test”

Fundamento teórico y descripción del equipo

La prueba más representativa para determinar el comportamiento de un coagulante o floculante en un agua residual a escala de laboratorio es el ensayo “jar-test”. Se trata de un método de simulación de un proceso de C/F, que sirve para la optimización, a escala de laboratorio, de las variables físicas y químicas que afectan al mismo (pH, dosis de coagulante o floculante o tiempos de agitación).

En este trabajo, los ensayos de C/F se realizaron en un sistema Jar-test Modelo JT60E (OVAN) disponible en el laboratorio de la PSA (figura III.22). Se trata de un equipo digital con 6 posiciones diseñado para vasos de ensayo de 1 litro de capacidad. El equipo dispone de control de velocidad, lo que permite realizar la agitación rápida, lenta y decantación en el propio recipiente.



Figura III.22. Sistema Jar-test disponible en el laboratorio.

Procedimiento

En este trabajo, los tiempos de contacto y la velocidad de agitación se fijaron en los siguientes valores: 3 minutos de mezcla rápida a 100 r.p.m., 30 minutos de mezcla lenta a 30 r.p.m. y 30 minutos de sedimentación.

El procedimiento consistió en colocar cada uno de los vasos de ensayo conteniendo el agua residual debajo de cada una de las paletas de agitación del sistema “jar-test”. A continuación se añadieron diferentes dosis de los coagulantes y floculantes seleccionados para el estudio.

Después de un periodo de agitación rápida (3 minutos) y lenta (30 minutos), las paletas agitadoras se levantaron y se esperó un tiempo de 30 minutos para la sedimentación de los flóculos. Finalmente se determinaron los porcentajes de eliminación de turbidez y COD del sobrenadante mediante la ecuación III.13.

III.3.7.3. Ensayos de coagulación/floculación/filtración a escala planta piloto

Fundamento teórico y descripción del equipo

Las condiciones óptimas obtenidas para el proceso C/F mediante el ensayo “jar-test” se llevaron a escala planta piloto. Para ello, se utilizó una planta piloto de coagulación/floculación/filtración disponible en la PSA (figura III.23).

La planta consiste en un mezclador cónico de 200 L de capacidad acoplado a un sistema de filtración. El mezclador dispone de un sistema de control de velocidad, permitiendo la reproducibilidad de los tiempos de contacto con las dosis adecuadas de coagulante/floculante y favoreciendo la sedimentación de los flóculos. Por otro lado, el

sistema de filtración está compuesto por dos tanques de almacenamiento de 500L de capacidad conectados a dos bombas que operan en modo manual o automático, un filtro sílex modelo SETA 16x44 (PEVASA) de 75µm y dos microfiltros de cartucho AMETEK de 25 µm y 5 µm. Este sistema permite trabajar a un caudal de agua máximo de 1m³/hora. El filtro sílex dispone de un dispositivo de operación y lavado automáticos, así como un regulador de caudal y manómetros para la lectura de la presión.



Figura III.23. Fotografía del sistema de coagulación/floculación/filtración disponible en la PSA.

Procedimiento

Tras la recepción del ARC en el laboratorio de la PSA, se introdujo en un tanque cónico de 200L de capacidad y se procedió a realizar el tratamiento de C/F según las condiciones óptimas de coagulante/floculante obtenidas mediante un análisis previo a escala de laboratorio utilizando un sistema “jar-test”. A continuación se fijaron las condiciones de mezcla requeridas (3 minutos de agitación rápida, 30 minutos de agitación lenta y 30 minutos de sedimentación). Transcurrido el tiempo de sedimentación, el sobrenadante se introdujo en el sistema de filtración. El proceso de filtrado consistió en el paso del agua residual por tres filtros consecutivos (un filtro de arena o filtro sílex, un microfiltro de 25 µm y un microfiltro de 5 µm).

III.3.8. Reactor biológico tanque agitado a escala de laboratorio

Fundamento teórico y descripción del equipo

En este trabajo, se utilizó un sistema biológico a escala de laboratorio para evaluar la adaptación de fangos activos procedentes de una EDAR convencional a ARC antes y después de un tratamiento de oxidación avanzada, con el objetivo de encontrar el mejor sistema de depuración para este tipo concreto de aguas y reducir los costes de operación asociados. Para ello, se utilizó como biorreactor un tanque cilíndrico de vidrio de 5 L de capacidad (17.5 cm de profundidad y 16.5 cm de diámetro interno) provisto de un difusor poroso de aire que se coloca en el fondo del reactor para mantener la concentración de oxígeno disuelto cerca de los valores de saturación (figura III.24). También se incluyó un agitador magnético para la agitación del sistema. La temperatura promedio de todos los experimentos fue aproximadamente de 25°C.

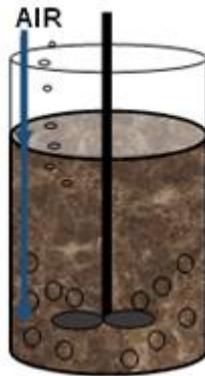


Figura III.24. Diseño del reactor biológico a escala de laboratorio utilizado.

Procedimiento

Inicialmente, el fango activo procedente de una EDAR convencional se mantuvo en aireación durante 24 horas para alcanzar la fase endógena. A continuación se ajustó el pH de las muestras a analizar a 7. Ambos sistemas se mezclaron en el biorreactor con la proporción adecuada para simular los valores de COD que pueden encontrarse habitualmente en una EDAR convencional. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

III.3.9. Plantas piloto para la descontaminación de aguas mediante procesos avanzados de oxidación

III.3.9.1. Planta piloto para fotocátalisis homogénea (proceso foto-Fenton solar): Captador Parabólico Compuesto (CPC)

Fundamento teórico y descripción del equipo

Los experimentos de fotocátalisis solar homogénea realizados en este trabajo se han llevado a cabo utilizando un prototipo de Captador Parabólico Compuesto (CPC) instalado en la PSA (figura III.25). Este prototipo se instaló en la PSA como consecuencia de una de las tareas del proyecto europeo CADOX (Contrato nº EVK1-CT-2002-0122) perteneciente al quinto programa marco de la Comisión Europea (“Key Action”: Sustainable Management and Quality of Water”). El prototipo fue diseñado y construido para el tratamiento de aguas residuales mediante foto-Fenton solar.



Figura III.25. Fotografía del captador CPC utilizado para reacciones de foto-Fenton solar.

El circuito hidráulico del reactor está formado por un tanque de recirculación esférico de vidrio borosilicatado, una bomba centrífuga, cuatro módulos de captadores CPC con una superficie total irradiada de 4.16 m^2 , tubos de vidrio borosilicatado, tuberías opacas

de conexión y válvulas de polipropileno inerte de 3/4" de diámetro interno. En la tubería de conexión del tanque con los captadores se insertaron tres sensores en línea (pH, potencial redox y oxígeno disuelto), un sistema de calefacción formado por cuatro grupos de resistencias y un sistema de refrigeración externo. El sistema global está conectado a un ordenador que adquiere los datos en línea generados por los sensores y transmite las decisiones de control al cuadro de mando.

La planta piloto tiene un volumen total máximo de 82 L y opera en modo discontinuo. Los cuatro módulos de captadores de los que consta están montados sobre una estructura metálica, inclinados 37° (latitud de la PSA) y orientados hacia el sur. Cada módulo está formado por cinco tubos de vidrio borosilicatado de 1.5 m de longitud, 46.4 mm de diámetro interno y 50 mm de diámetro externo. El sistema completo, por tanto, consta de 20 tubos conectados en serie mediante conexiones de polipropileno (protegidas de la radiación UV con láminas de aluminio). El sistema CPC presenta un factor de concentración de 1. El reflector utilizado es de aluminio altamente anodizado.

El fluido de trabajo, en este caso aguas residuales industriales, circula en el sistema de un módulo a otro y finaliza en un tanque de recirculación que tiene una capacidad máxima de 20L. El sistema posee una bomba centrífuga que es la encargada de impulsar el fluido a través del sistema a un caudal que puede ser regulado mediante un caudalímetro insertado en la tubería. En este trabajo, todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un caudal constante de 25 L/min, proporcionando un flujo turbulento dentro del circuito.

La comparación de ensayos fotocatalíticos bajo diferentes condiciones solares es posible mediante la ecuación III.14.

$$Q_{UV,n+1} = Q_{UV} + \Delta t_n \times \overline{UV}_{G,n+1} \times \frac{A_i}{V_T}; \quad \Delta t_n = t_{n+1} - t_n \quad \text{Ec. III.14}$$

Donde t_n es el tiempo experimental para cada muestra; UV es la radiación solar ultravioleta promedio durante el periodo Δt_n ; A_i es el área iluminada (m^2) y $Q_{UV,n}$ es la energía acumulada por unidad de volumen (kJ/L) en el tiempo experimental t_n .

Para el cálculo de la radiación solar UV promedio, la PSA dispone de varios sensores de medida que abarcan todo el espectro global en diferentes rangos de longitudes de onda

(280-400 nm; 300-400 nm; 200-3600 nm y 310-2800 nm) y orientaciones (horizontal e inclinados a 37°). Los datos recogidos en estos dispositivos se almacenan de forma automática en una base de datos.

Procedimiento

En este trabajo, se realizaron experimentos de fotocatalisis solar (foto-Fenton, FF) para la depuración de ARC después del pre-tratamiento de C/F descrito en la sección III.3.7. Las muestras se introdujeron en el fotorreactor CPC y se homogeneizaron en oscuridad. Como etapa previa, el pH de las muestras se ajustó a 2.8 (en los casos que fue necesario) mediante la adición de H₂SO₄. En ese momento se tomó una muestra para analizar los parámetros de partida (COD, DQO, turbidez, Fe...) A continuación se adicionaron dosis adecuadas de H₂O₂, el sistema se destapó y comenzó el proceso de foto-Fenton solar. Se tomaron diversas muestras a medida que el peróxido añadido iba consumiéndose. De esta forma, se consiguió que las muestras tomadas no tuvieran en ningún caso una cantidad de peróxido de hidrógeno residual que pudiera interferir negativamente en las medidas analíticas y biológicas posteriores. En este trabajo, la adición de hierro no fue necesaria en ningún caso debido a que las muestras contenían una cantidad residual de Fe (III) disuelto debido a la etapa de C/F.

III.3.9.2. Planta piloto de ozonización

Fundamento teórico y descripción del equipo

Los experimentos de ozonización realizados en este trabajo se han llevado a cabo en una planta piloto de ozonización ANSEROS (Anseros Klaus Nonnenmacher GmbH, Alemania) instalada en la PSA (figura III.26). El sistema global está diseñado para trabajar en modo discontinuo y está compuesto por una columna de contacto, un medidor de flujo, dos generadores de oxígeno, un generador de ozono y dos analizadores.

El ozono utilizado se produce a partir de aire ambiental mediante dos generadores de oxígeno (ANSEROS SEP 100) que pueden actuar de forma conjunta o independiente. El oxígeno es separado de otros componentes del aire mediante tamices moleculares y entra al generador de ozono (ANSEROS COM-ADO2), en el cual, al aplicar un elevado voltaje (genera un voltaje de 20 kV mediante una frecuencia de 600 Hz) se genera

ozono. El enfriamiento del sistema se lleva a cabo por ventiladores mediante un caudal de aire controlado. La entrada de aire al generador de ozono se regula mediante un caudalímetro y el generador de ozono se conecta o desconecta con un interruptor mientras que el porcentaje de generación se regula a partir de un variador.

La generación de ozono es cuantificada mediante un detector de ozono, en fase gaseosa, a la entrada y otro a la salida del sistema utilizando dos analizadores UV (Ozomat GM-6000-OEM) capaces de medir altas concentraciones de ozono (rango de medida 0.0001-199.9 gO₃/Nm³). La producción de ozono está conectada a una columna de reacción con un volumen total de 20 L, permitiendo trabajar con un volumen mínimo de 8L. Las conexiones y válvulas del sistema están fabricadas en polipropileno para el flujo de agua y en PTFE para la circulación de ozono. El sistema además está acoplado a un destructor térmico (300°C) y catalítico de ozono con el objetivo de eliminar el ozono residual evitando su liberación a la atmósfera. El equipo dispone de un detector de ozono ambiental (ANSEROS, SEN 6060-S) conectado a una alarma para la vigilancia continua de concentraciones de gas en el ambiente peligrosas para el operador.

El sistema cuenta adicionalmente con una sonda redox y un sistema regulador de pH compuesto por un sensor y dos bombas capaces de introducir ácido o base dependiendo del control de pH que se desee ejercer en el sistema.

El diseño del sistema permite calcular el ozono consumido en las muestras, haciendo un balance entre el ozono en fase gaseosa a la entrada y a salida del sistema. En este trabajo, el cálculo se realizó mediante la ecuación III.15.

$$O_{3 \text{ cons},n} \left(\frac{g}{L} \right) = O_{3 \text{ cons},n-1} + \frac{Q_a x (C_{O_3, en} - C_{O_3, sn}) x (t_n - t_{n-1})}{V_r} \quad \text{Ec.III.15}$$

Donde O_{3cons,n} es la concentración de ozono consumido en el instante n, O_{3cons,n-1} es la concentración de ozono consumido en el instante n-1, Q_a es el caudal de aire a la entrada del sistema, C_{O₃,en} es la concentración de ozono gas a la entrada, C_{O₃,sn} es la concentración de ozono gas a la salida, V_r es el volumen de reacción y t_n es el tiempo de muestreo.



Figura III.26. Fotografía de la planta piloto de ozonización utilizada.

Procedimiento

En este trabajo, se realizaron experimentos de ozonización para la depuración de ARC después del pre-tratamiento de C/F descrito en la sección III.3.7. Previo a la realización de ensayos, es preciso asegurarse de que el sistema está completamente seco, para ello se debe hacer circular una corriente de aire a 100 NL/hora durante un periodo mínimo de 1 hora. Transcurrido este tiempo, se procede al encendido del destructor de ozono, el cual debe alcanzar una temperatura de unos 300°C. A continuación se llena la columna con el volumen de muestra requerido. En este trabajo se utilizó un volumen total de 8L. Posteriormente se deben de poner en marcha los analizadores de ozono y finalmente el generador.

Durante los experimentos, el generador de ozono se encendió al 50% de potencia con una producción constante de 3.6 gO₃/hora. Se midió el ozono en la fase gas a la entrada

y a la salida del sistema, y se calculó el consumo de ozono de cada muestra. Inmediatamente después de tomar la muestra se burbujeó con un pequeño flujo de gas inerte (N_2) dentro de la misma muestra para la eliminación del ozono residual, permitiendo parar la reacción y llevar a cabo medidas analíticas fiables.

III.4. Resultados y discusión

III.4.1. Caracterización físico-química de aguas residuales procedentes de la industria del corcho

Las ARC utilizadas en este estudio se recogieron en una planta de procesado de corcho ubicada en San Vicente de Alcántara (Extremadura). Se analizaron diferentes lotes de agua residual durante dos años consecutivos. La caracterización se llevó a cabo utilizando las técnicas analíticas convencionales descritas en la sección III.3.2. En la tabla III.5 se muestran los rangos principales de los parámetros caracterizados durante el análisis de todos los lotes estudiados.

En todos los casos, esta agua residual presentó un color marrón oscuro debido a una alta concentración de polifenoles y al contenido de otros extractos procedentes del corcho. (figura III.27). Además, los resultados mostraron un alto contenido orgánico (entre 1100-1500 mg/L de COD). Todas las muestras analizadas presentaron valores muy bajos de biodegradabilidad y de toxicidad, lo que puede traducirse en que el carbono orgánico disuelto en agua (procedente de compuestos tales como ácidos fenólicos como 2,4,6-tricloroanisol, clorofenol o taninos) puede considerarse recalcitrante y un posible inhibidor del metabolismo microbiano de un sistema de oxidación biológica convencional. Los altos niveles de turbidez y K^+ encontrados pueden deberse al proceso de ebullición [De Torres-Socías, 2014].



Figura III.27. Agua residual de cocido de corcho utilizada.

Tabla III.5. Caracterización de las aguas residuales industriales de cocido de corcho.

Parámetros	Valores
pH	5.0-6.5
Conductividad(mS/cm)	1.2-1.7
Turbidez (NTU)	110.0-230.0
SST (mg/L)	290
DQO (mg/L)	3200-5300
COD (mg/L)	1100-1560
Contenido polifenólico total (mg/L)	440-630
Nitrógeno total (mg/L)	35.0-75.0
Hierro total (mg/L)	0.0
Na⁺ (mg/L)	35-115
NH₄⁺ (mg/L)	2.7-11.4
K⁺ (mg/L)	170-330
Mg²⁺ (mg/L)	0.6-19
Ca²⁺ (mg/L)	18-50
Cl⁻ (mg/L)	30-82
SO₄²⁻ (mg/L)	2-30
PO₄³⁻ (mg/L)	5-21.9
NO₃⁻ (mg/L)	1.7-3.7
Biodegradabilidad	0.1-0.2 (No-biodegradable)
Toxicidad aguda (a corto plazo)	30-56%

*Biodegradabilidad (medida por respirometría)=(CODb/COD)

III.4.2. Estudio del comportamiento de la población microbiana de un fango activo de EDAR en contacto con ARC utilizando un bioreactor tanque agitado a escala de laboratorio

Debido a la baja eficiencia de los tratamientos biológicos convencionales frente a la depuración de ARC, el primer objetivo fue el desarrollo y adaptación de un sistema biológico que fuera capaz de tratar los compuestos orgánicos de carácter recalcitrante que presenta este tipo de aguas. Esta metodología requiere un proceso de adaptación basado en la generación de nuevas poblaciones microbianas. Con este propósito, se realizó un estudio a escala de laboratorio para la evaluación de la variación de la población microbiana a lo largo de un proceso de adaptación a ARC, de un fango activo procedente de una EDAR urbana.

Inicialmente el fango activo de la EDAR se mantuvo en aireación durante 24 horas para alcanzar la fase endógena. Por otro lado, se ajustó el pH de las ARC a 7. Ambos sistemas se mezclaron en un reactor tanque agitado en la proporción adecuada para obtener 200 mg/L de COD en la mezcla (adición de 188 mL de ARC por litro de fango). Esta carga se seleccionó con el objetivo de mantener los mismos valores de COD que pueden encontrarse en una corriente de entrada de una EDAR convencional, simulando la posible dilución de este tipo de aguas residuales por tanto en un tratamiento convencional. Se realizaron dos réplicas del experimento. El fango activo se mantuvo en contacto con las ARC durante 19 días (456 horas) bajo agitación y aireación controladas. Tras la detección de una importante disminución de COD (aproximadamente un 75%) a las 218 horas de tratamiento, se realizó una segunda adición de ARC (manteniendo la misma proporción que en la inicial).

Para evaluar los cambios en las poblaciones microbianas durante el proceso de adaptación, se recogieron muestras a lo largo del experimento que se evaluaron utilizando diversas técnicas analíticas y microbiológicas: SST, SSV, COD, NT, contenido iónico, microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN, qPCR, toxicidad crónica y técnicas de secuenciación masiva.

III.4.2.1. Caracterización físico-química y microscópica del fango activo de una EDAR urbana

El fango seleccionado para el estudio se recogió directamente del tratamiento secundario de una EDAR situada en El Toyo (Almería). El fango se mantuvo en aireación continua durante 24 horas con el objetivo de alcanzar la fase endógena del crecimiento bacteriano. Como etapa previa a la realización del estudio de adaptación microbiológica, el fango activo se caracterizó mediante parámetros analíticos y a nivel microscópico. Los parámetros analíticos estudiados se muestran en la tabla III.6.

Tabla III.6. Caracterización del fango activo utilizado.

Parámetros	mg/L	Parámetros	mg/L
COD	12.0	NO ₂ ⁻	n.d.
DQO	32.0	SO ₄ ²⁻	275.9
SST	7.1	PO ₄ ²⁻	22.5
SSV	5.6	NH ₄ ⁺	n.d.
Nitrógeno total	0	Mg ²⁺	67.7
Na ⁺	483.8	Ca ²⁺	102.6
K ⁺	46.7	Trimetilamina	n.d.
Cl ⁻	745.7	CH ₃ COO ⁻	n.d.
NO ₃ ⁻	0.7		

n.d. no detectado

Las comunidades microbiológicas del fango activo se monitorizaron “in vivo” mediante la utilización de un microscopio óptico. Los resultados mostraron flóculos altamente compactos, cubriendo aproximadamente un 60-70% de la superficie, con forma regular y tamaño mediano. La microfauna predominante en el fango estaba compuesta principalmente por protozoos (flagelados como *Peranema* y ciliados como *Opercularia* y *Colpidium*), metazoos (*Rotíferos*), y amebas (*Tecamebas* como *Arcella* y *Gimnamebas*). En la figura III.28 se pueden observar algunas imágenes de los microorganismos encontrados.

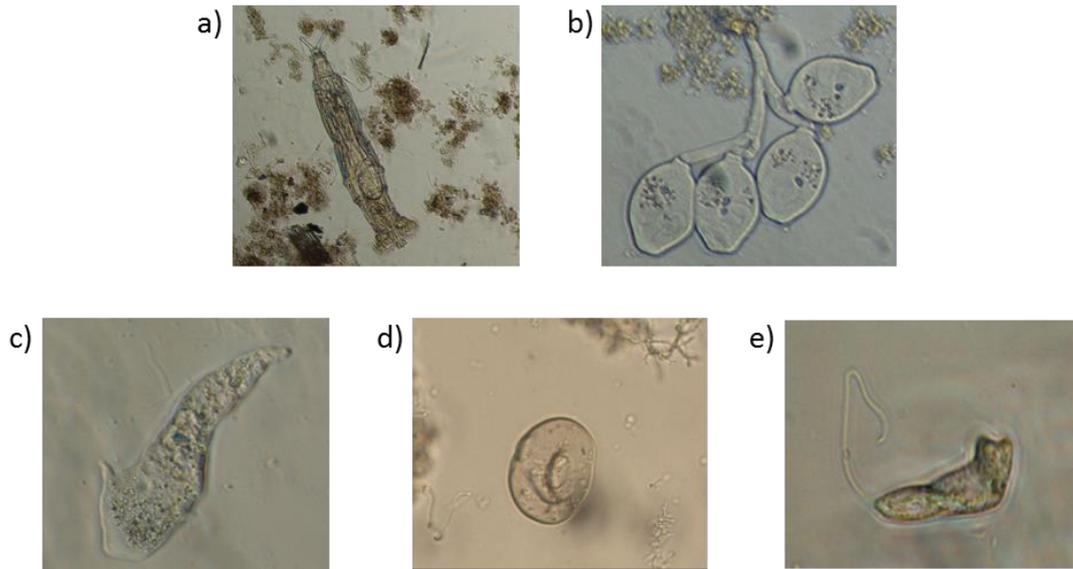


Figura III.28. Microfauna predominante en el fango activo de EDAR urbana observada mediante microscopía óptica (40X, contraste de fases). a) *Rotífero*, b) *Opercularia*, c) *Gimnameba*, d) *Arcella*, e) *Pernamena*.

III.4.2.2. Evaluación de los principales parámetros físico-químicos

A lo largo del proceso de adaptación de la fauna microbiana a las ARC, se estudió la evolución de COD, NT, SST, SSV y el contenido iónico en las muestras a diferentes tiempos de contacto. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras III.29 y III.30. Como se puede observar, SST y SSV disminuyeron a lo largo del tiempo de contacto (aproximadamente un 60%), mostrando valores de 2.4 y 2.1 mg/L respectivamente al final del experimento. El COD también disminuyó durante el tiempo de contacto, mostrando un valor mínimo de 54 mg/L tras la primera adición de agua residual y un valor de 70 mg/L tras la segunda adición. Por el contrario, se observó un aumento del nitrógeno total, alcanzando un valor de 169 mg/L después de 456 horas de contacto (19 días).

El análisis de iones mostró un aumento de más de un 200% para nitrato, fosfato, potasio y amonio, con concentraciones de 366, 290, 175 y 55 mg/L, respectivamente al final del tiempo de contacto. En el caso de fosfato y potasio, ambos se encuentran presentes a altas concentraciones formando parte del citoplasma celular, por tanto, un aumento de estos iones en el fango es claramente indicativo de una posible muerte celular debido a la ruptura de la membrana citoplasmática.

Por el contrario, el aumento de la concentración de nitrato se debe a la ausencia de ciclos anóxicos durante el tratamiento biológico estudiado. Se detectó además, una acumulación de amonio al final del experimento, indicando un deterioro del sistema debido a un mal funcionamiento del proceso de nitrificación.

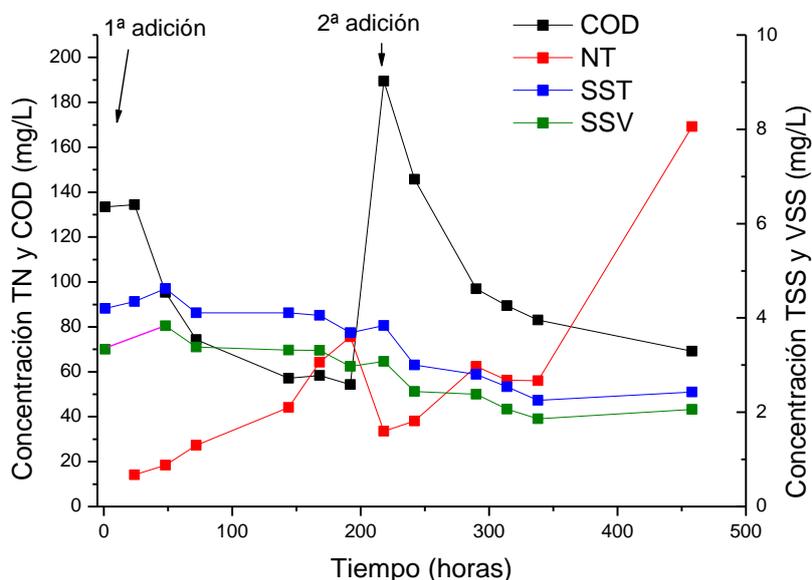


Figura III.29. Evolución de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana.

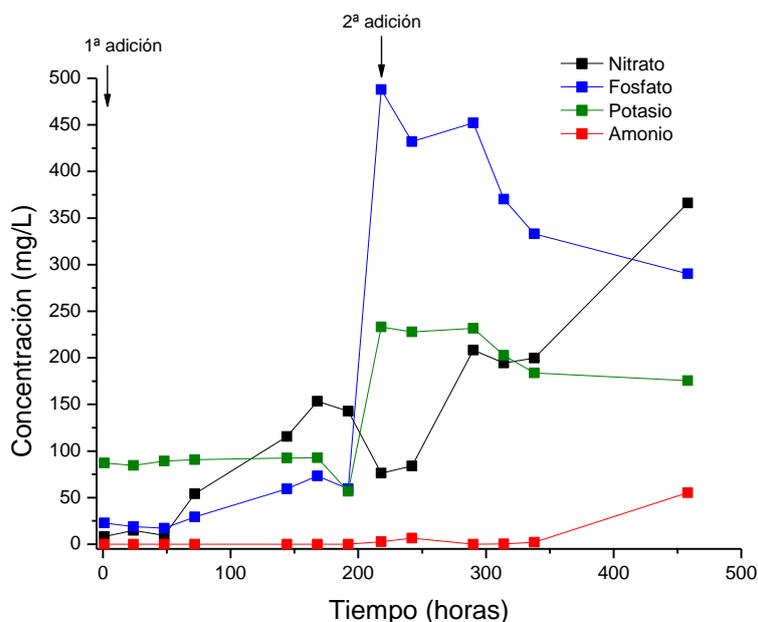


Figura III.30. Evolución de ciertos iones a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana.

La reducción de SST y SSV, junto con una liberación significativa de iones, indicaron la posible ruptura de los flóculos del fango, así como de la membrana citoplasmática de ciertas bacterias, lo que llevó a la desestabilización del sistema biológico. A consecuencia de ello aparecieron nuevas especies microbianas en el fango activo (que se mostrarán en el siguiente epígrafe).

III.4.2.3. Evaluación microscópica del sistema biológico

Tradicionalmente, la observación microscópica de la microfauna se ha aplicado como bioindicador para la evaluación del rendimiento de sistemas biológicos en el tratamiento de aguas residuales, proporcionando información útil sobre la actividad biológica del fango activo [Madoni, 1994]. Con este objetivo, se estudió la evolución “in vivo” de las comunidades microbiológicas del fango a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y los fangos de EDAR urbana.

Después de una hora de contacto, se observó una población similar a la del fango inicial (descrito en la sección III.4.2.1.) con un ligero aumento en el número de *Gimnamebas* y flagelados de gran tamaño, en concreto *Peranemas*. Tras 48 horas de contacto, el número de *Rotíferos* y *Arcellas* permanecieron constantes, sin embargo, se observó un aumento en el número de protozoos ciliados libre nadadores, apareciendo nuevas especies como *Aspidisca*, *Acineria uncinata*, *Litonotus lamella* y *Coleps Hirtus*. El número de *Opercularia* (protozoo ciliado sésil) también aumentó tras este tiempo de contacto. La presencia de ciliados en fangos de depuradora ha sido documentada por diversos autores [Al-Shahwani y Horan, 1991; Curds, 1982; Madoni y cols., 1993; Madoni, 1994 y Salvado y cols., 1995] y en general mejoran la calidad del efluente. Sin embargo, no todas las especies de ciliados son favorables para los sistemas de depuración biológica. De acuerdo con Mara y Horan (2003), algunas especies como *Opercularia* pueden ser indicadoras de una mala calidad del fango activo, y por tanto, de una población microbiana no sostenible. Esta especie se mantuvo en el sistema hasta 180 horas de contacto, desapareciendo completamente tras este tiempo.

En este tiempo (48 horas de contacto), además apareció la especie *Litonotus lamella*, (ciliado libre nadador que indica un estado medio de estructuración), manteniéndose el número de unidades detectadas hasta el final del experimento. Algunos autores indican

que esta especie es un indicador de una pobre sedimentación del fango activo [Lee y cols., 2004].

Después de 72 horas de contacto, aparecieron algunas unidades muertas de *Rotíferos* y *Phodophyra* (ciliado sésil). En particular, los ciliados y rotíferos son las primeras especies que pueden verse afectadas por sustancias tóxicas, actuando como indicadores de compuestos tóxicos o biorecalcitrantes y, demostrando así condiciones operativas adversas en los sistemas biológicos [Eikelboom, 2000]. En este tiempo de contacto, además se observó la ruptura de tecamebas presentes en el ecosistema, en concreto *Arcellas*. Esta especie de ameba se encuentra comúnmente en fangos activos donde la calidad de los efluentes es alta [Mara y Horan., 2003], y está asociada a un proceso de nitrificación efectivo [Madoni y cols., 1993].

Tras una segunda adición de ARC tras 218 horas de contacto, se produjo un incremento del número de flagelados de pequeño tamaño ($<20 \mu\text{m}$). Además, se detectó un elevado crecimiento de bacterias filamentosas en el sistema, observándose una desintegración de los flóculos del fango activo (desfloculación) que se mantuvo hasta el final del experimento. En general, las razones comunes de una defloculación son un desequilibrio nutricional o un vertido tóxico. Por tanto, la ruptura de los flóculos indicó un mal funcionamiento del sistema.

Además, es importante mencionar que después de 290 horas de contacto, hubo un crecimiento inesperado de *Gimnamebas*, convirtiéndose en la especie predominante en el sistema. Esta especie es frecuente en los fangos de una EDAR convencional. Sin embargo, según Madoni (1994), la existencia de una especie o grupo predominante en una población es indicativo de un desequilibrio en el ecosistema, debido a la presencia de factores limitantes que impiden el correcto desarrollo de la cadena trófica, y por tanto la inhibición del crecimiento de otras especies. Las razones que comúnmente se dan en una EDAR para la inhibición de la cadena trófica son la presencia de vertidos tóxicos, una fuerte extracción de fango activo o la falta de aireación. Conjuntamente, en este tiempo de contacto (290 horas), aparecieron como nuevas especies algunas unidades de *Nematodo* (metazoo), indicando una posible mineralización del fango.

Después de 314 horas de contacto, la especie *Aspidisca* aumentó en un 50%, indicando la edad alta del fango y una elevada relación de masa/carga, que genera una mala

calidad del efluente [Lee y cols., 2004]. Al final del experimento, apareció una nueva especie de metazoo (*Oligoqueto*), indicador de una mineralización del fango y por tanto de la oxidación del sistema biológico.

En la figura III.31 se pueden observar la fragmentación y aparición de algunas de las especies mencionadas anteriormente.

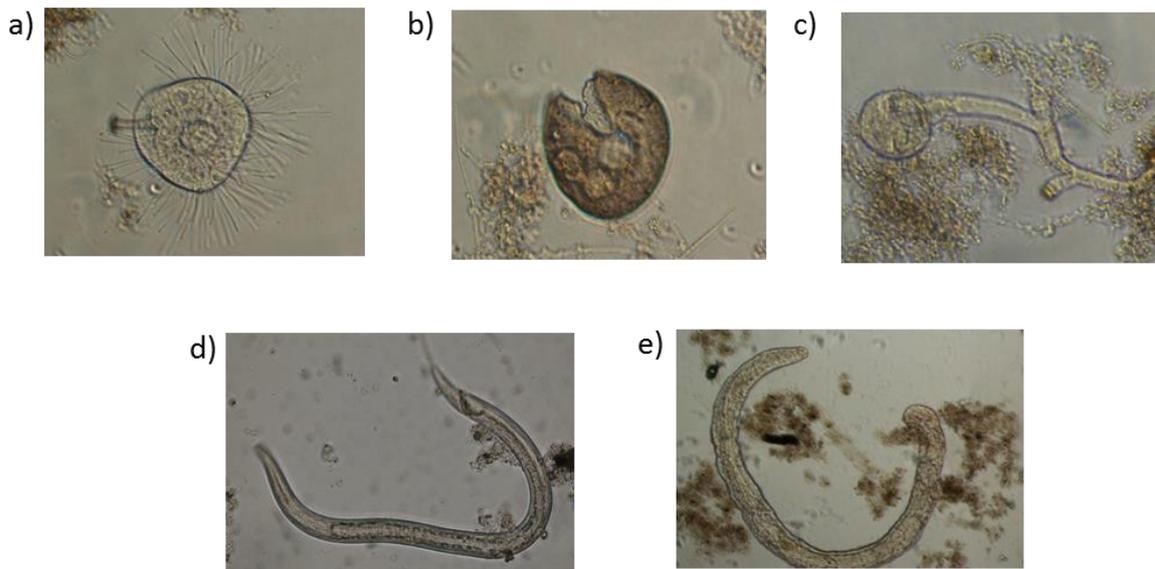


Figura III.31. Especies observadas en el microscopio óptico (40x, contraste de fases); a) *Phodophyra*, b) *Arcella* y c) *Opercularia* tras 72 horas de contacto; d) *Nematodo* y e) *Oligoqueto* tras 290 y 314 horas de contacto.

III.4.2.4. Evaluación de los cambios en la población bacteriana mediante la técnica de recuento en placa

Con el objetivo de evaluar cambios en la población total bacteriana a lo largo del experimento, se estudió la evolución de bacterias heterotróficas totales (expresadas en unidades formadoras de colonias UFC) mediante la técnica de recuento en placa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.32.

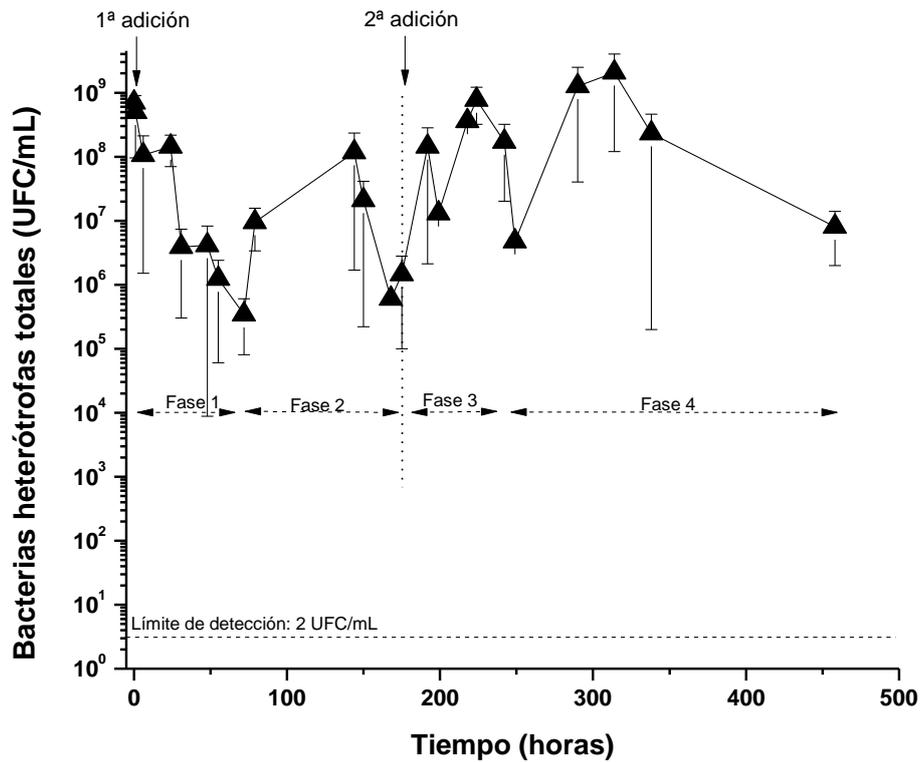


Figura III.32. Bacterias heterótrofas totales detectadas a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana mediante recuento en placa.

La concentración inicial de bacterias heterótrofas totales tuvo un valor aproximado de 10^{10} UFC/mL para el fango activo y a 10^8 UFC/mL para el ARC utilizada. A lo largo del tiempo de contacto, la concentración total de bacterias heterótrofas fluctuó entre 10^9 - 10^5 CFU/mL, describiendo 4 fases claramente diferenciadas de disminución y recuperación. En la primera fase (0-72 horas de tiempo de contacto) se observó una clara reducción de bacterias heterótrofas de 4 logaritmos. En una segunda fase se produjo la recuperación de la concentración seguida de otra reducción clara a 168 horas de tiempo de contacto. Durante estas dos fases, se produjo un cambio en cuanto a la morfología de colonias, lo que sugirió un proceso de adaptación microbiológico del fango a las ARC. Durante la primera fase, se observaron dos tipos predominantes de colonias: blancas (de tamaño pequeño y tamaño grande) y blancas conteniendo pigmentación fluorescente. Ambos tipos desaparecieron casi totalmente al inicio de la segunda fase, donde la población predominante de colonias cambió, observándose predominancia de bacterias de tipo filamentosas (figura III.33).

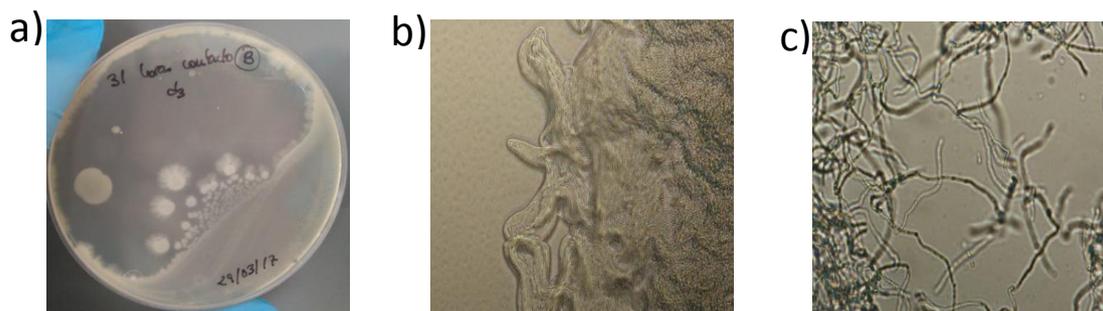


Figura III.33. Colonias presentes en las muestras a las 31 horas de contacto: a) Morfología de las colonias obtenidas mediante la técnica de recuento en placa; b) Imagen en microscopio óptico con contraste de fases (40X); c) Imagen en microscopio óptico con contraste de fases (100X).

Análisis posteriores a la segunda adición (fases 3 y 4), indicaron una fluctuación en el número total de bacterias heterótrofas. Sin embargo, la morfología de las colonias se mantuvo constante mostrando predominancia de bacterias filamentosas hasta el final del tiempo de contacto.

Por tanto, la técnica de recuento en placa mostró un cambio significativo en la diversidad de la comunidad bacteriana a lo largo del tratamiento biológico, así como variaciones en la abundancia de las mismas provocada por el proceso de “adaptación” de los fangos a las ARC bajo estudio.

III.4.2.5. Determinación de la concentración de ADN

Con el objetivo de complementar los análisis realizados mediante microscopía óptica y conteo en placa, se llevó a cabo la evaluación de la concentración global de ADN durante el experimento de adaptación de los fangos de EDAR urbana al ARC. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.34.

La concentración inicial de ADN del fango activo fue de 81 ng/ μ L. Esta concentración aumentó hasta 154,7 ng/ μ L tras la primera adición de ARC, disminuyendo posteriormente a lo largo del tiempo de contacto. Tras la segunda adición de ARC, la concentración de ADN siguió disminuyendo hasta alcanzar un valor aproximadamente de 30 ng/ μ L al final del tiempo de contacto. Por tanto, en términos globales, se produjo una reducción clara de microorganismos a lo largo del tratamiento biológico. Esto fue

debido a un efecto de inhibición crónica que esta agua residual industrial causa en un fango activo convencional.

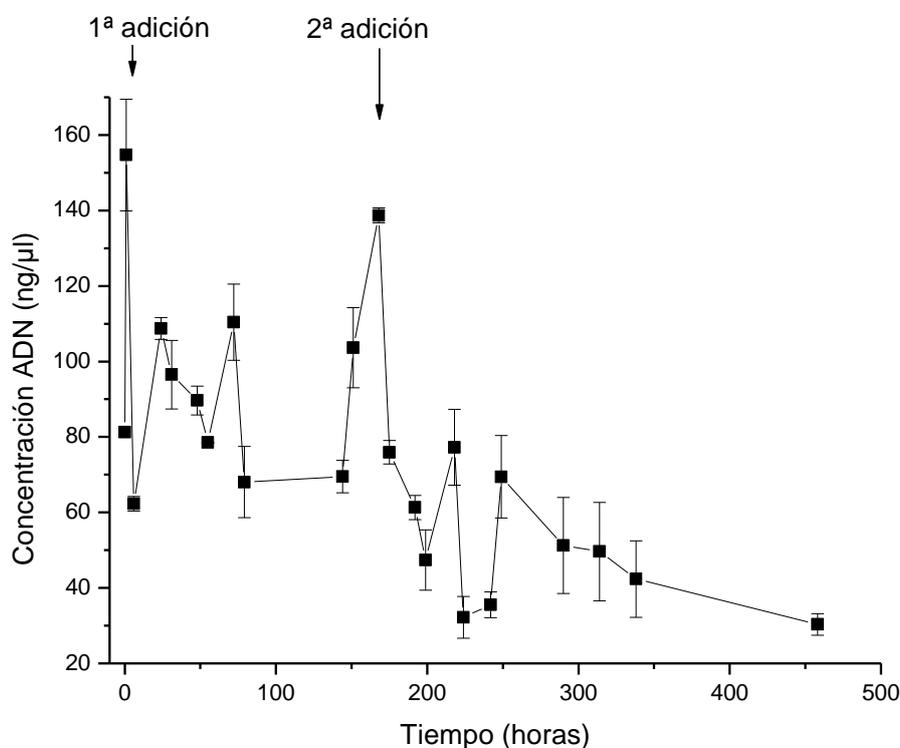


Figura III.34. Evolución de la concentración de ADN durante el tratamiento biológico.

Los valores obtenidos de ADN estuvieron en concordancia con los resultados obtenidos para las medidas de SST y SSV realizadas en el estudio a lo largo del tiempo de contacto.

Por otro lado y teniendo en cuenta que los análisis comentados hasta ahora se han realizado desde un punto de vista general, se consideró interesante la utilización de técnicas más específicas para la identificación de diferentes especies que pudieran verse afectadas durante el proceso de adaptación al ARC, y por tanto, que podrían dar información sobre el mal funcionamiento del nuevo sistema biológico, como ocurre por ejemplo con los procesos de nitrificación.

III.4.2.6. Evaluación de bacterias totales ADNr (16S) y bacterias amino-oxidantes (AOB) mediante técnicas de qPCR

La cuantificación del número total de bacterias de ADNr 16S y bacterias amino-oxidantes (AOB) a lo largo del experimento biológico se llevó a cabo utilizando la técnica qPCR. Los resultados obtenidos para el umbral de ciclo (Ct, cycle threshold) se correlacionaron con la concentración bacteriana en términos de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). La figura III.35 muestra la evolución de la concentración del número total de bacterias 16S y AOB a lo largo del experimento de adaptación.

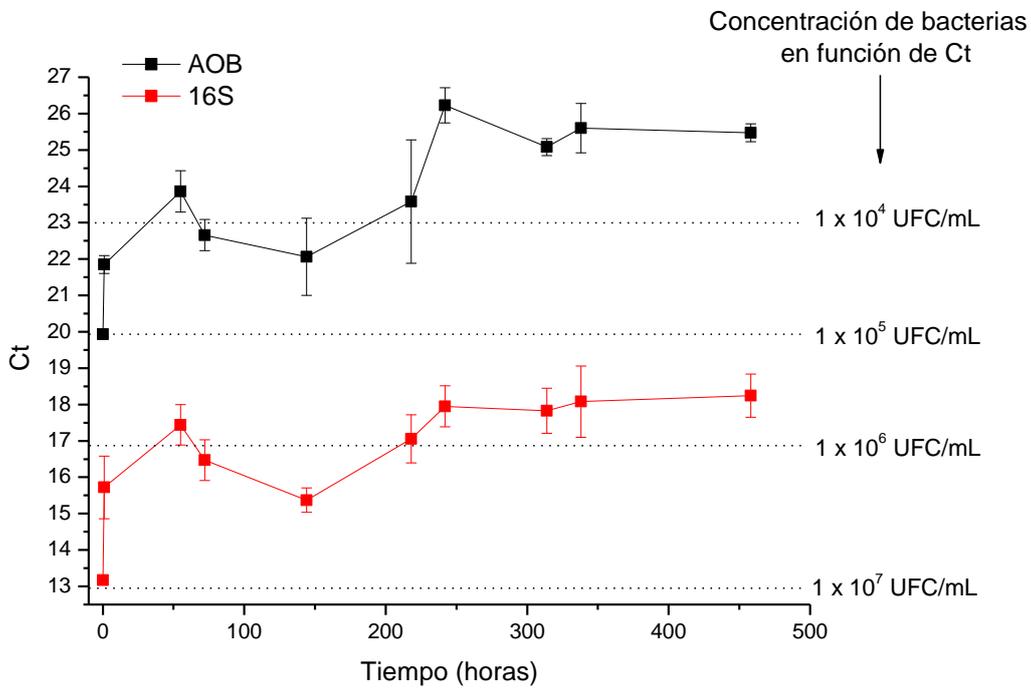


Figura III.35. Evolución de bacterias totales 16S rDNA y AOB durante el experimento de adaptación del fango activo de una EDAR urbana al ARC.

El perfil para ambas (16S rDNA y AOB) fue similar, sin embargo, se observó una diferencia de aproximadamente 2 órdenes de magnitud entre bacterias totales y AOB durante el proceso de adaptación. Estos resultados son coincidentes con estudios obtenidos por otros autores [Harms y cols., 2003]. En este trabajo, además, se analizó la concentración de bacterias 16S rDNA y AOB en fangos de EDAR urbana durante un periodo de un año. La media de las concentraciones para bacterias 16S rDNA y AOB fue de $4.3 \pm 2.0 \times 10^{11}$ células/litro y $1.2 \pm 0.9 \times 10^{10}$ células/litro respectivamente.

Por otro lado, tal y como puede verse figura III.35, se observó una reducción significativa de bacterias durante el tiempo de adaptación, lo que sugiere un desequilibrio del sistema. En concreto, la reducción de AOB afectó negativamente al sistema biológico, empeorando la eficiencia del proceso de nitrificación.

III.4.2.7. Aplicación de técnicas de secuenciación masiva

Con objeto de entender por qué el sistema biológico adaptado no es capaz de abordar con éxito la degradación de la carga orgánica proveniente de ARC, es necesaria la identificación de especies concretas. Así, después de la amplificación por qPCR, las muestras se secuenciaron para encontrar una variación filogenética del sistema biológico a lo largo del tiempo de contacto.

Para ello, se seleccionaron muestras tras diferentes tiempos de contacto (1, 55, 144, 218, 314 y 458 horas) y los resultados obtenidos se clasificaron en reino, filo, clase, orden, familia, género y especie. Las bacterias fueron el reino predominante, siendo mayor del 99.6% en todas las muestras estudiadas. La variación filogenética global encontrada en las muestras se recoge en la figura III.36.

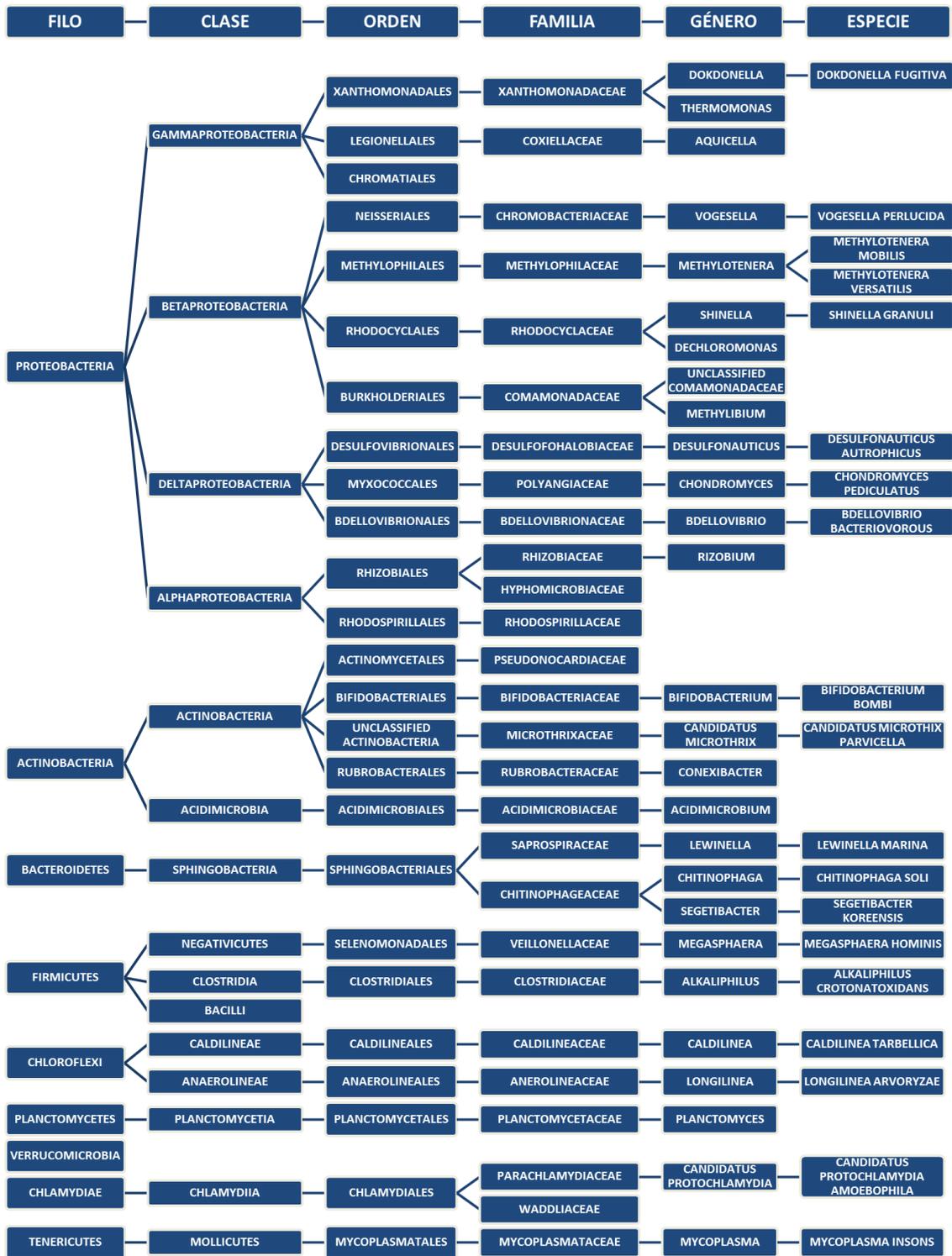


Figura III.36. Variación filogenética global encontrada para las muestras estudiadas.

Los resultados se centraron en el estudio de las variaciones en cuanto a filo, clase y orden de todas las muestras estudiadas. Estos resultados obtenidos se muestran en la figura III.37.

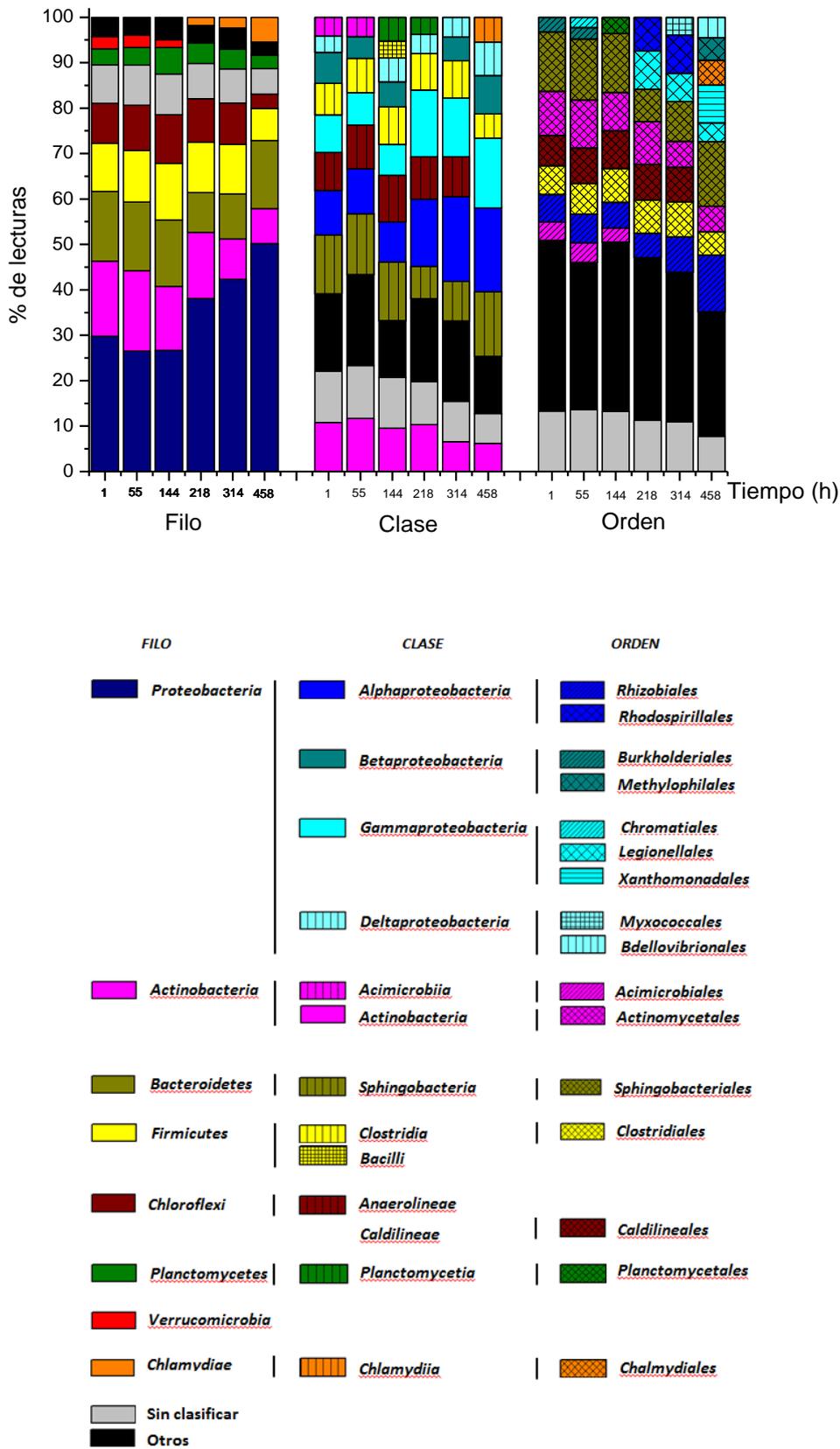


Figura III.37. Abundancia relativa en cuanto a filo, clase y orden de las muestras seleccionadas durante la adaptación de los fangos de EDAR urbana a las ARC.

El filo *Proteobacteria* fue el más significativo, con un crecimiento del 30% al 50% durante el experimento. *Actinobacteria* fue el segundo filo más importante en las muestras, mostrando una disminución de un 50% a lo largo del experimento con un valor de 7.72% a las 458 horas de experimento, evidenciando la fragmentación del fango. En general, el filo *Actinobacteria* está involucrado en procesos microbiológicos de eliminación de fosfato, y en problemas de “bulking” y “foaming” en fangos activos [Seviour y cols., 2008]. El filo *Chloroflexi* mostró cambios a lo largo del experimento, aumentando su valor de un 8.74% a un 10.72% en 144 horas y disminuyendo hasta 3.18% al final del experimento. Tradicionalmente, la presencia de *Chloroflexi* ha sido asociada con hábitats extremos, tales como ambientes marinos o hipersalinos [Nübel y cols., 2001]. Sin embargo, la abundancia de este filo es común en EDAR urbanas e industriales con diferentes diseños. Debido a su naturaleza filamentosa, se considera que pueden causar diversos incidentes en la planta, sin embargo, los problemas de bulking o foaming causados son de carácter ocasional [Kragelund y cols., 2007].

El filo *Bacteroidetes* permaneció prácticamente constante a lo largo del experimento entre un 10% y un 15%. Este tipo de bacteria, al igual que *Chloroflexi*, se encuentra comúnmente en EDAR urbanas e industriales en diferentes procesos (nitrificación / desnitrificación y recuperación de fósforo) [Kragelund y cols., 2008]. La presencia de este tipo de bacterias contribuye al incremento del índice filamentoso, aumentando la posibilidad de problemas de “bulking”.

El filo *Firmicutes*, predominantemente la clase *Clostridia*, se encontró en todas las muestras, con un valor de 10.66% tras una hora de experimento y un 7.01% al final del tiempo de contacto. Otros fillos como *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* o *Chlamydiae* estuvieron presentes en porcentajes pequeños. No obstante, diversos autores han determinado que la naturaleza y función de especies minoritarias pueden desempeñar un papel importante en la estabilización del sistema [Dias y Bhat, 1965]. El porcentaje de *Planctomycetes* (aproximadamente un 3-5%) se mantuvo constante a lo largo del tiempo de contacto. Sin embargo, el filo *Verrucomicrobia*, (con un porcentaje de 2.69% tras una hora de contacto) desapareció a las 218 horas de experimento. *Chylamydiae*, una bacteria que actúa como parásito en el interior de las células animales y está rodeado por doble membrana citoplásmática [Seviour y Nielsen, 2010], apareció a las 218 horas de contacto, aumentando hasta un 5.47% al final del experimento.

La clasificación de la variación filogenética por clases estuvo dominada por *Proteobacterias* de las subclases alfa, beta gamma o delta, siendo las clases alfa y gamma las subdivisiones más abundantes en las muestras. *Planctomycetia* estuvo presente únicamente después de 144 y 218 de contacto.

La clasificación por orden mostró una variabilidad en el sistema. *Rhizobiales*, *Clostridiales*, *Actinomycetales* y *Sphingobacterales* estuvieron presentes en todas las muestras estudiadas. Al final del experimento, el orden *Caldilineales* desapareció, mientras que *Chalmydiales* (5.47%), *Xanthomonadales* (8.28%), *Bdellovibrionales* (4.50%) y *Methylophilales* (4.98%) aparecieron después de 458 horas de tiempo de contacto.

El número de bacterias sin clasificar en la variación filogenética global (ver figura III.37.), sugirió la presencia de especies nuevas que pueden habitar en comunidades complejas de fangos activos en contacto con aguas residuales industriales complejas.

Para este caso particular, la aplicación de técnicas metagenómicas puso básicamente de manifiesto la gran variación filogenética que se produjo a lo largo del proceso de adaptación de los fangos de EDAR urbana a las ARC. Aunque algunos de los filos encontrados son característicos de las EDAR, se describen como responsables del bulking (bacterias filamentosas) lo que viene a soportar la desestabilización del sistema biológico comenzando por la eliminación del flóculo. Otros filos detectados y menos comunes, ponen de manifiesto condiciones físico-químicas extremas que pueden llevar a la inoperatividad del nuevo sistema biológico.

III.4.2.8. Evaluación de la toxicidad crónica durante el tratamiento biológico

Con el fin de evaluar la toxicidad crónica durante el proceso de adaptación, se tomaron muestras a diferentes tiempos de contacto y se analizaron mediante respirometría. Los resultados se muestran en la tabla III.7.

A partir de las 24 horas, la toxicidad crónica fue en aumento, alcanzando un valor de un 73% de inhibición a las 144 horas de contacto. Estos valores mostraron un claro desarrollo de un efecto perjudicial sobre la actividad de la población microbiana a lo largo del tiempo de contacto. Por tanto, la evaluación de la toxicidad crónica, junto con todos los demás parámetros estudiados en apartados anteriores, demostraron la

imposibilidad de aplicar un sistema biológico adaptado para el tratamiento y depuración de las ARC. En estos casos es necesario recurrir a tratamientos avanzados de oxidación, cuya elevada eficacia para la eliminación de contaminantes recalcitrantes ha sido ampliamente estudiada y reconocida.

Tabla III.7. Toxicidad crónica (% de inhibición) obtenidos durante el tratamiento biológico descrito en la sección III.4.2.

Tiempo de contacto (horas)	% Inhibición
1	23
2	23
24	27
72	41
144	73

III.4.3. Pre-tratamiento físico-químico de aguas de cocido de corcho

En este trabajo se llevó a cabo un estudio de optimización de un pre-tratamiento físico-químico a escala de laboratorio basado en técnicas de coagulación/floculación (C/F) para ARC. Se utilizó para ello el sistema jar-test descrito en la sección III.3.7.2., y se ensayaron diferentes coagulantes y floculantes comerciales (tabla III.4) así como dos coagulantes comúnmente utilizados para el pre-tratamiento de aguas residuales industriales (FeCl_3 anhidro y $\text{Ca}(\text{OH})_2$).

En primer lugar, se evaluó el efecto de los coagulantes seleccionados. Para ello, se adicionaron al agua residual diferentes dosis (0.25, 0.5, 0.75 y 1 g/L) y se analizó la evolución de parámetros tales como el pH, la turbidez y el COD tras las adiciones.

La utilización de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fue ineficiente ya que se obtuvo una eliminación máxima de sólo un 16% de COD y no se logró reducir la turbidez a una concentración de coagulante de 0.75 g/L. Además, la utilización de este coagulante supuso un aumento significativo del pH, que varió en función de la dosis utilizada (pH 8.73 para 0.25 g/L; pH 11.2 para 0.5 g/L; pH 11.9 para 0.75 g/L y 12.2 para 1g/L).

En cuanto a la turbidez, la mayor eliminación (86%) se obtuvo mediante el uso de FeCl_3 anhidro a una concentración de 0.5 g/L. Los coagulantes QUIFLOC E-500, ECOTAN BIO, QUIFLOC NT-520 y QUIFLOC 225-K mostraron una eliminación de turbidez de 68%, 64%, 55% y 19% a una concentración de 1 g/L. El resto de concentraciones ensayadas para estos coagulantes resultaron en un aumento de la turbidez. Estos resultados fueron muy importantes a la hora de seleccionar el coagulante, ya que una turbidez elevada limita la eficiencia de procesos avanzados de oxidación basados en la utilización de radiación solar.

Por otro lado, a excepción de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, todos los coagulantes mostraron eliminación de DOC entre el 20 y 64%. La mayor eliminación de DOC (64%) fue para QUIFLOC E-500 a una concentración de 1g/L. La figura III.38 muestra un resumen de los valores de COD eliminados.

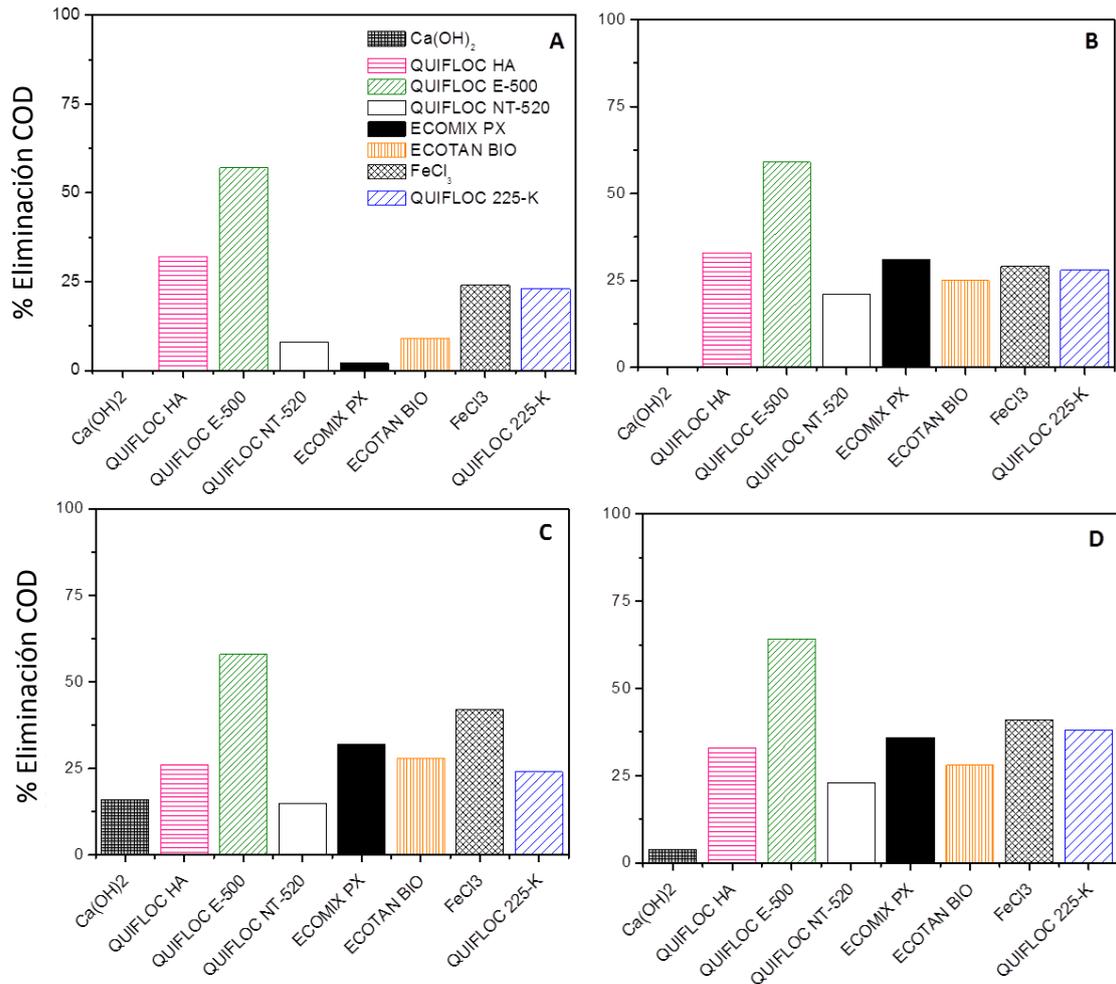


Figura III.38. Eliminación de COD utilizando coagulantes comerciales a diferentes concentraciones: a) 0.25 g/L, b) 0.5 g/L, c) 0.75 g/L y d) 1 g/L.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia conseguida sólo con coagulantes, se decidió probar además tres floculantes comerciales (QUIFLOC AC/9800, QUIFLOC 2030/W Y QUIFLOC AC-6010). Para ello, se adicionó una concentración de 0.5 g/L de cada floculante a las ARC ya conteniendo los coagulantes que presentaron la mejor eliminación de COD y turbidez (ECOTAN BIO, QUIFLOC 225-K, QUIFLOC NT-520 a 1 g/L; FeCl₃ y Ca(OH)₂ a 0.75g/L). Las pruebas se hicieron a los pH iniciales de 4.8 y de 10.

No se encontraron mejoras significativas salvo para el caso de FeCl₃ en el que su combinación con QUIFLOC 2030 (a pH 4.8) y QUIFLOC 9800 (a pH 10) dió como resultado un porcentaje de eliminación de turbidez del 97% y 95%, respectivamente, mientras que al combinarlo con QUIFLOC 6010 se obtuvo una eliminación de turbidez inferior, de un 70%. El porcentaje de eliminación de COD al agregar los tres floculantes

a pH 10 a las aguas residuales conteniendo FeCl_3 tuvo un incremento únicamente del 1%-2% con respecto a la utilización únicamente de FeCl_3 .

La combinación de coagulante y floculante ocasionó en todos casos una alta formación de espumas, lo que dificultaría la aplicación de este proceso a escala industrial. Por tanto, se seleccionó como mejor opción FeCl_3 a una concentración de 0.5 g/L (figura III.39), adoptando un compromiso entre eficiencia en eliminación de turbidez y COD, y una menor utilización de reactivos.

A partir de las condiciones de operación seleccionadas para la fase de pre-tratamiento, se realizaron pruebas de toxicidad aguda y biodegradabilidad mediante ensayos de respirometría antes y después de la adición de FeCl_3 . Los resultados obtenidos mostraron para las medidas de toxicidad aguda un pequeño aumento del porcentaje de inhibición del 56% al 63%. Sin embargo, la biodegradabilidad a corto plazo permaneció constante, mostrando un valor de 0.1 (no-biodegradable).



Figura III.39. Agua residual de cocido de corcho antes y después del pre-tratamiento físico-químico con FeCl_3 .

Es importante mencionar que después del pre-tratamiento con FeCl_3 , quedó una concentración residual de Fe (III) en disolución de 46 mg/L. Este aspecto resultará beneficioso a la hora de aplicar un proceso de oxidación avanzada basado en foto-Fenton solar, ya que no será necesario añadir el reactivo de hierro. Sin embargo, hay que tener también en cuenta que altos contenidos de hierro en disolución pueden dar lugar a la reducción de la eficiencia de un tratamiento mediante ozonización. La presencia de Fe (III) en disolución puede dar como resultado la formación de complejos hierro-orgánicos muy estables que no serían oxidados posteriormente mediante ozono

[Cromley y cols., 1976; Karlsson y cols., 2012; De Torres-Socias y cols., 2013]. Debido a ello, en los procesos de ozonización se decidió utilizar el coagulante ECOTAN BIO a una concentración de 1 g/L. En este caso, la utilización de técnicas de respirometría mostró un aumento significativo del 56% al 93% en el porcentaje de inhibición después del pre-tratamiento físico-químico y una disminución en la biodegradabilidad a corto plazo de 0.03 (no-biodegradable). Esto se traduce en que la fracción biodegradable y no tóxica de las ARC es eliminada durante el proceso de coagulación.

El pre-tratamiento optimizado a escala de laboratorio se ejecutó a escala planta piloto como paso previo a los procesos avanzados de oxidación (foto-Fenton solar (FF) y ozono). Para ello se utilizó la planta piloto de coagulación-floculación/filtración descrita en la sección III.3.7.3.

III.4.4. Procesos avanzados de oxidación aplicados a la depuración de aguas de cocido de corcho tras una primera fase de pre-tratamiento físico-químico

III.4.4.1. Ozonización combinada con un pre-tratamiento de C/F utilizando ECOTAN BIO

En general, cuando se utiliza el ozono como PAO a un pH alto (mayor de 9), se favorece la degradación de contaminantes presentes en la muestra mediante la reacción indirecta (más rápida) [Langlais y cols., 1991] descrita en el capítulo I de este trabajo. Además, mediante la adición de H_2O_2 en el sistema de ozonización se favorece la generación de radicales HO^\bullet [Peyton y cols., 1988], beneficiando por tanto a la eficacia del tratamiento.

Se estudió el proceso de ozonización tras el pre-tratamiento de C/F utilizando ECOTAN BIO bajo tres condiciones experimentales: a) ozonización a pH 5.6 (habitual del ARC); b) ozonización a pH 12; c) ozonización a pH 12 + H_2O_2 . Para el último caso, se adicionaron dosis de 200 mg/L de H_2O_2 a lo largo del experimento. En la figura III.40 se muestra la evolución del COD en función del consumo de ozono para los tres ensayos.

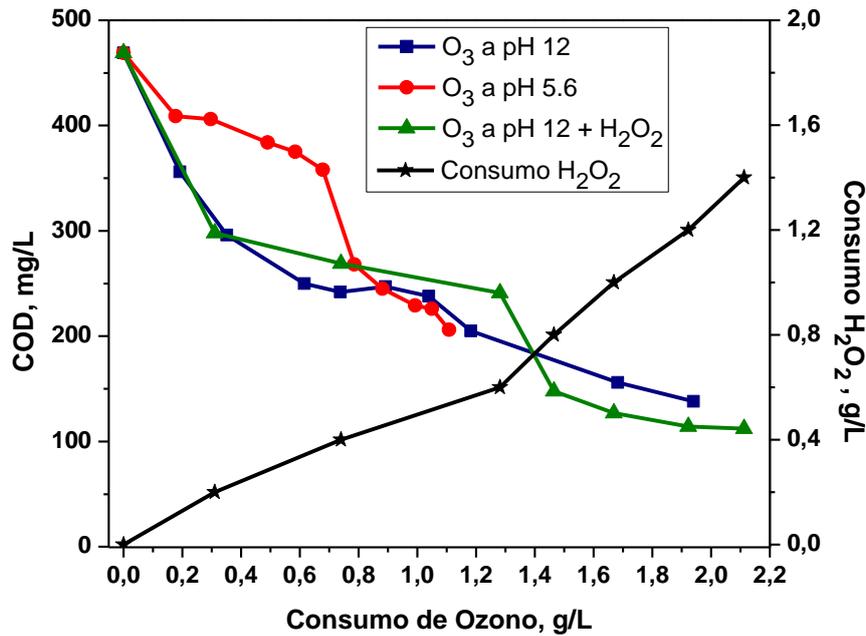


Figura III.40. Evolución de DOC y H₂O₂ en función del consumo de O₃ durante los tres experimentos de ozonización (pH natural 5.6, pH 12 y pH 12 + H₂O₂).

Para el caso particular del experimento de ozonización a pH 5.6, tras 6 horas de experimento, se detectó que el ozono en fase gaseosa a la salida del sistema (3.3 g/h) era prácticamente igual al ozono generado (3.6 g/h). Esto se traduce en una saturación del sistema, lo que significa que el consumo de ozono en fase líquida se detiene (o ralentiza) a la vez que el proceso de oxidación, por lo que la transferencia de ozono de la fase gaseosa a la fase líquida también se detiene. En consecuencia, se decidió parar el ensayo tras 6 horas de experimento al considerar que el proceso de oxidación con ozono había finalizado. En este caso, el consumo de ozono fue de 1.1 g/L. Este valor resultó bajo con respecto a los experimentos a pH 12 y pH 12 + H₂O₂, donde el consumo estuvo alrededor de 2 g/L.

En todos los casos, al final del proceso de ozonización, los ácidos carboxílicos analizados (glicolato, acetato, formiato y maleato) se eliminaron completamente, excepto el oxalato que permaneció en el sistema en concentraciones de 110 mg/L, 207 mg/L y 106 mg/L para los experimentos de ozonización a pH 5.6, pH 12 y pH 12 + H₂O₂, respectivamente. En las muestras finales además se detectaron concentraciones

insignificantes de amonio, nitrato y nitrito, mientras que el nitrógeno total se mantuvo siempre entre 16 y 32 mg/L.

Se realizaron tests de toxicidad aguda basados en respirometría en los tres experimentos. Los resultados mostraron una inhibición constante entre un 70-80% para el experimento a pH 5.6. Sin embargo, en los experimentos a pH 12 y pH 12 + H₂O₂ el porcentaje de inhibición se incrementó a lo largo de los ensayos llegando incluso a un 90% al final del experimento a pH 12.

III.4.4.2. Tratamiento mediante foto-Fenton solar en un fotorreactor basado en captadores tipo CPC

El ARC procedente de un pre-tratamiento de C/F con FeCl₃ se introdujo en un fotorreactor tipo CPC para su tratamiento mediante foto-Fenton solar. Tras ajustar el pH del ARC a 2.8 (pH óptimo para el proceso de foto-Fenton), se aseguró que el Fe (III) residual procedente del proceso de C/F (46 mg/L) estuviera en disolución. A continuación se adicionaron 800 mg/L de H₂O₂ y se destapó el foto-reactor CPC iniciándose el proceso de foto-Fenton solar. A lo largo del ensayo, se llevaron a cabo adiciones de 200 mg/L de H₂O₂ a medida que éste se consumía. El valor final de consumo de H₂O₂ fue de 4.3 g/L, registrándose una energía UV acumulada en el fotorreactor de 1.54 kJ/L tras 15 horas de iluminación.

En la figura III.41 se muestra la evolución del COD, DQO y hierro frente al consumo de H₂O₂ a lo largo del proceso de foto-Fenton solar. El contenido en Fe (III) inicial en el experimento (después el proceso de C/F y ajuste del pH a 2.8) fue de 46 mg/L. Esta concentración de hierro disuelto disminuyó a lo largo del tratamiento, alcanzando una concentración prácticamente constante de alrededor de 20 mg/L que se mantuvo hasta el final del experimento. COD y DQO disminuyeron un 92% y 86%, respectivamente. La presencia de espuma durante todo el tratamiento de oxidación ocasionó una disminución y después un aumento de estos valores en puntos específicos del tratamiento. Esto originó que parte del contenido orgánico quedara retenido en la espuma (y esto produjo una disminución aparente en el COD y DQO que contenían las muestras tomadas de la fase acuosa), y cuando esta desaparecía durante el tratamiento se liberaba ese contenido en el agua, aumentando de nuevo COD y DQO. Pero, en general,

la figura III.46 presenta una disminución relevante de COD y DQO ya que después de una dosis de $H_2O_2 > 3$ g/L no se generó más espuma.

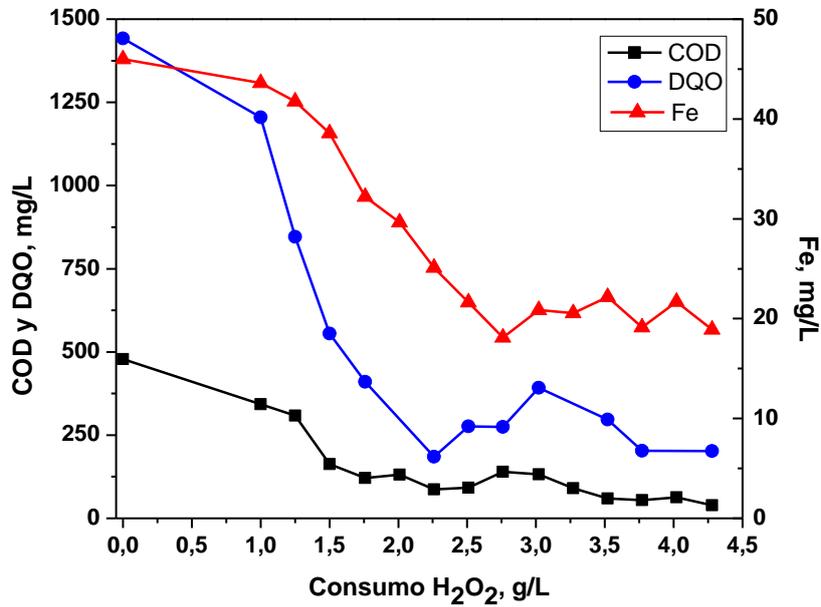


Figura III.41. Evolución del COD, DQO y hierro total en función del consumo de H_2O_2 durante el proceso de foto-Fenton solar.

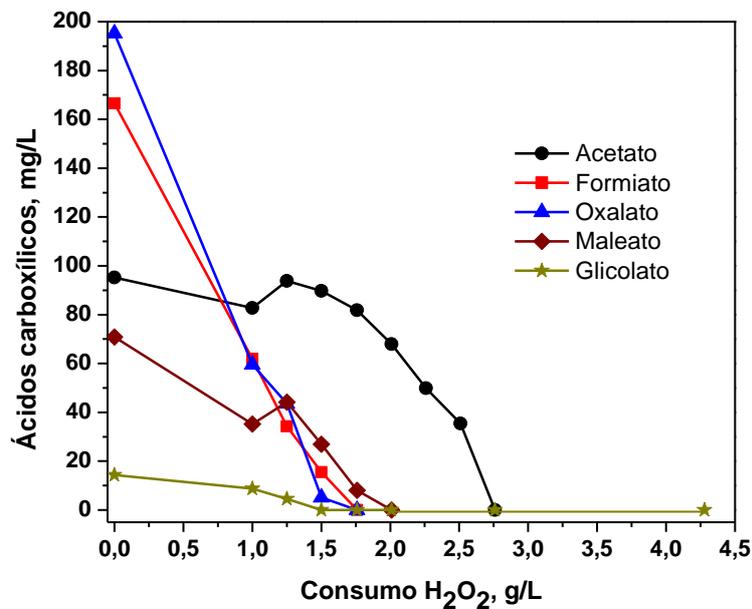


Figura III.42. Evolución de ácidos carboxílicos en función del consumo de H_2O_2 durante el proceso de foto-Fenton solar.

Los ácidos carboxílicos (acetato, formiato, oxalato, maleato o glicolato) se monitorizaron a lo largo del experimento (figura III.42), indicando la progresiva oxidación de los compuestos orgánicos presentes en el ARC. Además se produjo un aumento en la concentración de amonio desde un valor inicial de 30 mg/L hasta 473 mg/L al final del experimento.

Finalmente se midió la toxicidad aguda y crónica mediante respirometría en las muestras al final del experimento. Los resultados indicaron la inexistencia de toxicidad aguda, mientras que se detectó un 46% de inhibición para la toxicidad crónica. Con respecto a los valores de biodegradabilidad, ésta no mejoró sustancialmente durante el tratamiento ya que su valor se mantuvo por debajo de 0.2.

III.4.4.3. Comparación entre foto-Fenton solar y ozono para el tratamiento de aguas residuales de cocido de corcho

En general, los tratamientos de ozonización mostraron una menor eficiencia en cuanto a la eliminación de COD en comparación con el proceso de foto-Fenton solar, incluso cuando se adicionó H₂O₂ para favorecer la generación de radicales hidroxilo. Además, es importante destacar los altos valores de toxicidad aguda que persisten al final de ambos procesos, siendo más importantes en el caso de la ozonización en comparación con el tratamiento de foto-Fenton solar. Por otro lado, y con respecto al consumo de reactivos, la cantidad requerida de peróxido de hidrógeno en el proceso de foto-fenton solar resultó ser muy elevada comparada con los valores de consumo de ozono observados a pH 5.6 y pH 12. Este dato deberá tener una influencia destacada a la hora del cálculo de los costes de operación que podrá verse compensado con el consumo energético requerido para la producción de ozono.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó el tratamiento de foto-Fenton solar como la mejor opción para la oxidación de ARC pre-tratada mediante un proceso de C/F.

Tabla III.8. Comparación de diferentes PAO (tras C/F): foto-Fenton, ozonización a pH 5.6, ozonización a pH 12 y ozonización a pH 12 + H₂O₂.

	Foto-Fenton solar (pH 2.8)	Ozono pH (5.6)	Ozono pH 12	Ozono pH 12 (H ₂ O ₂)
Eliminación COD (%)	92	56	71	76
Consumo O ₃ (g/L)	-	1.1	1.9	2.1
Consumo H ₂ O ₂ (g/L)	4.3	-	-	1.4
Toxicidad aguda (% Inhibición)	47	77	90	71
Fe(III) (mg/L)	19	0	0	0
NT (mg/L)	17	34	15	20
NH ₄ ⁺ (mg/L)	22	0.2	4.6	< LD
NO ₃ ⁻ (mg/L)	6.0	12.1	11.5	2.4

*El consumo de O₃ y H₂O₂ está referido al tiempo final de cada experimento.

Tras esta decisión, se realizaron bioensayos para evaluar la toxicidad aguda y crónica en las muestras procedentes de la línea global de tratamiento. Para ello se utilizaron los tests de toxicidad aguda y crónica descritos en la sección III.3.5 y los resultados obtenidos se presentaron usando los porcentajes de inhibición calculados siguiendo la ecuación III.11. Los valores obtenidos se muestran en la tabla III.9.

La respirometría y *Vibrio Fisheri* para ensayos de toxicidad aguda y crónica mostraron un aumento del porcentaje de inhibición a lo largo de la línea de tratamiento, aunque con valores diferentes. Para el test de respirometría utilizando fango activo, se obtuvo una variación de toxicidad aguda de un 48% en el ARC hasta un 71% después del proceso de foto-Fenton solar, mientras que los valores de toxicidad crónica mostraron un 46% de inhibición al final del proceso. La toxicidad crónica más elevada se midió para *Vibrio fisheri*, alcanzado el 100% de inhibición en muestras de foto-Fenton solar. Sin embargo, se observó una respuesta decreciente a lo largo del proceso en la toxicidad crónica de *Tetrahymena thermophila*. No se observaron efectos de toxicidad aguda para la especie *Artemia* tras la línea de tratamiento.

Tabla III.9. Bioensayos de toxicidad aguda y crónica para aguas de cocido de corcho a lo largo del tratamiento propuesto.

Toxicidad	Test	Microorganismo	INHIBICIÓN (%)		
			ARC	Después C/F	Después FF
Aguda	Respirometría	Fango activo	48	65	71
	BioFix® Lumi	<i>Vibrio Fisheri</i>	46.5	70	66.5
	Artokit	<i>Artemia</i>	16.67	0	0
Crónica	Respirometría	Fango activo	27.4	58.6	46
	BioFix® Lumi	<i>Vibrio Fisheri</i>	72	99.5	100
	Protoxkit	<i>Tetrahytnema Thermophyla</i>	100	71.3	23.3
	Daphtoxkit	<i>Daphnia magna</i>	5	5	0

Las pruebas realizadas con *Daphnia Magna* mostraron valores entre 0% - 5% de inhibición a las 48 horas. Estos resultados estuvieron de acuerdo con Mendocça y cols. (2007), mostrando una ausencia de correlación entre *Daphnia Magna* y *Vibrio Fisheri* en ARC. Sin embargo, en este trabajo, se produjo un crecimiento anómalo (desmesurado e inexplicable) de estos organismos sin motivo aparente (figura III.43), lo que hizo pensar que esta especie no era especialmente sensible a las muestras estudiadas.



Figura III.43. Imagen del ensayo de *Daphnia Magna* (48 horas) con ARC.

III.4.5. Comportamiento de la población bacteriana de un fango activo de EDAR urbana en contacto con aguas residuales de cocido de corcho tratadas mediante C/F + foto-Fenton solar

Debido a la imposibilidad de adaptar un tratamiento biológico aerobio a este tipo de aguas residuales complejas, se ha demostrado la necesidad de aplicar PAOs para su tratamiento. Sin embargo, es sabido que los PAOs presentan costes elevados en comparación con los tratamientos biológicos. Se ha demostrado que los PAOs son eficientes cuando se combinan con un tratamiento biológico [Oller y cols., 2011]. La aplicación de un PAO puede mejorar la biodegradabilidad y reducir la toxicidad de algunos efluentes, siendo posible la combinación con un tratamiento biológico posterior [Balcioglu y cols., 2007]. Esta combinación ayudaría a reducir los costes de operación [De Torres-Socias y cols., 2013].

En este trabajo se evaluó la efectividad de una ruta de tratamiento para ARC basada en la combinación de un pre-tratamiento físico-químico (C/F utilizando FeCl_3) seguido de un proceso de foto-Fenton solar y por último un sistema biológico adaptado. Al igual que en apartados anteriores, para la evaluación del proceso de adaptación del sistema biológico se utilizaron parámetros químicos y microbiológicos (SST, SSV, COD, DQO, contenido iónico, microscopía óptica, recuento en placa, extracción de ADN y qPCR).

Tras la etapa de C/F, el pH de las muestras se ajustó a 2.8. La adición de hierro no fue necesaria (en la etapa de C/F quedó entre 46 y 80 mg/L de Fe (III) disuelto. Se realizaron dos experimentos diferentes de foto-Fenton solar (FF-1 y FF-2) mediante la adición de dos dosis diferentes de H_2O_2 (1g/L y 2.5 g/L, respectivamente) logrando detener la oxidación parcial de las aguas residuales en dos puntos diferentes del tratamiento que presentan valores distintos de biodegradabilidad. Los resultados obtenidos para la ruta de tratamiento propuesta se observan en la tabla III.10.

Los resultados mostraron un porcentaje de eliminación de COD y DQO de un 63% y un 59% respectivamente tras la etapa de C/F, mientras que la biodegradabilidad se mantuvo constante en un valor de 0.1. Los dos experimentos de foto-Fenton solar (FF-1 y FF-2) mostraron incrementos de valores de biodegradabilidad final a 0.2 y 0.3, respectivamente, con una disminución sustancial de COD y DQO, siendo superior

cuando la dosis de H₂O₂ fue más elevada, tal cual se indica en la tabla III.10. En ambos experimentos, el Fe (III) en disolución se mantuvo en un valor de unos 70 mg/L.

Tabla III.10. Caracterización de agua residual de cocido de corcho después de las diferentes etapas de la ruta de tratamiento.

	ARC	C/F	FF-1	FF-2
NT (mg/L)	35.0	13.6	14.8	15.0
COD (mg/L)	1060	390	270	70
DQO (mg/L)	2970	1220	810	215
Consumo de H ₂ O ₂ (g/L)	-	-	1.0	2.5
Biodegradabilidad a corto plazo	0.1	0.1	0.2	0.3

*Valores de biodegradabilidad a corto plazo: 0.1 (No biodegradable), 0.2-0.3 (poco biodegradable)

Para el estudio del post-tratamiento biológico, el pH de las aguas residuales tratadas se ajustó a 7. Posteriormente, y con el fin de simular la posible dilución de este tipo de aguas residuales complejas en un tratamiento biológico convencional que no solo reciba de alimentación este tipo de efluente, un litro de cada muestra procedente de los experimentos FF-1 y FF-2 se puso en contacto con 4 litros de fango activo procedente de una EDAR urbana, en un reactor biológico a escala de laboratorio (dichas diluciones se correspondieron con 54 mg/L y 17 mg/L de COD inicial, respectivamente). Estos valores fueron seleccionados considerando el volumen máximo de ARC viable para evitar una dilución excesiva de los fangos activos que llevaría a una reducción drástica de los SSV que inhibiera directamente el sistema biológico. Los experimentos biológicos se denominaron B1 (procedente de FF-1) y B2 (procedente de FF-2). El tiempo de duración fue de 17 días (408 horas). En ambos casos, se realizaron cinco adiciones ARC tratada con foto-Fenton solar como alimentación orgánica al sistema a diferentes tiempos de contacto (0, 3, 7, 10 y 14 días). Finalmente, y con objeto no sólo de evaluar la adaptación de las comunidades microbianas en el sistema, sino también para descartar la falta de carga orgánica (COD inicial más elevado) como posible razón en la muerte y eliminación de determinadas especies microbianas a lo largo del experimento, se realizó una sexta adición de acetato de sodio (compuesto altamente biodegradable) tras 16 días de contacto. Se realizaron dos réplicas de cada uno de los experimentos.

III.4.5.1. Caracterización del fango activo utilizado en el estudio de adaptación al ARC parcialmente oxidada

El fango activo seleccionado para este estudio se recogió de un tratamiento secundario de una EDAR situada en El Toyo (Almería). Previamente al estudio biológico, el fango se mantuvo en aireación continua durante 24 horas con el objetivo de alcanzar la fase endógena y se caracterizó mediante parámetros analíticos y microscopía óptica.

Los parámetros estudiados fueron concentraciones de COD, DQO, SST, SSV, nitrógeno total y contenido iónico. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.11.

Tabla III.11. Caracterización del fango activo utilizado.

Parámetros (mg/L)	Fango activo	Parámetros (mg/L)	Fango activo
COD	11.4	NO ₂ ⁻	n.d.
DQO	35.4	SO ₄ ²⁻	250
SST	7.5	PO ₄ ²⁻	20.5
SSV	5.7	NH ₄ ⁺	n.d.
Nitrógeno total	4.5	Mg ²⁺	60.6
Na ⁺	480	Ca ²⁺	99.5
K ⁺	45.5	Trimetilamina	n.d.
Cl ⁻	730	CH ₃ COO ⁻	n.d.
NO ₃ ⁻	0.6		

n.d = no detectado

Las comunidades microbianas del fango activo se monitorizaron “in vivo” mediante la utilización de un microscopio óptico. Los resultados mostraron flóculos altamente compactos, con forma regular y tamaño medio, cubriendo aproximadamente un 60%-70% de la superficie. La microfauna predominante en el fango estaba compuesta principalmente por protozoos (flagelados como *Peranema* y ciliados como *Tetrahymena*, *Acineria*, *Coleps hirtus*, *Aspidisca* or *Thuricola*), metazoos (*Rotíferos*), y amebas (*Tecamebas* como *Arcella*). En la figura III.44 se pueden observar algunas imágenes de los microorganismos encontrados en el fango activo.

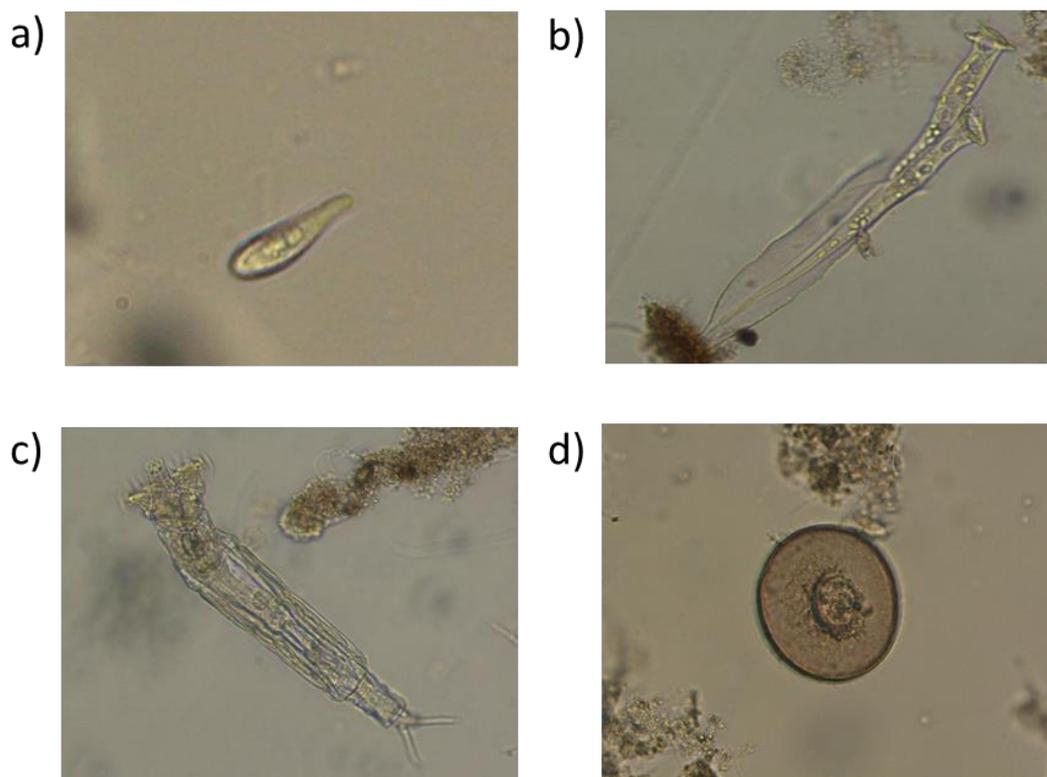


Figura III.44. Microfauna predominante en el fango activo observada mediante el uso de microscopía óptica (40X, contraste de fases). a) *Acineria*, b) *Thuricola*, c) *Rotífero*, d) *Arcella*.

III.4.5.2. Evaluación de los principales parámetros físico-químicos del estudio de adaptación

A lo largo del proceso de adaptación del fango a las ARC tras el proceso de foto-Fenton solar (experimentos B1 y B2), se estudió la evolución de COD, NT, SST, SSV y contenido iónico en las muestras a diferentes tiempos de contacto. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras III.45 y III.46.

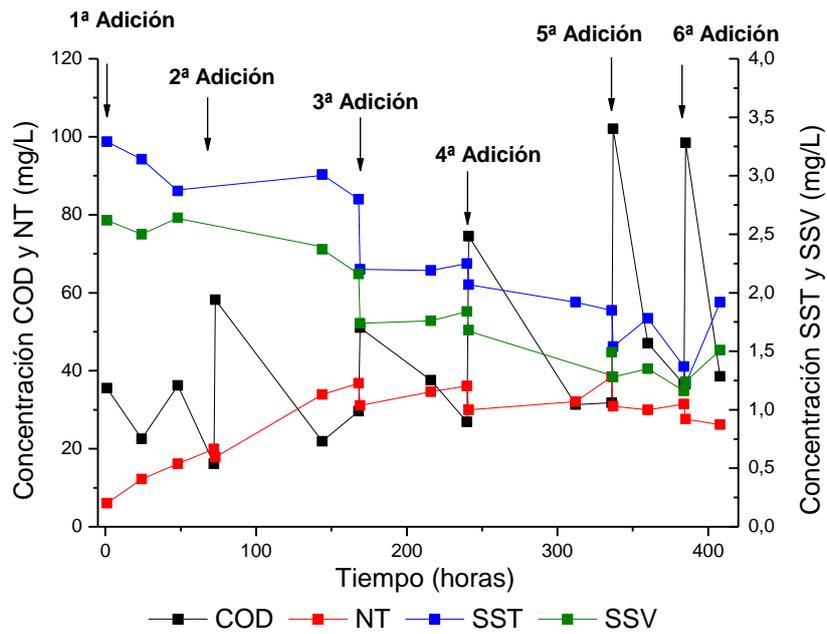
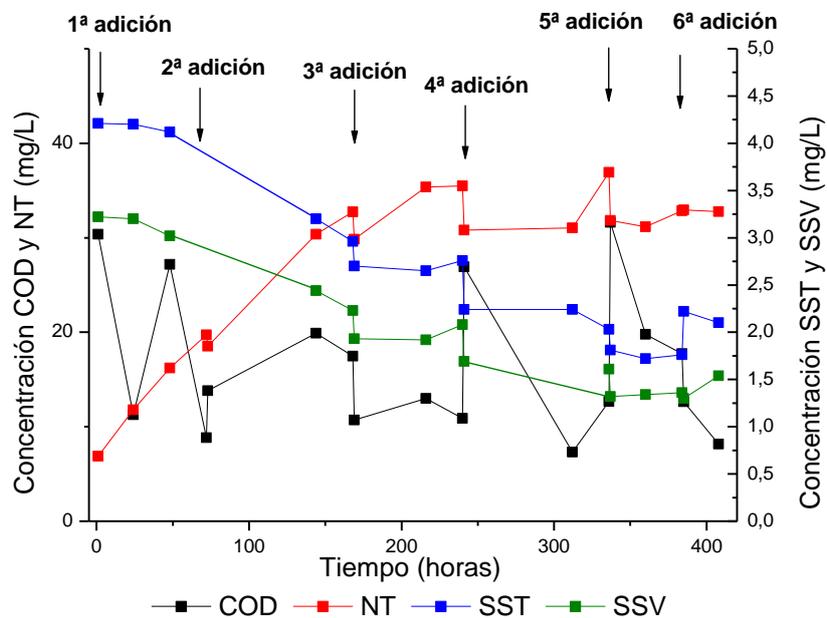


Figura III.45. Evaluación de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto del experimento B1 (utilizando fango activo y agua residual de cocido de corcho procedente del experimento FF-1).



III.46. Evaluación de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto del experimento B2 (utilizando fango activo y agua residual de cocido de corcho procedente del experimento FF-2).

Como se puede observar, en ambos casos los sólidos totales y volátiles disminuyeron a lo largo del tiempo de contacto (aproximadamente un 42% para B1 y un 51% para B2). Los valores de COD experimentaron valores máximos que correspondían a las adiciones y mínimos correspondientes a la degradación de la materia orgánica en el sistema. En el experimento B1 se observó una ligera tendencia a la acumulación de materia orgánica, mientras que en el B2 los valores mínimos se mantuvieron prácticamente constantes. Se observó un aumento del nitrógeno total, alcanzando un valor de 26.2 mg/L y 32.7 mg/L para B1 y B2, respectivamente, al final del tiempo de tratamiento.

El análisis de iones mostró un perfil similar en ambos experimentos (figura III.47). Los iones más significativos en el sistema fueron nitrato, sodio y potasio. Se produjo un aumento de más de un 300% para nitrato y potasio, mostrando concentraciones finales de 135 mg/L y 291 mg/L para B1, y de 170 mg/L y 224 mg/L para B2, respectivamente. El aumento de la concentración de nitratos indicó el buen funcionamiento del proceso de nitrificación que se produce comúnmente en sistemas biológicos. Sin embargo, el proceso de desnitrificación en este caso no se produjo debido a que en el experimento no se programaron ciclos anóxicos. La concentración de sodio aumentó a lo largo del tiempo de contacto, mostrando valores de 416 mg/L y 330 mg/L para B1 y B2 al final del experimento. Generalmente, el potasio se encuentra presente a altas concentraciones formando parte del citoplasma celular, por tanto, la detección de un aumento de estos iones en el fango evidencian una muerte celular debido a la ruptura de la membrana citoplasmática de algunas especies microbianas. Por otro lado, el aumento de iones sodio indicó el mal funcionamiento de intercambio de la membrana celular, y por tanto, un deterioro en el sistema biológico.

La reducción de SST, SSV, junto con una liberación significativa de iones, indicaron la posible ruptura de los flóculos del fango y por tanto, la desestabilización del sistema biológico. A consecuencia de ello, aparecieron nuevas especies microbiológicas en el fango activo (que se mostrarán en el siguiente epígrafe).

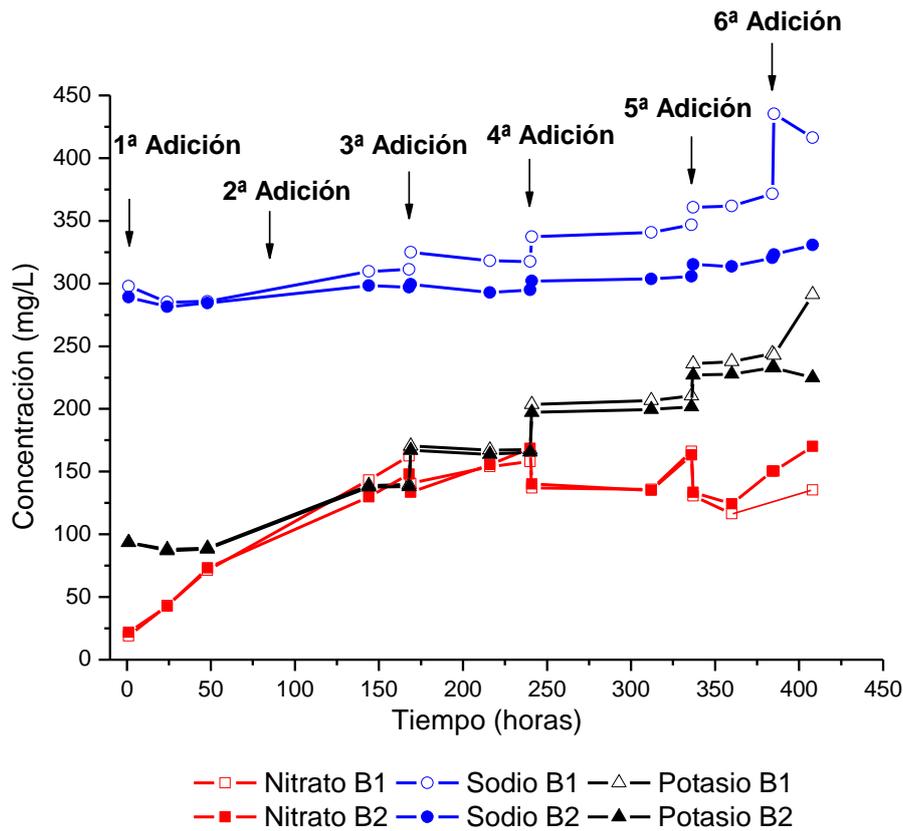


Figura III.47. Seguimiento de iones a lo largo del tiempo de contacto en experimentos B1 y B2.

III.4.5.3. Evaluación microscópica de muestras a lo largo de los experimentos de adaptación de fangos a ARC parcialmente oxidadas

Tras una hora de contacto, en ambos experimentos se observó una población similar a la de referencia (fango activo), detectándose un ligero aumento en el número de ciliados. Tradicionalmente la presencia de estas especies es común en fangos activos, y ha sido frecuentemente documentada por diversos autores [Al-Shahwani y Horan, 1991; Curds, 1982; Madoni y cols., 1993; Madoni, 1994 y Salvado y cols., 1995], indicando el aumento de la calidad del efluente tratado, por tanto se utilizan comúnmente como indicadores [Salvado y cols., 1995]. En el experimento B2 además se detectó la rotura de algunas *Arcellas*. Esta especie se encuentra comúnmente en sistemas donde la calidad de los efluentes es alta, y está asociada a un proceso de nitrificación efectivo [Madoni y cols., 1993]. Por tanto, los resultados podrían indicar que tras una hora de contacto, el sistema B1 funcionaría mejor que el sistema B2.

Tras 48 horas de contacto, la variabilidad y número de la comunidad biológica permaneció constante en el experimento B1. Sin embargo, el experimento B2 presentó una reducción significativa en el número de *Rotíferos*. Posteriormente, después de 144 horas de contacto, en ambos experimentos se produjo una disminución clara en el número de *Rotíferos*, apareciendo además algunas unidades de *Thuricola* muertas en el experimento B1 (figura III.48 a.2). La presencia de *Thuricola* está comúnmente relacionada con un buen rendimiento en la purificación de aguas, y está asociada con bajas cargas másicas y altos tiempos de retención celular [Isac y cols.]. Por tanto, su muerte es un síntoma preocupante de la situación del fango activo.

Tras una tercera adición a 169 horas de contacto, a rasgos generales, el número de especies fue mayor en B2 que en B1. Sin embargo, en ambos casos el número de *Rotíferos* y ciliados muertos aumentó considerablemente en el sistema (figura III.48 c.2). En términos generales, los ciliados y *Rotíferos* son las primeras especies que pueden verse afectados por tóxicos, actuando como indicadores de la presencia en el agua de compuestos tóxicos o recalcitrantes, indicando condiciones operativas adversas en los sistemas biológicos [Eikelboom, 2000]. Por tanto, la disminución de estas especies podría indicar la presencia de tóxicos que producirían una desestabilización del sistema biológico. En este tiempo de contacto (169 horas), además apareció la especie *Litonotus lamella* en el experimento B1, indicando una sedimentación pobre del sistema biológico.

En el experimento B1, tras 216 horas de contacto, desapareció la especie *Thuricola*, observándose la presencia de *Aspidisca* como única especie ciliada resistente. Se observó además un gran número de *Arcellas* rotas. La especie predominante consistió en unas cuantas unidades de *Rotíferos*. Estos resultados mostraron un fango de mala calidad, con un gran deterioro de la cadena trófica. Al mismo tiempo, en el experimento B2 el número total de especies ciliadas y *Rotíferos* permaneció constante.

Después de 312 horas de contacto, la presencia de bacterias filamentosas tuvo un gran desarrollo en ambos sistemas, permaneciendo hasta el final del experimento. El número total de especies disminuyó aún más en ambos experimentos y aparecieron algunas unidades sueltas de *Nematodos*. La presencia de estas especies son indicadoras de bajos niveles de carga, y por tanto una mineralización del sistema [Eikelboom, 2000].

A partir de 336 horas de contacto y hasta el final del experimento, se produjo (en ambos casos) la ruptura de los flóculos, que se mantuvo en aumento hasta el final del tiempo de contacto. A las 384 horas, para el experimento B1 se observaron unas cuantas unidades de *Rotíferos* y amebas, mientras que en B2 no se detectó la presencia de ninguna especie. Tras la adición final de acetato de sodio (como sustancia altamente biodegradable) a las 384 horas de contacto, no se observaron cambios ni mejora en la recuperación de los flóculos ni tampoco se produjo el desarrollo de nuevas especies. En la figura III.48 se puede observar la fragmentación y aparición de algunas de las especies mencionadas anteriormente.

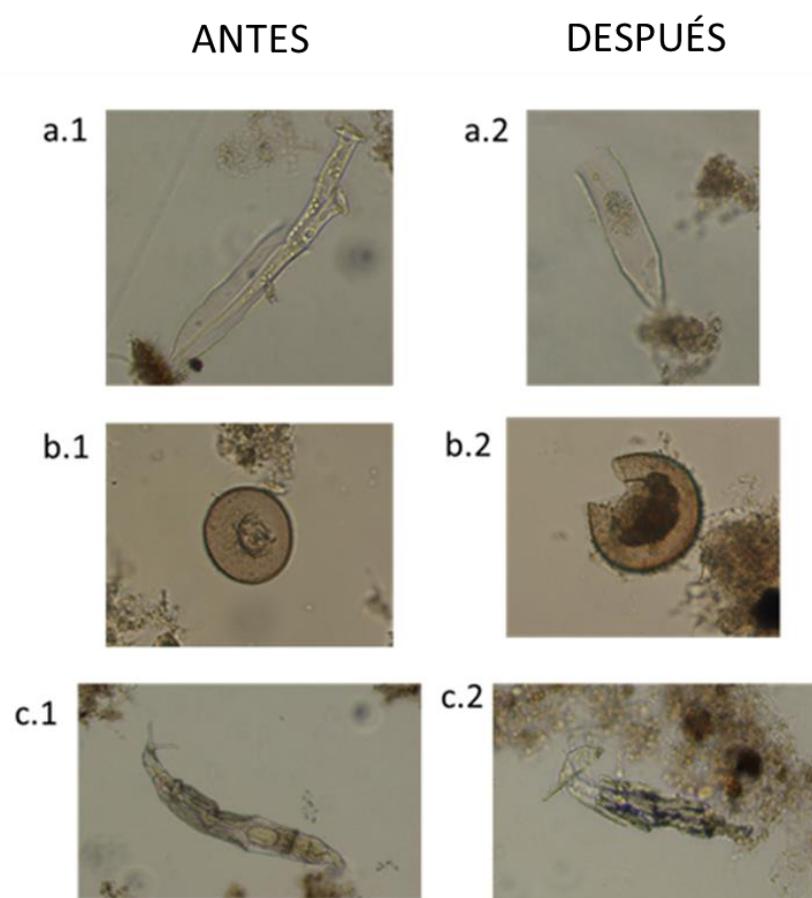


Figura III.48. Evolución de la comunidad microbiana durante el proceso de adaptación en el experimento B1. Imágenes obtenidas en el microscopio óptico (40X, contraste de fases). a.1) *Thuricola* presente en el fango activo inicial a.2) *Thuricola* rota después de 144 horas de contacto; b.1) *Arcella* presente en el fango activo inicial; b.2) *Arcella* rota tras 216 horas de contacto; c.1) *Rotífero* presente en el fango activo inicial; c.2) *Rotífero* roto después de 169 horas de contacto.

Los resultados mostraron por tanto una desestabilización global del sistema biológico, no siendo posible la adaptación de un sistema biológico tras el tratamiento de FF solar para este tipo específico de aguas residuales industriales.

III.4.5.4. Evaluación de los cambios en la población bacteriana mediante recuento en placa

Con el objetivo de evaluar cambios en la población bacteriana total a lo largo de los experimentos B1 y B2, se estudió la variación de la cantidad total de bacterias heterotróficas a lo largo del tiempo de contacto para ambos experimentos mediante la técnica de recuento en placa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.49.

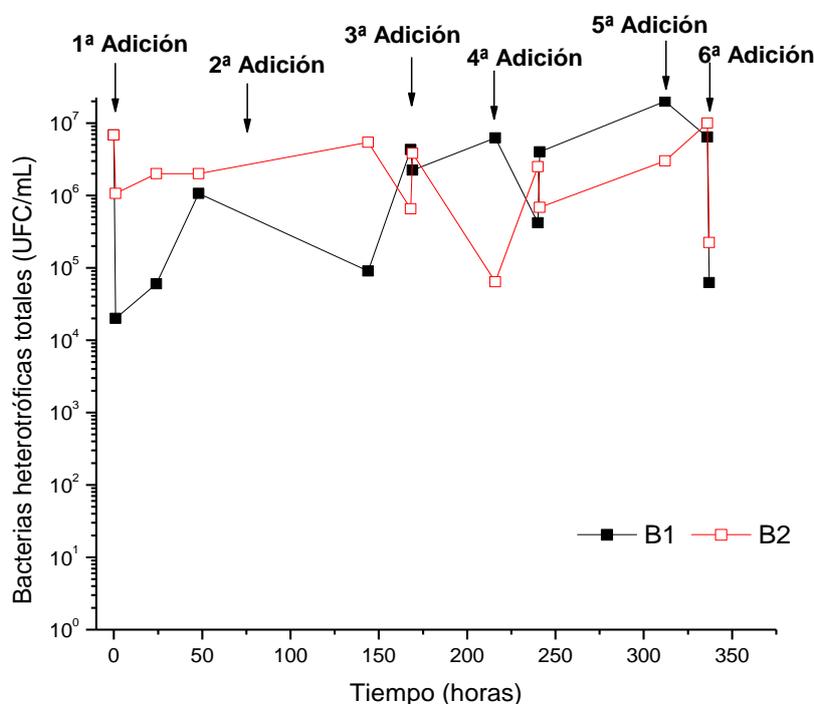


Figura III.49. Bacterias heterotróficas totales detectadas a lo largo del tiempo de contacto mediante recuento en placa para los experimentos B1 y B2.

La concentración inicial de bacterias heterotróficas totales obtenida fue de 10^{10} UFC/mL en el caso del fango activo. En todas las muestras analizadas durante los experimentos biológicos B1 y B2, la concentración de bacterias heterotróficas fluctuó entre 10^7 - 10^4 UFC/mL, con algunas etapas de reducción y recuperación de esta concentración bacteriana. Sin embargo, no se encontraron diferencias sustanciales con respecto a la tipología-morfología de las colonias encontradas, manteniéndose las

colonias naranja, amarilla y blanca durante todo el tiempo de contacto. Bacterias filamentosas aparecieron en ambos experimentos (tras 24 y 48 horas de contacto para B1 y B2, respectivamente), manteniéndose como población predominante hasta el final del experimento.

Por tanto, la técnica de recuento en placa no mostró cambios significativos en cuanto a la morfología de las colonias presentes en las muestras. Sin embargo, sí mostró un cambio de población predominante, observándose la formación de bacterias filamentosas.

III.4.5.5. Determinación de la concentración de ADN en el proceso de adaptación de un fango de EDAR urbana a ARC parcialmente oxidadas

Para una caracterización exhaustiva de las muestras procedentes de los experimentos B1 y B2, se evaluó la concentración de ADN en una serie de muestras recogidas a diferentes tiempos de contacto. En todos casos, la concentración de ADN varió entre 60 y 200 ng/μL. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.50.

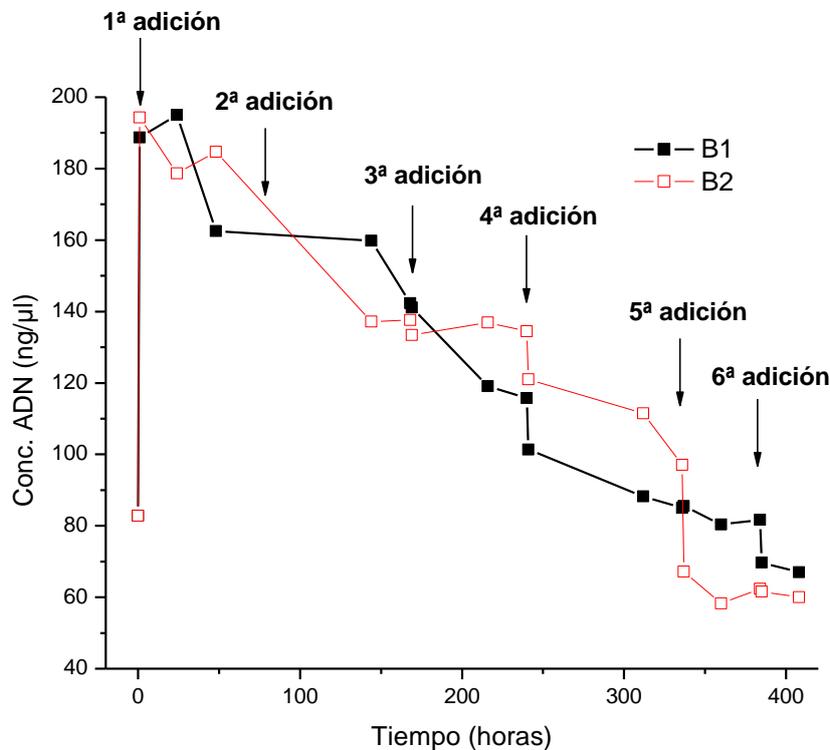


Figura III.50. Evolución de la concentración de ADN durante los experimentos B1 y B2 a escala de laboratorio.

La concentración inicial de ADN en el fango activo (83 ng/μL), aumentó tras la primera adición hasta valores de 189 ng/μL y 194 ng/μL en los experimentos B1 y B2, respectivamente. Sin embargo, la concentración de ADN disminuyó en ambos casos a lo largo de ambos experimentos, con una tendencia similar, hasta alcanzar un valor de aproximadamente 65 ng/μL al final del tiempo de contacto.

Estos resultados estuvieron en concordancia con la disminución de SST y SSV obtenida en apartados anteriores, evidenciando la reducción de la concentración de microorganismos en el fango activo a lo largo del proceso biológico debido a un posible efecto de inhibición crónica que este tipo de aguas residuales complejas pueden ocasionar en los fangos activos de una EDAR urbana.

III.4.5.6. Evaluación de bacterias totales ADNr 16S y bacterias amino-oxidantes (AOB) mediante técnicas de qPCR

Los resultados de concentración de ADN dan información genérica, por tanto, es necesaria la identificación de las especies que podrían causar los cambios más significativos en el proceso, como es el caso de bacterias asociadas con los procesos de nitrificación. Con este propósito, se evaluó la evolución de las bacterias totales ADNr 16S y las bacterias AOB en los experimentos B1 y B2 mediante las técnicas de qPCR. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.51.

Los perfiles para ambos experimentos (B1 y B2) fueron similares, mostrando una diferencia de aproximadamente 2 órdenes de magnitud entre la concentración de bacterias totales y AOB. Por otro lado, se observó una reducción de aproximadamente un orden de magnitud en ambos tipos de bacterias, sugiriendo una alteración del equilibrio del sistema de fangos activos (incluyendo los procesos de nitrificación). La reducción de la concentración de bacterias AOB, por tanto afectó negativamente al sistema biológico, empeorando la eficacia de los procesos de nitrificación.

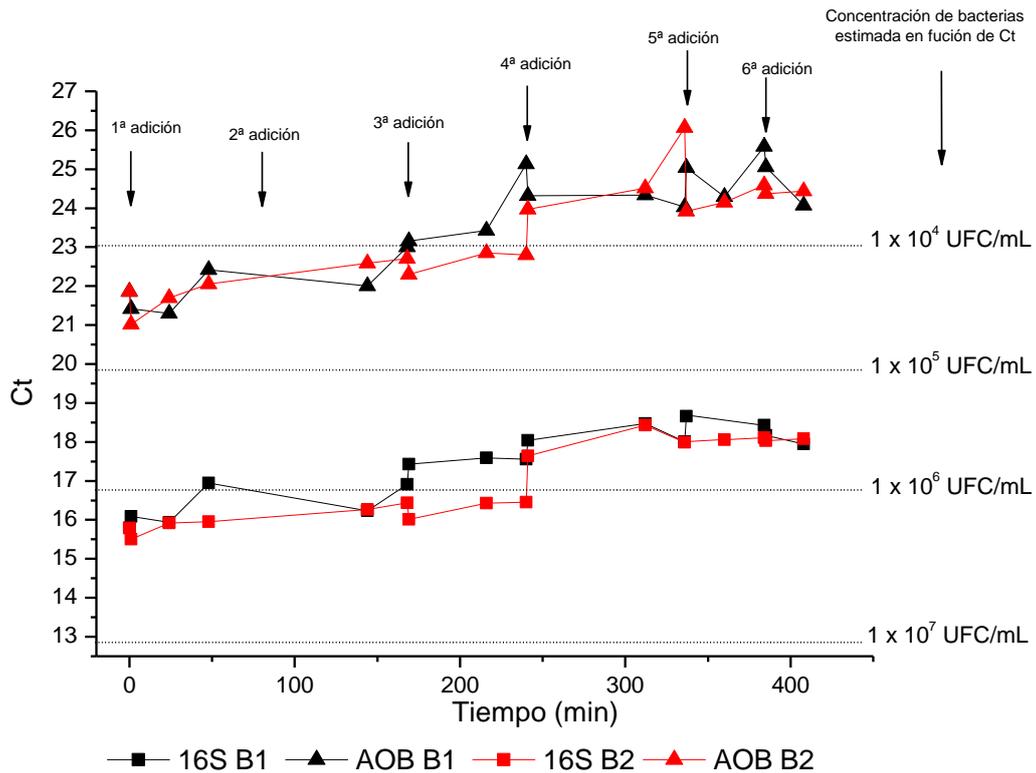


Figura III.51. Evolución de bacterias totales 16S rDNA y AOB durante los experimentos B1 y B2 a escala de laboratorio.

III.4.5.7. Evaluación de la toxicidad crónica durante el tratamiento biológico de adaptación

Teniendo en cuenta los resultados observados mediante microscopía óptica y qPCR, es importante la evaluación del desarrollo de un efecto de toxicidad crónica en ambos experimentos (B1 y B2). El seguimiento se llevó a cabo mediante el OUR (Oxygen Uptake Rate) en un respirómetro. Para ello se seleccionaron muestras de los experimentos B1 y B2 a diferentes tiempos de contacto (1, 48, 144, 312 y 408 horas). Los resultados se muestran en la tabla III.12.

En general, los resultados obtenidos para ambos experimentos fueron similares, mostrando un aumento de la inhibición a lo largo del tiempo de contacto. Para el experimento B1, la inhibición aumentó del 21% (1 hora) hasta el 83% en 408 horas de contacto. Para el experimento B2, transcurrido un tiempo de contacto de una hora, no se observó efecto de inhibición. Sin embargo, se incrementó a lo largo del tiempo de contacto alcanzándose un valor similar a B2 en 408 horas.

Tabla III.12. Evolución del porcentaje de inhibición de los experimentos B1 y B2 durante el tiempo de contacto.

Tiempo (horas)	Inhibición (%)	
	Experimento B1	Experimento B2
1	21	0
48	38	29
144	58	54
312	81	88
408	83	90

Estos resultados mostraron claramente el desarrollo de un efecto perjudicial a largo plazo sobre la población microbiana durante ambos experimentos, confirmando los resultados obtenidos anteriormente mediante otras técnicas.

En consecuencia, es necesario destacar que todos los resultados obtenidos (biológicos y de toxicidad crónica) ponen de manifiesto la imposibilidad de adaptación del fango activo de una EDAR urbana al ARC parcialmente oxidada mediante FF solar.

III.4.6. Aplicación de técnicas analíticas avanzadas para la búsqueda de compuestos desconocidos en aguas de cocido de corcho a lo largo de la línea de tratamiento propuesta

Aunque se ha realizado el análisis físico-químico de los diversos tratamientos aplicados a las ARC mediante la utilización de técnicas generales como la medida del COD, DQO, etc., así como análisis microbiológicos, no se ha evaluado la composición exacta con respecto a las especies químicas presentes, y tampoco se conocen estudios acerca de los subproductos que se puedan generar mediante el tratamiento de dicha agua residual. La composición en detalle de este tipo de aguas es muy poco conocida y debido a la complejidad de la matriz la identificación de la mayoría de compuestos presentes en el agua antes y después de cada tratamiento es una labor inabordable sin la disponibilidad de metodología analítica avanzada.

En este apartado de la tesis doctoral se presentan los procedimientos empleados para búsqueda de compuestos desconocidos o “non-target” descritos en el capítulo II de este trabajo y aplicados de forma práctica a ampliar el conocimiento respecto al ARC previo y a lo largo de la línea de tratamiento propuesta, tal cual se comenta en la sección II.4.2. Estos procedimientos se basaron en la inyección de una serie de muestras seleccionadas en un sistema LC-Q-TOF/MS. Previo a los análisis, las muestras se sometieron a una etapa de extracción también descrita en el capítulo II de esta tesis doctoral.

Se utilizaron tres tipos de muestras diferentes, correspondientes a diferentes pasos de la línea de tratamiento: ARC, el ARC después de la etapa de C/F y después del proceso de FF solar descrito en la sección III.4.4.2. Cada una de estas muestras se sometió al proceso de extracción (descrito en la sección II.3.3.1.1.) y el resultado fue la separación de cada muestra en 4 grupos (Fracciones A, B, C y D) de polaridades crecientes. Por tanto, en todas las muestras la fracción A fue la menos polar y la fracción D la más polar. Las condiciones cromatográficas y los parámetros seleccionados para el análisis y procesado de datos de cada muestra fueron idénticos a los utilizados en el capítulo II de este trabajo.

III.4.6.1. Monitorización de compuestos desconocidos mediante LC-Q-TOF/MS.

Evaluación cualitativa

La determinación del número total de picos válidos LC-MS mediante la monitorización de compuestos desconocidos utilizando LC-Q-TOF/MS permitió la evaluación cualitativa de las masas durante la línea de tratamiento seleccionada. Las muestras extraídas mediante SSPE de ARC, después del proceso de C/F y después del FF se escogieron como objetivo del estudio.

Además, se utilizó como compuesto control el acetonitrilo, y se realizó una comparativa de los resultados con el mismo, seleccionando únicamente los picos con una señal 10 veces más intensa que el control. Los picos seleccionados no tuvieron una intensidad inferior a 2000 cuentas ni una señal/ruido menor de 20. Con ello se consiguió la eliminación de interferencias con la línea base del cromatograma obtenido. La precisión de masa fue menor de 5 ppm y la relación de patrones isotópicos seleccionada mostró diferencias inferiores al 10%. Los espectros Full Scan de masa exacta y el procedimiento IDA utilizado recogieron los espectros MS/MS de los picos más abundantes en los cromatogramas.

Los resultados obtenidos para la determinación de los picos LC-MS relevantes se muestran en la figura III.52. Un total de 2187 picos fueron detectados para las muestras de ARC, 1087 después del proceso de C/F y 339 después del FF solar, mostrando una tendencia general de desaparición de picos cromatográficos relevantes a lo largo de la línea de tratamiento. Esto se puede interpretar como una eliminación progresiva de compuestos, confirmando por tanto, la elevada efectividad del tratamiento global para la eliminación de los contaminantes presentes en este tipo de agua residual.

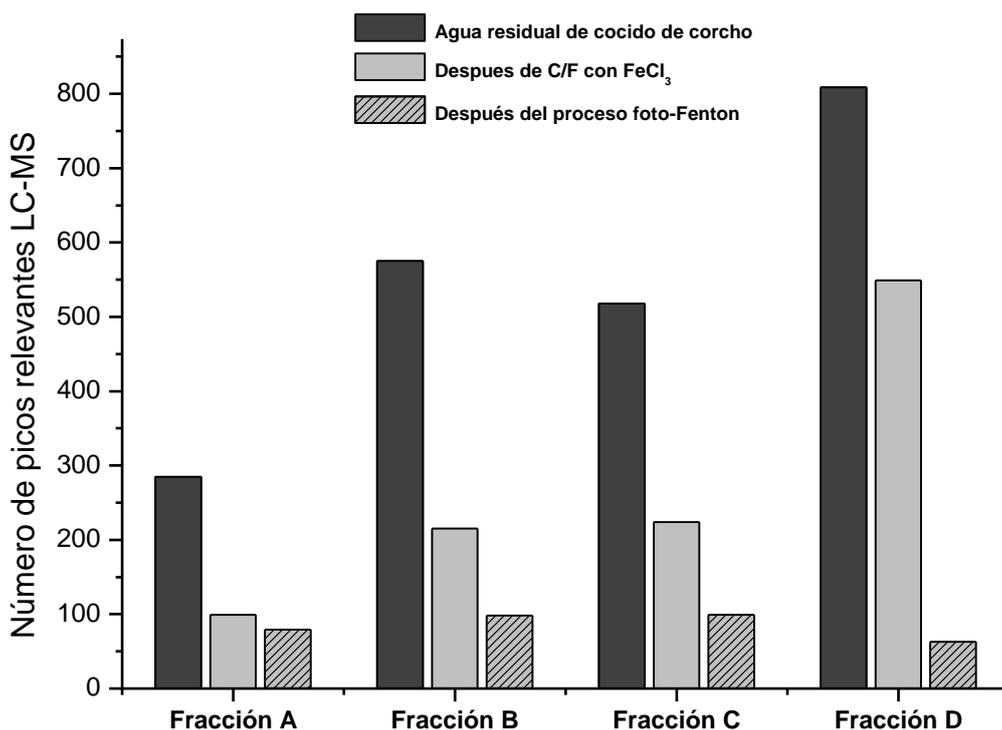


Figura III.52. Número de picos cromatográficos relevantes detectados durante el tratamiento para las muestras extraídas de forma fraccionada (fracciones A, B, C, y D).

Se observó además un aumento de picos relevantes a medida que aumentaba la polaridad de las fracciones, lo que indica la presencia mayoritaria de compuestos polares en las muestras. En términos globales, la fracción D (correspondiente a los compuestos más polares) fue la fracción que presentó valores más altos de degradación después del FF solar (>92%), y la fracción menos polar (fracción A) mostró los menores valores de degradación (~72%). Lo cual es congruente en cuanto a que un proceso de oxidación avanzada es más efectivo con aquellos compuestos que estén disueltos en agua (los más polares).

En general, el proceso de C/F mostró una alta eliminación de compuestos orgánicos en las fracciones A, B y C. Sin embargo, los compuestos más polares (fracción D) resultaron menos susceptibles a la eliminación en la etapa de C/F.

En la figura III.53 se muestra a modo de ejemplo un cromatograma de iones totales (TIC) obtenido para la fracción D a lo largo de la etapa de tratamiento. Este cromatograma evidencia los resultados comentados mediante la determinación del

número de picos relevantes LC-MS, correspondientes a la eliminación de un 68% de picos tras el proceso de C/F y un 92% de picos con respecto al ARC tras el proceso de FF solar. Conviene destacar no sólo la disminución en el número de picos sino también la clara reducción en la intensidad que se observa comparando los cromatogramas del agua bruta y pre-tratada mediante C/F, con el obtenido tras el proceso de FF solar (10^7 unidades de intensidad frente a 10^6 , respectivamente)

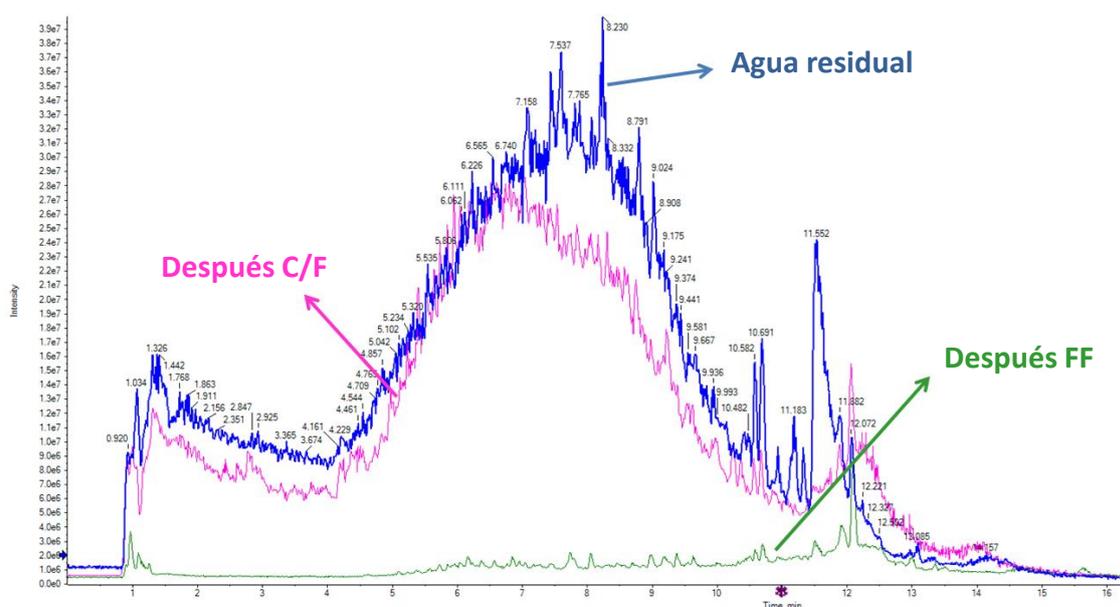


Figura III.53. Cromatograma de iones totales (TIC) para fracciones D a lo largo de la línea de tratamiento seleccionada para el ARC.

Aunque esta estrategia permitió dar una evaluación cualitativa del proceso, los picos seleccionados podrían no ser los constituyentes principales o predominantes en el ARC (y responsables o no de los elevados valores de toxicidad aguda y crónica obtenidos a lo largo de la línea de tratamiento). Además, aunque esta estrategia ha permitido agrupar, en rasgos generales, compuestos según polaridad, no ha logrado la identificación de dichos compuestos.

III.4.6.2. Aplicación de un método de análisis multivariable para la detección de productos de transformación persistentes a lo largo de la línea de tratamiento de aguas residuales de cocido de corcho

En este trabajo se aplicó un enfoque basado en metabolómica para el procesamiento de datos LC-HRMS adquiridos antes y después de la línea de tratamiento propuesta para la regeneración de ARC. Cada muestra representativa de las fracciones descritas en la

figura III.52 se inyectó cinco veces en el sistema LC-Q-TOF/MS para la obtención de datos significativamente estadísticos y minimizar la presencia de falsos positivos en las muestras.

Tal y como se describió en el capítulo II de este trabajo, se realizó un análisis PCA, obteniendo gráficos comparativos de clasificación (donde se mostró la agrupación entre varias muestras) y los gráficos de influencia correspondientes (donde los iones de varias masas se graficaron mediante su influencia en cada variable). El análisis conjunto de todas las fracciones de las muestras estudiadas mediante PCA resultó útil para el análisis inicial de las muestras, verificando su disposición en el sistema, y agrupando las principales semejanzas y diferencias entre ellas. En dicho análisis, el resultado de los gráficos PCA (figuras III.54 y III.55) indicó que los dos componentes principales para los que se organizan las muestras podrían explicar el 49.5% de su variación (31% PC1 y 18.5% PC2). Aunque estos porcentajes no fueron demasiado altos, la presencia de agrupaciones de muestras bastante compactas supuso buenos resultados en términos de estabilidad y reproducibilidad de resultados.

En el gráfico de clasificación (figura III.54), las fracciones B, C y D del ARC fueron claramente diferentes al resto. Debido a las condiciones de fraccionamiento de la etapa de extracción, se supuso que estas muestras contenían compuestos de polaridades bajas (B), medias (C) y altas (D). La fracción menos polar (A) fue similar a tres fracciones de la etapa de C/F (A, B y C).

Por otro lado, se observó que las fracciones D para las todas las muestras se encontraban alineadas respecto a PC1, lo que podría reflejar la presencia de compuestos similares. Además, los grupos de muestras de C/F y FF para la fracción D se encontraban bien definidos y la corta distancia entre ellos respecto a PC1 podría indicar la presencia de compuestos de características comunes.

Todas las fracciones obtenidas después del proceso de foto-Fenton mostraron un alineamiento claro con respecto a PC1, y las fracciones A, B y C, D también mostraron similitudes en cuanto a PC2. Esto puede ser debido a que durante un proceso de oxidación avanzada se produce una reducción sustancial en la cantidad de compuestos presentes, provocando una mezcla más homogénea en los productos de degradación, con estructuras y polaridades similares. Además, los radicales oxidantes reaccionan con

las estructuras orgánicas, rompiendo enlaces o uniéndose a ellas, provocando un aumento en la polaridad de los compuestos resultantes.

En términos globales, en el sistema se pudo observar la reducción de la carga orgánica y su homogeneización. Inicialmente, las cuatro fracciones del ARC podrían identificarse claramente. Después del pre-tratamiento de C/F, la distancia entre las muestras se redujo reflejando una similitud del contenido de las fracciones. En general, el tratamiento de C/F causa cambios sustanciales en el contenido orgánico de algunas mezclas industriales complejas [Pourrezai y cols., 2011] basadas en la polaridad debido a la adsorción de ciertos compuestos en los flóculos formados o a la co-precipitación. Finalmente, tras el proceso de foto-Fenton solar, se muestran dos grupos formados por las fracciones A y B (compuestos con baja polaridad) y las fracciones C y D (compuestos más polares)

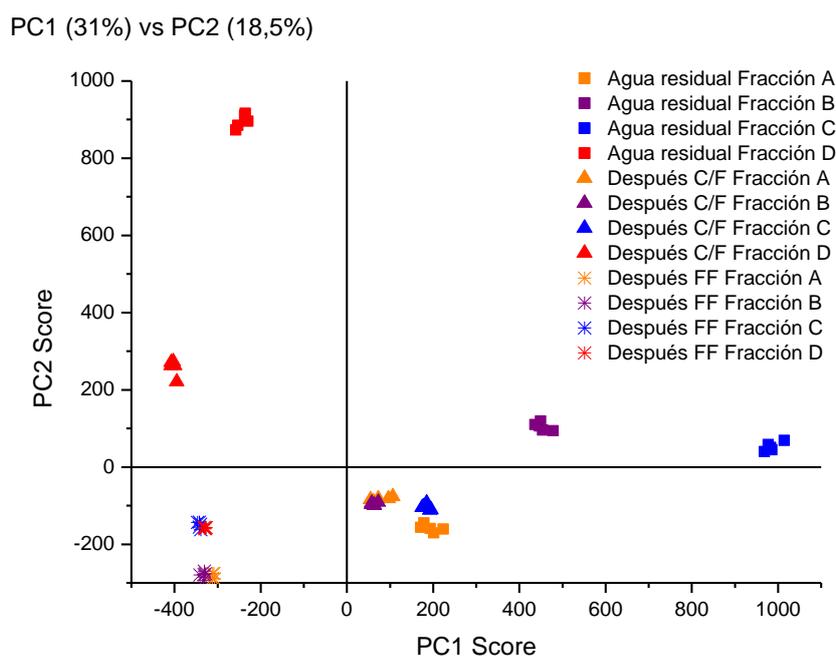


Figura III.54. Gráfico de clasificación obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones de la línea de tratamiento para el agua residual de cocido de corcho.

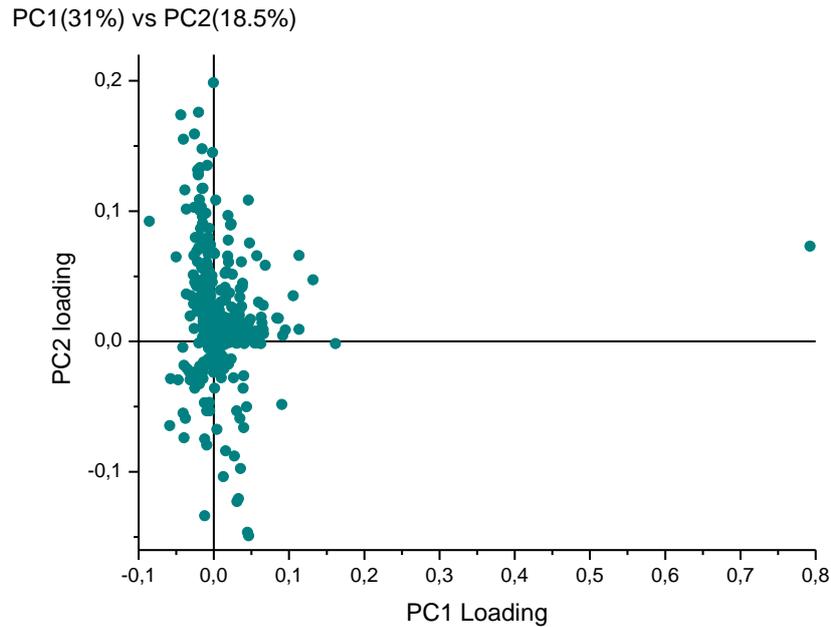


Figura III.55. Gráfico de influencia obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones de la línea de tratamiento para el agua residual de cocido de corcho.

Para la identificación de cambios durante la línea de tratamiento, así como la búsqueda posibles productos de degradación, se realizó un estudio más detallado, analizando cada una de las fracciones (A, B, C y D).

Los resultados de PCA obtenidos para el análisis de las fracciones A mostraron que los dos componentes principales para los que se organizan las muestras podrían explicar aproximadamente el 94% de la variación de datos (PC1 67.6% y PC2 26.8%). El análisis de las agrupaciones que aparecen en el gráfico de clasificación (figura III.56 a) indicó que las muestras de agua residual y después de la etapa de C/F eran similares a PC1 y opuestas a PC2. Esto se debe a que en el proceso de C/F, los compuestos poco polares podrían adsorberse en los flóculos que se forman mediante este proceso. En general las características serían parecidas para la mayoría de los compuestos que no se adsorben, lo que demostraría correlación en PC1, mientras que los compuestos que se adsorben en los flóculos presentarían cambios significativos (variación PC2).

Sin embargo, las muestras después del proceso de FF solar eran muy diferentes a las anteriores, ya que los compuestos presentes en el proceso habían reaccionado con los

radicales HO[•] produciendo moléculas oxidadas que suelen tener una polaridad más alta que sus precursores.

Se estudió la evolución de las masas durante el tratamiento propuesto mediante la selección de aquellas que mostraron diferencias significativas en el gráfico de influencia (figura III.56 b). Aunque la mayoría de las masas fueron degradándose (figura III.56 c), se detectaron cinco masas que permanecieron en el sistema después del proceso de FF solar (figura III.56 d). Además de ello, en el proceso de C/F se observó la aparición de dos masas (565 y 567). Esto podría deberse a la redisolución de algunos compuestos debido al cambio de pH provocado por el coagulante (FeCl₃). El ARC está constituida por una mezcla de compuestos fenólicos naturales con diferentes solubilidades y constantes de disociación. Por tanto, un cambio en el pH puede provocar la reducción o aumento de concentración de ciertas sustancias.

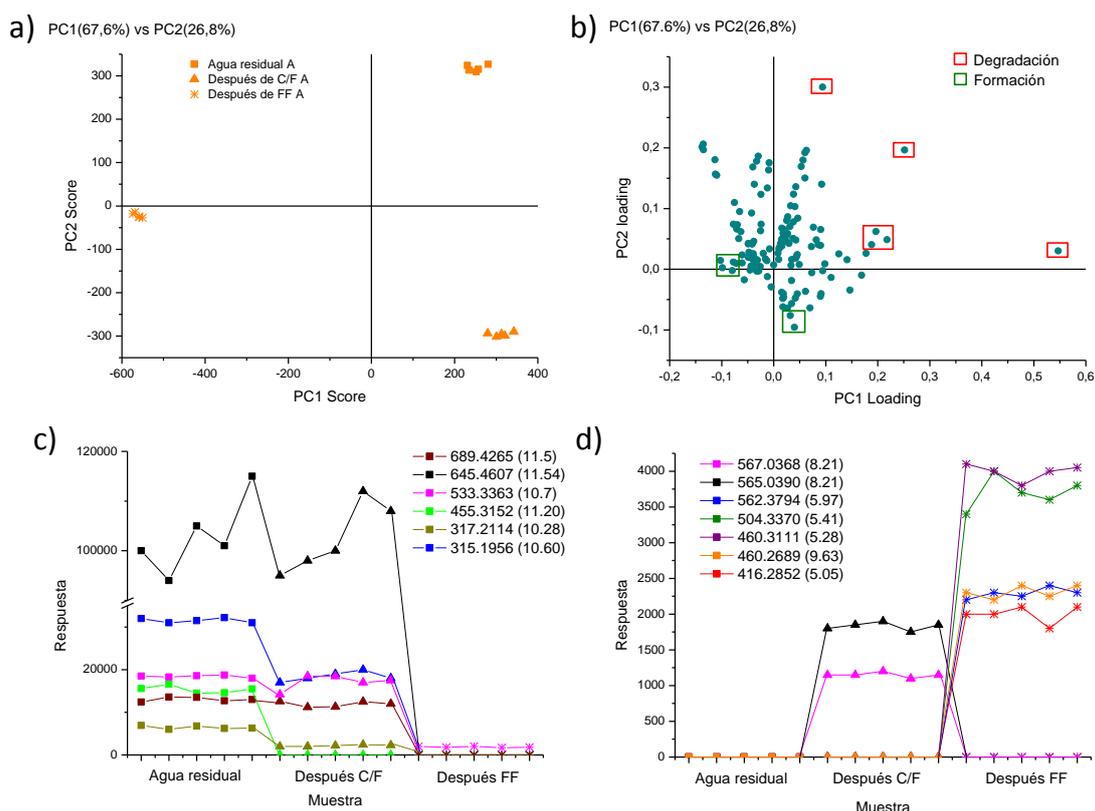


Figura III.56. Resultados de PCA para las fracciones A (baja polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Para la fracción B, los resultados de PCA obtenidos mostraron que los dos componentes principales para los que se organizan las muestras podrían explicar aproximadamente el 95% de la variación de datos (PC1 80.4% y PC2 14.8%). Sin embargo, debido a que el PC1 mostró un peso del 80% con respecto a la variación total, los cambios en cuanto a este componente fueron más significativos para explicar cambios en el sistema.

La diferencia entre las muestras tras la C/F y el FF solar en estas fracciones B, fue más pronunciada que en las fracciones A. Estas fracciones podrían incluir compuestos de polaridad baja-media que podrían interaccionar de una forma más fuerte con el proceso de C/F. Las masas obtenidas en el gráfico de influencia (figura III.57 b), indicaron que al menos 17 masas serían las responsables de las diferencias encontradas en el gráfico de clasificación (figura III.57 a). Durante el proceso de C/F, se encontraron 7 señales de sustancias características. La aparición de 5 de ellas (622, 446, 359, 337 y 228) podría deberse a la formación de nuevas sustancias o redisolución de sustancias contenidas en el sistema debido al cambio del pH del proceso. Dos de estas sustancias (622 y 446) resultaron persistentes incluso después del proceso de FF solar. A pesar de que las masas 359, 337 y 228 aparecieron únicamente durante el proceso de C/F, eliminándose tras el proceso FF solar, resultarían útiles para la evaluación específica del pre-tratamiento mediante C/F. (figura III.57 d).

Otra observación importante fueron los cambios significativos que se produjeron en algunos compuestos. Ejemplo de ello son las masas 578 y 534. Aunque estas masas estuvieron presentes en todas las muestras de la fracción B, su señal aumentó durante el tratamiento. Este comportamiento podría deberse a una mayor presencia en disolución de estos compuestos en función del pH, o por la generación de un metabolito común a varias sustancias contenidas en origen en la estructura del corcho, como por ejemplo suberina y cadenas alifáticas producidas durante el proceso de ebullición [Bernards y cols., 2002; Graça, 2015].

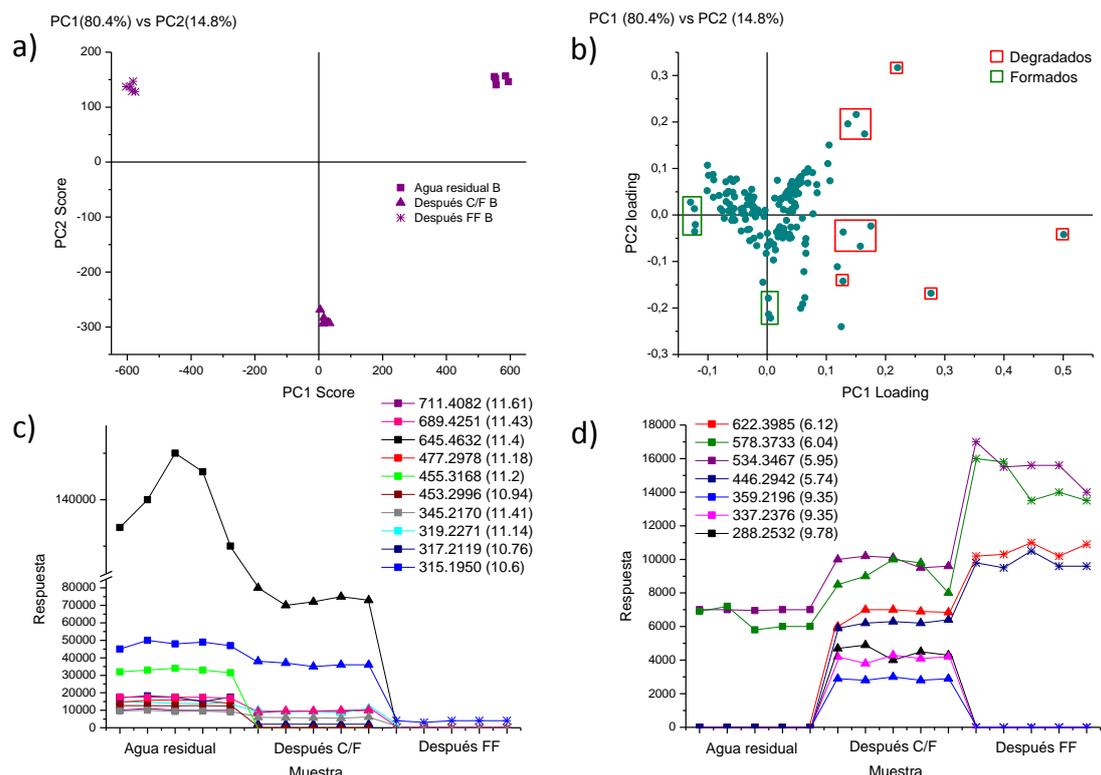


Figura III.57. Resultados de PCA para las fracciones B (baja-media polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Para la fracción C, los resultados de PCA obtenidos mostraron que los dos componentes principales para los que se organizan las muestras podrían explicar aproximadamente el 95% de la variación de datos (PC1 81% y PC2 14.1%). Al igual que en la fracción B, las variaciones en cuanto a PC1 fueron más significativas para explicar cambios en el sistema. Los compuestos presentes en estas fracciones tienen una polaridad media debido a su elución de los cartuchos de extracción en fase sólida con 90% MeOH / 10% diclorometano. La separación entre los grupos del gráfico de clasificación (figura III.58 a) fue clara, presentando una alta estabilidad y reproducibilidad del sistema. En el gráfico de influencia (figura III.58 b), se observó que la mayoría de los puntos se distribuyeron en la sección de las muestras de agua residual y en la sección correspondiente al efluente del proceso de C/F. Sin embargo, como en las demás fracciones, la mayoría de las masas serían compartidas, agrupadas en el centro del eje de coordenadas. En las figuras III.58 c y III.58 d, se muestran las principales masas que mostraron diferencias significativas, que corresponderían a compuestos formados o eliminados durante el tratamiento. Cuatro masas mostraron una degradación

significativa, sin embargo, tres de ellas (345, 645 y 689) también se encontraron presentes en la fracción B, lo que demostró que la polaridad de estos compuestos no es muy elevada y por tanto aparecen en ambas fracciones (B y C). Sin embargo, estas masas tuvieron en la fracción C una respuesta más intensa y un comportamiento más repetitivo y coherente.

Las masas formadas durante la línea de tratamiento en la fracción C (figura III.58 d) no se encontraron presentes en otras fracciones, a excepción de la masa 288 que se encontró también en la fracción B. En este caso, también se produjo la aparición de masas durante el proceso de C/F. De todas las masas formadas (651, 484, 460, 453, 440, 437 y 288), seis de ellas posiblemente proceden de la disolución de una fase absorbida o particulada debido al cambio de pH. Sin embargo, cuatro de ellas resultaron resistentes al proceso de FF solar. Durante este proceso de FF, las masas 288 y 651 desaparecieron, mientras que el resto de las masas aumentaron (437, 460 y 453) o se mantuvieron constantes (440 y 484).

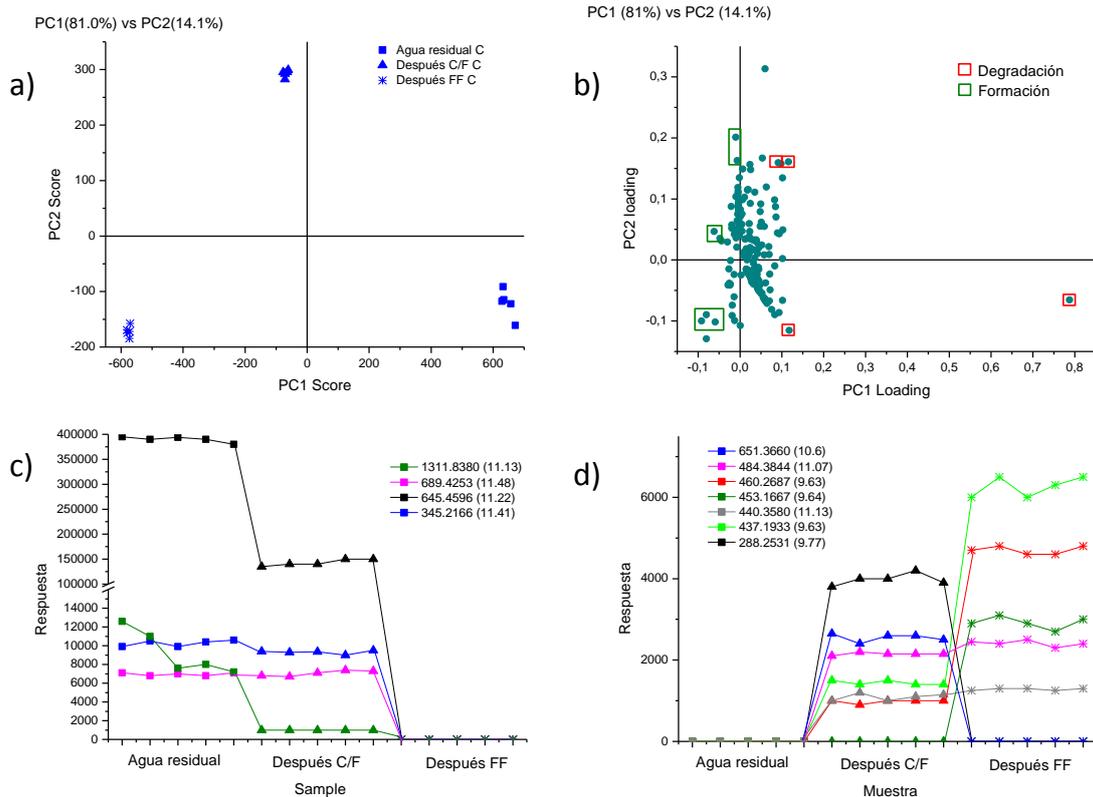


Figura III.58. Resultados de PCA para las fracciones C (media-polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

La fracción D corresponde a los componentes de alta polaridad. Dentro de estos compuestos podrían encontrarse polifenoles o fragmentos estructurales de ácido tánico. Los resultados de PCA para esta fracción se muestran en la figura III.59. A pesar de que en este caso el peso de PC1 fue solamente de un 60%, el conjunto PC1 + PC2 sumó el 88%, por lo que se pudo utilizar para el estudio de la variabilidad de los datos. En estas fracciones, la separación de las muestras estudiadas estuvo, al igual que en otros casos, claramente definida. Sin embargo, las muestras de C/F y FF solar fueron más parecidas que en el caso de las fracciones C. La observación de puntos en el gráfico de influencia (figura III.59 b), sugirió que algunas masas características podrían haberse formado durante el proceso de FF solar. Esto se podría corresponder con la oxidación de polifenoles, es decir, a la oxidación parcial de moléculas polares por HO[•], que aumentan su polaridad hasta que se produce la fragmentación de los compuestos en ácidos orgánicos de pequeño tamaño [Buxton y cols., 1988; Atkinson y cols., 1984; Legrini y cols., 1993].

Se encontraron, al igual que en el resto de fracciones, masas características eliminadas y formadas durante el tratamiento (figuras III.59 c y III.59 d). Las masas eliminadas mostraron tres coincidencias con respecto a las masas detectadas en la fracción B (645, 689 y 711). La presencia de masas similares en varias fracciones podría indicar que algunas moléculas presentan grupos funcionales capaces de interactuar con varios eluyentes de diferente polaridad.

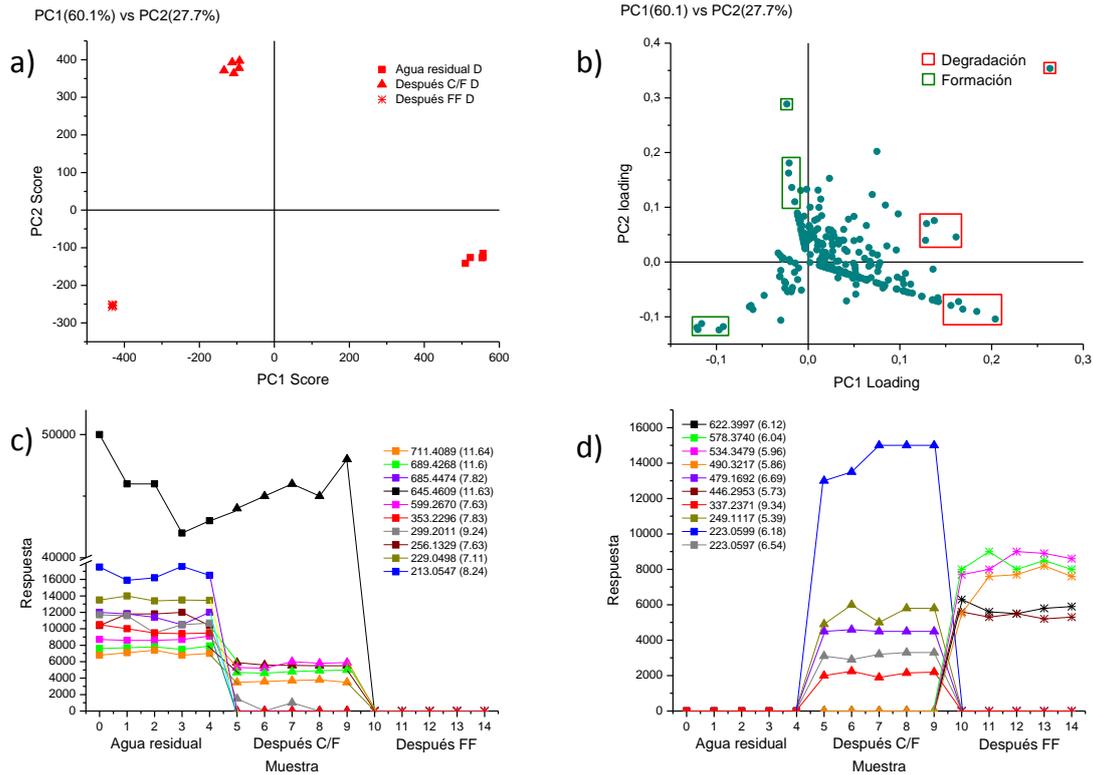


Figura III.59. Resultados de PCA para las fracciones D (alta polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Las masas significativas encontradas durante el análisis de todas estas fracciones se pueden encontrar en la tabla III.13. La significancia estadística de los resultados se midió mediante el p-valor, calculado en el análisis PCA de cada variable. Estadísticamente, si el valor de p se encuentra por debajo de un nivel de significancia específico (generalmente 0.01-0.05), la diferencia es estadísticamente significativa. En este caso concreto, para evitar errores, se tomó el valor estadísticamente más conservador de p, 0.01. Cuanto menor sea el valor de p, más significativo será el resultado.

Tabla III.13. Masas significativas encontradas mediante el análisis PCA.

[M] ⁺ (m/z)	Tiempo de retención (min)	Tratamiento			Composición elemental [£] [M] ⁺	Masa monoisotópica [£]	PPM [£]	DBE [£]
		ARC	Después C/F	Después foto-Fenton				
213.0547	8.24	•	v		C5H13N2O5S	213.055	0.856	0.5
					C13H9O3	213.055	2.202	9.5
223.0597	6.54		Λ	v	C11H11O5	223.061	4.252	6.5
223.0599	6.18		Λ	v	C11H11O6	224.061	3.355	6.5
229.0498	7.11	•	v		C13H9O4	229.050	1.239	9.5
					C5H13N2O6S	229.049	1.606	0.5
249.1117	5.39		Λ	v	C14H17O4	249.113	3.950	6.5
256.1329	7.63	•	↓	v	C16H18NO2	256.134	3.333	8.5
288.2531	9.77		Λ	v	C16H34NO3	288.254	2.668	0.5
299.2011	9.24	•	v		C20H27O2	299.201	0.017	7.5
315.1956	10.6	•	↓	v	C20H27O3	315.196	1.332	7.5
317.2114	10.28	•	↓	v	C20H29O3	317.212	0.851	6.5
317.2119	10.76	•	↓	v	C20H29O3	317.212	0.726	6.5
319.2271	11.14	•	↓	v	C20H31O3	319.227	0.689	5.5
337.2371	9.34		Λ	v	C20H33O4	337.238	2.326	4.5
345.217	11.41	•	↓	v	C20H29N2O3	345.218	2.369	7.5
353.2296	7.83	•	v		C24H33S	353.230	1.973	8.5
359.2196	9.35		Λ	v	C15H33N2O7	353.229	2.332	0.5
416.2852	5.05			Λ	C25H40N2O5S	416.286	2.246	7
437.1933	9.63		Λ	↑	C30H29OS	437.194	1.399	16.5
					C21H29N2O8	437.192	2.079	8.5
440.358	11.13		Λ	•	C30H29OS	437.194	1.399	16.5
					C21H29N2O8	437.192	2.079	8.5
446.2942	5.74		Λ	↑	C23H44NO5S	446.294	0.404	2.5
					C29H38N2O2	446.293	1.953	12
453.1667	9.64			Λ	C18H31NO10S	453.167	0.369	4
					C24H25N2O7	453.166	1.156	13.5
453.2996	10.94	•	v		C21H45N2O6S	453.300	0.514	0.5
					C29H41O4	453.300	1.952	9.5
455.3152	11.2	•	v		C29H43O4	455.316	2.053	8.5
460.2687	9.63		Λ	↑	C26H38NO6	460.270	2.635	8.5
460.3111	5.28			Λ	C27H44N2O2S	460.312	2.715	7
					C24H46NO5S	460.310	3.108	2.5
477.2978	11.18	•	v		C26H41N2O6	477.296	2.803	7.5
					C23H45N2O6S	477.300	4.260	2.5
					C31H41O4	477.300	5.625	11.5

[M] ⁺ (m/z)	Tiempo de retención (min)	Tratamiento			Composición elemental [‡] [M] ⁺	Masa monoisotópica [‡]	PPM [‡]	DBE [‡]
		ARC	Después C/F	Después foto-Fenton				
479.1692	6.69	Λ	v		C19H31N2O10S	479.170	1.547	5.5
					C31H27O3S	479.168	2.315	18.5
					C27H27O8	479.171	2.907	14.5
484.3844	11.07	Λ	↑		C31H52N2S	484.385	1.488	7
					C28H54NO3S	484.382	4.045	2.5
490.3217	5.86		Λ		C28H46N2O3S	490.323	2.477	7
					C25H48NO6S	490.320	2.989	2.5
					C36H42O	490.324	3.806	16
504.337	5.41		Λ		C26H50NO6S	504.336	2.212	2.5
					C29H48N2O3S	504.339	3.102	7
					C32H44N2O3	504.335	3.582	12
					C37H44O	504.339	4.394	16
533.3363	10.7	•	•	↓	C30H47NO7	533.335	1.963	8
					C33H45N2O4	533.338	3.062	12.5
					C27H51NO7S	533.339	4.357	3
534.3467	5.95	•	↑	↑	C27H52NO7S	534.346	0.470	2.5
					C33H46N2O4	534.346	1.763	12
562.3794	5.97		Λ		C32H54N2O4S	562.380	1.830	7
					C29H56NO7S	562.378	2.936	2.5
					C40H50O2	562.381	2.989	16
565.039	8.21	Λ	v		C22H17N2O14S	565.040	1.857	15.5
					C19H19NO17S	565.037	2.886	11
567.0368	8.21	Λ	v		C21H15N2O17	567.037	0.480	15.5
					C15H21NO20S	567.038	1.698	6
578.3733	6.04	•	↑	↑	C29H56NO8S	578.373	1.100	2.5
					C35H50N2O5	578.372	2.295	12
					C32H54N2O5S	578.375	3.534	7
					C40H50O3	578.376	4.660	16
599.267	7.63	•	↓	v	C33H43O8S	599.268	1.442	12.5
					C36H39O8	599.264	4.183	17.5
622.3985	6.12	Λ	↑		C37H54N2O6	622.398	0.502	12
					C31H60NO9S	622.399	0.608	2.5
					C41H54N2O5S	622.396	4.522	16
645.4596	11.22	•	↓	v	C38H63NO7	645.460	1.322	8
					C42H63NO2S	645.458	2.554	12
					C35H65O10	645.458	2.830	3.5

[M] ⁺ (m/z)	Tiempo de retención (min)	Tratamiento			Composición elemental [‡] [M] ⁺	Masa monoisotópica [‡]	PPM [‡]	DBE [‡]
		ARC	Después C/F	Después foto-Fenton				
645.4607	11.54	•	•	v	C38H63NO7	645.460	0.382	8
					C41H61N2O4	645.463	3.770	12.5
					C42H63NO2S	645.458	4.259	12
645.4609	11.63	•	•	v	C38H63NO7	645.460	0.692	8
					C41H61N2O4	645.463	3.460	12.5
					C35H67NO7S	645.464	4.531	3
645.4632	11.4	•	↓	v	C41H61N2O4	645.463	0.103	12.5
					C35H67NO7S	645.464	0.968	3
					C38H63NO7	645.460	4.255	8
651.366	10.6		Λ	v	C37H51N2O8	651.365	2.239	13.5
					C34H55N2O8S	651.368	2.936	8.5
					C42H51O6	651.369	3.937	17.5
685.4474	7.82	•	v		C44H61O6	685.447	0.854	14.5
					C36H65N2O8S	685.446	1.805	5.5
					C47H59NO3	685.449	3.056	19
689.4251	11.43	•	↓	v	C43H61O5S	689.424	1.638	13.5
					C39H61O10	689.426	1.992	9.5
					C46H59NO2S	689.427	2.250	18
689.4268	11.6	•	↓	v	C46H59NO2S	689.427	0.216	18
					C39H61O10	689.426	0.474	9.5
					C42H59NO7	689.429	3.413	14
711.4089	11.64	•	↓	v	C45H59O5S	711.408	0.814	16.5
					C41H59O10	711.411	2.703	12.5
1311.838	11.13	•	↓	v	No se ha encontrado la fórmula			

Nota: (Λ) = masas consideradas sub-productos, (v) = masas que desaparecieron, (•) = masas detectadas en el agua residual (no sub-productos), (blanco) = no detectado, (↑) = masas que incrementaron su intensidad, (↓) = masas que disminuyeron su intensidad. Masas encontradas durante el tratamiento con un error de tolerancia en masa < 10 ppm. Los tiempos de retención iguales se consideraron compuestos iguales y tiempos de retención diferentes se consideraron como isómeros.

[‡]Las fórmulas y valores se generaron usando una calculadora de masa exacta incluida en el software utilizado (Analyst TF version 1.7 software, AB Sciex).

Los resultados del análisis de todas las fracciones mostraron 26 masas significativas en el ARC. Por otro lado, 16 masas aparecieron tras el pre-tratamiento de C/F y 6 (416, 453, 460, 490, 504 y 562) después del proceso de FF solar, considerándose productos de transformación generados durante el proceso.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de C/F produjo la bajada del pH, provocando posiblemente la re-disolución de algunos compuestos absorbidos en

flóculos o partículas. De las 16 masas seleccionadas después del proceso de C/F, 10 de ellas desaparecieron y otras 5 aumentaron de intensidad durante el proceso de FF solar, mientras que una de ellas (440) permaneció constante. Se observó la formación de sub-productos que pueden ser resistentes al tratamiento de FF, por lo menos en el tiempo de tratamiento utilizado, ya que no se alcanzó la mineralización completa del contenido orgánico original.

La posible composición elemental de las masas encontradas se calculó utilizando un buscador de fórmulas y una calculadora de fórmulas elementales contenidos en el software PeakView® utilizado. Sin embargo, debido a la gran cantidad de fórmulas elementales posibles, la elucidación de la estructura molecular no fue posible. El estudio exhaustivo de esta estructura molecular podría realizarse mediante el desarrollo de un análisis LC-MS/MS específico.

La presencia de isómeros también resulta común en aguas complejas y cuando se degradan compuestos orgánicos mediante PAOs. Algunas de las masas detectadas en la tabla 1 parecen tener isómeros que podrían detectarse en diferentes fracciones (223, 317, 453, 460, 645 y 689). Los cromatogramas de iones extraídos mostraron la separación de dichos isómeros (figuras III.60 – III.65).

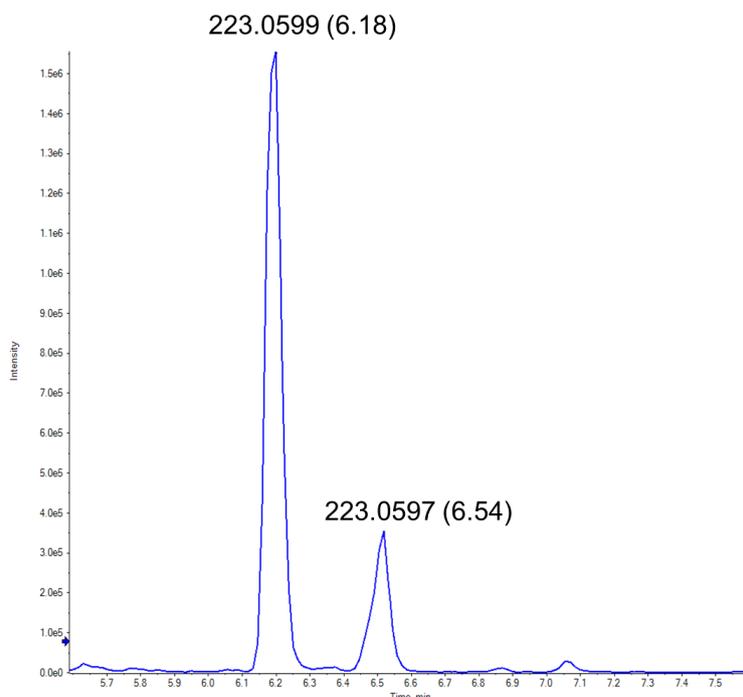


Figura III.60. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 223 después del tratamiento de C/F. Fracción D.

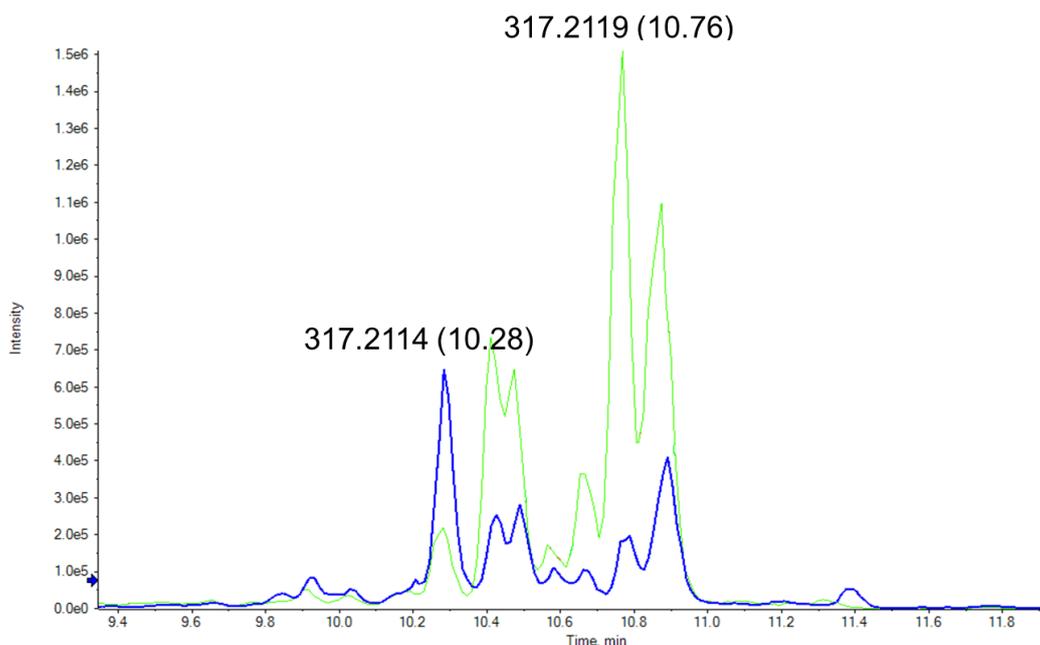


Figura III.61. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 317 en ARC. Fracción A (línea azul), Fracción B (línea verde).

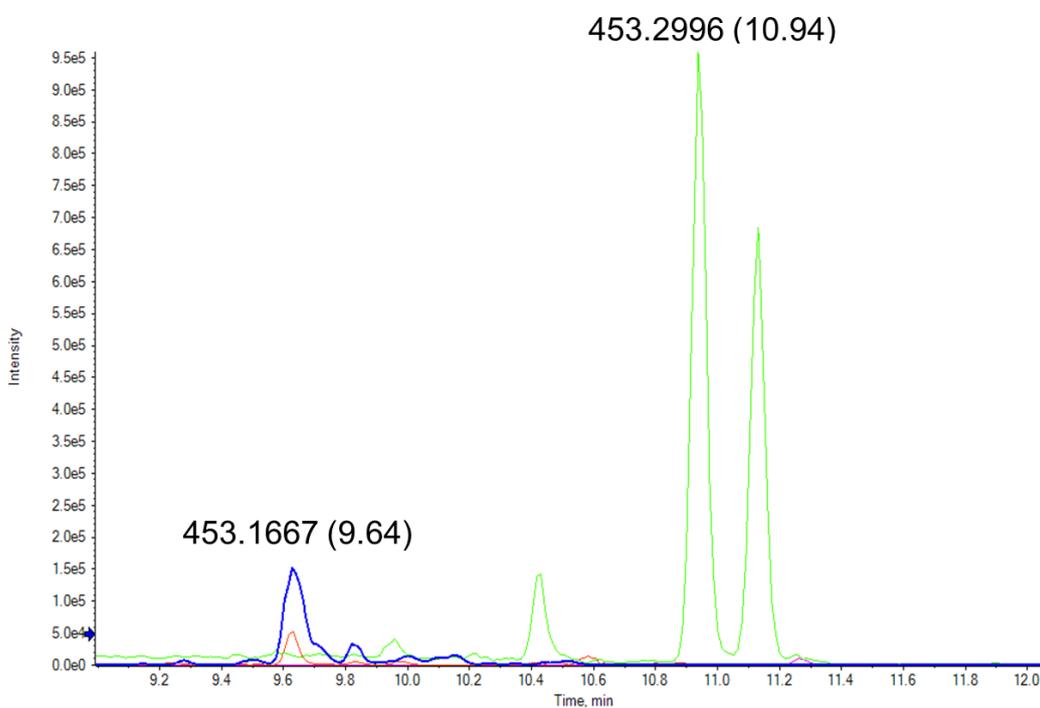


Figura III.62. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 453 en ARC (Fracción B, línea verde) y en aguas después del FF solar (Fracción C, línea azul).

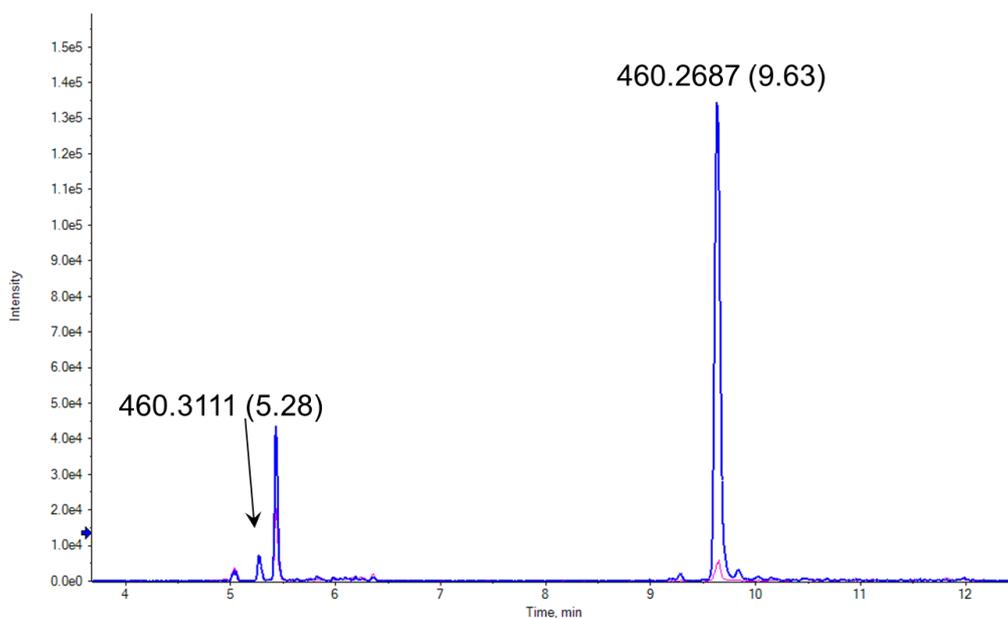


Figura III.63. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 460 después del proceso de FF solar. Fracción A.

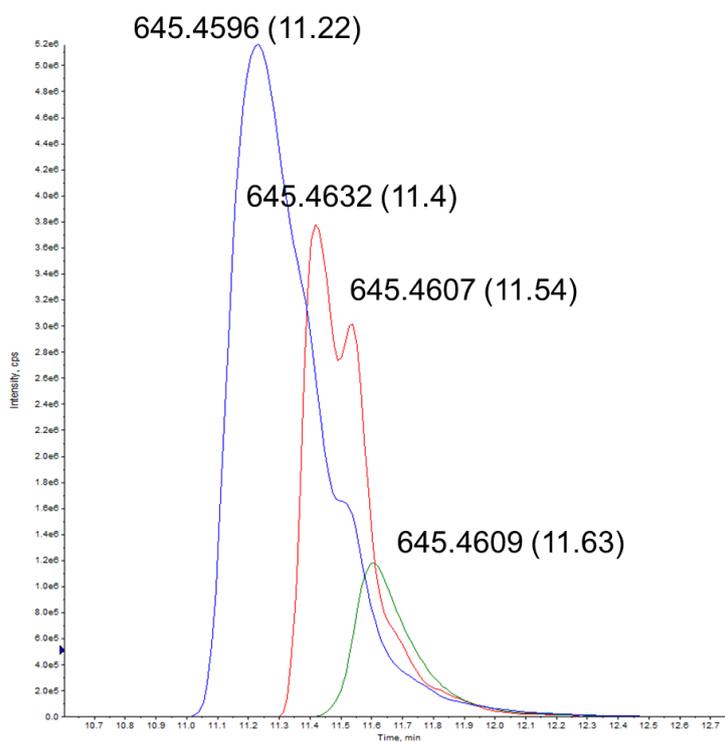


Figura III.64. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 645 en ARC (fracciones B, C y D).

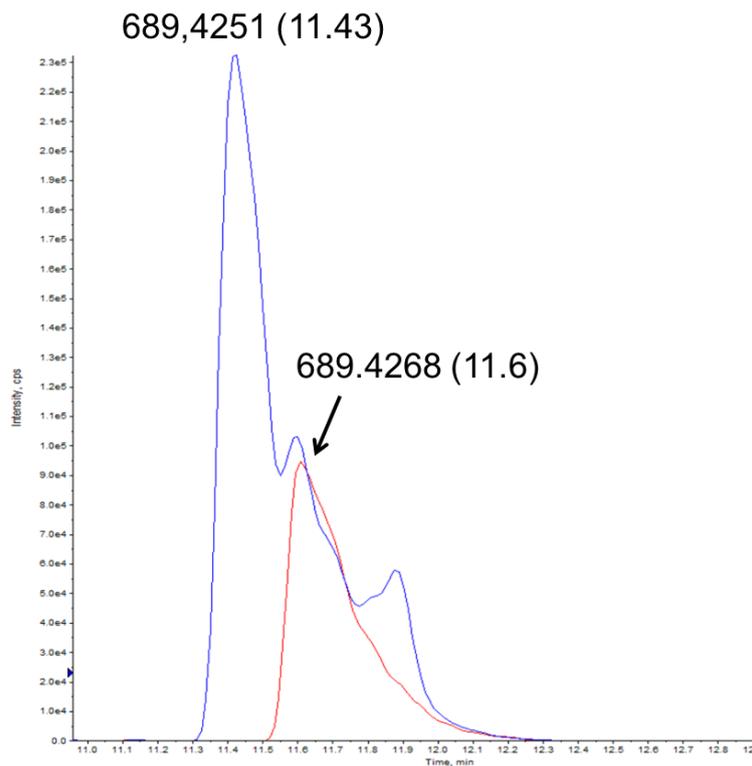


Figura III.64. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 689 en ARC (fracciones B y D).

La aplicación de este enfoque resultó una estrategia útil para la detección y clasificación de productos degradados y generados durante el tratamiento de ARC, dando una perspectiva de cómo la fracción orgánica se ve modificada a partir de la línea de tratamiento seleccionada. Además, este enfoque podría ser de utilidad para el diseño de tratamientos específicos para otros tipos de aguas complejas, permitiendo la comparativa entre diferentes tratamientos (tanto PAOs como procesos biológicos adaptados).

III.5. Conclusiones

En este capítulo de la tesis doctoral se ha demostrado la elevada utilidad cualitativa y cuantitativa de aplicar técnicas avanzadas analíticas y microbiológicas en la evaluación de nuevas tecnologías y la combinación de las mismas (tratamientos físico-químicos y biológicos) para el tratamiento de un agua residual compleja como el agua de cocido del corcho a modo de ejemplo.

En general se puede concluir que la aplicación de dichas metodologías avanzadas de análisis químico y microbiológico permite determinar qué posibilidades hay para conocer mejor los tratamientos de oxidación química y biológica empleados así como su efectividad.

En primer lugar se abordó la evaluación del proceso de adaptación a las ARC de un sistema de depuración biológico basado en fangos activos de EDAR urbana. La variación de microorganismos a lo largo del proceso mostró una disminución clara de SST y SSV, así como de la concentración total de ADN, bacterias generales (16S) y AOB. La técnica de recuento en placa indicó un cambio de población a las 31 horas de contacto, así como la aparición predominante de bacterias filamentosas que se mantuvieron hasta el final del experimento. Además, diversos microorganismos murieron durante el proceso, mientras que otros se mantuvieron en el sistema mostrando una posible adaptación. Esto vino acompañado de una reducción de COD. Sin embargo, el aumento del nitrógeno total y la concentración de iones específicos (como fosfato y potasio) sugirieron el mal funcionamiento del sistema biológico adaptado, ya que los iones detectados provienen del fluido intracelular procedente de la ruptura de las membranas celulares. Por otro lado, el desarrollo de toxicidad crónica (con un aumento del 23% al 73% durante el tiempo de contacto) unido a las conclusiones previas, pusieron de manifiesto la imposibilidad de aplicar un sistema biológico adaptado para el tratamiento y depuración de este tipo de aguas residuales, siendo necesario recurrir a la oxidación química completa del ARC precedido de un pre-tratamiento de coagulación/floculación.

Además, la utilización de técnicas microbiológicas avanzadas como secuenciación masiva (tras qPCR) ha demostrado su utilidad para evaluar el comportamiento de la microfauna durante las fases de adaptación y tratamiento, indicando la población

predominante y la variación filogenética del sistema a lo largo del tiempo de contacto, suministrando también información importante sobre el funcionamiento de un tratamiento biológico adaptado a aguas residuales industriales específicas de comportamiento poco previsible.

Para el caso particular bajo estudio en esta tesis doctoral, se ha concluido la imposibilidad de adaptación de un sistema biológico aerobio para la depuración del ARC, con lo que se define una línea de tratamiento comenzando por una fase de pre-tratamiento físico-químico. Después de ensayar diferentes coagulantes y floculantes comerciales los mejores resultados en cuanto a la eliminación de turbidez y COD se obtuvieron utilizando 0.5 g/L de FeCl₃. Este coagulante se utilizó para el posterior tratamiento mediante FF solar, mientras que el ECOTAN BIO (con el que también se obtuvieron valores similares de eliminación de COD) se usó en los estudios de ozonización.

En general, los diferentes ensayos de ozonización mostraron menos eficacia que el proceso de FF solar, en lo que respecta a la eliminación de DOC. Es importante destacar que los dos PAO estudiados no mejoraron la biodegradabilidad de las muestras, detectándose además, incrementos en los valores de toxicidad aguda a lo largo de los tratamientos de ozonización en comparación con los de FF solar.

El análisis mediante técnicas avanzadas microbiológicas de las ARC parcialmente oxidadas mediante FF solar, demostraron también en este caso, la imposibilidad de adaptar de forma exitosa un fango activo de EDAR urbana a este tipo de agua residual. Además, las pruebas de toxicidad basadas en técnicas respirométricas mostraron el desarrollo de una toxicidad crónica, indicando claramente la incompatibilidad de las aguas residuales bajo estudio con un tratamiento biológico.

Se concluye pues, que el tratamiento de ARC debe pasar por la aplicación de tecnologías de oxidación química hasta alcanzar la completa mineralización de los contaminantes presentes en este tipo de agua residual. Por otro lado, las pruebas de toxicidad aguda y crónica basadas en diferentes microorganismos mostraron elevados valores de toxicidad en estadios muy avanzados y finales de la línea de tratamiento propuesta. Este hecho incrementa el interés en conocer cuáles podrían ser los contaminantes, productos de degradación o metabolitos (o el efecto sinérgico entre

ellos) que pudieran dar lugar a porcentajes de inhibición tan elevados aún cuando los valores de COD eran ya tan bajos (al final de la oxidación química).

Las técnicas analíticas avanzadas basadas en metabolómica (mediante la utilización de un sistema LC-QTOF) mostraron que la evaluación de compuestos orgánicos desconocidos durante la línea de tratamiento (agua residual, después de C/F y después del FF solar) puede ayudar a comprender mejor el comportamiento del proceso. La utilización de este enfoque resultó útil para analizar una gran cantidad de datos HRMS, permitiendo detectar la presencia de ciertos compuestos que sufrieron cambios significativos durante la línea de tratamiento. Tras la aplicación de un análisis PCA se obtuvo que un grupo de más de 2700 iones seleccionados pudieran simplificarse a 48 masas significativas que presentaron un comportamiento bien definido durante el proceso. Los resultados globales indicaron que el enfoque Omics tiene un gran potencial para la identificación de la relevancia de compuestos desconocidos durante el tratamiento de mezclas complejas desconocidas.

Los métodos analíticos y biológicos descritos en esta tesis doctoral podrían resultar de gran utilidad para el estudio de otros tratamientos de aguas residuales industriales complejas, dando una perspectiva amplia de cómo la fracción orgánica de la mezcla varía según el tratamiento aplicado.

III.6. Bibliografía

Acero, J. L., Benitez, F. J., Heredia, J. B. D., & Leal, A. I. (2004). Chemical treatment of cork-processing wastewaters for potential reuse. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 79(10), 1065-1072.

Al-Shahwani, S. M., & Horan, N. J. (1991). The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. *Water Research*, 25(6), 633-638.

Am Water Works Res, F., Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment: application and engineering*. CRC press.

Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.

Apha, A. (1995). WPCF, Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA

Apha, A. (1998). WPCF, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20.

Atkinson, R., Carter, W. P., Aschmann, S. M., Winer, A. M., & Pitts, J. N. (1984). Kinetics of the reaction of OH radicals with a series of branched alkanes at 297±2 K. *International journal of chemical kinetics*, 16(4), 469-481.

Balcıoğlu, I. A., Tarlan, E., Kivılcımdan, C., & Saçan, M. T. (2007). Merits of ozonation and catalytic ozonation pre-treatment in the algal treatment of pulp and paper mill effluents. *Journal of environmental management*, 85(4), 918-926.

Baumann, P., Baumann, L., Bang, S. S., & Woolkalis, M. J. (1980). Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckea*. *Current Microbiology*, 4(3), 127-132.

Beltrán de Heredia, J., Domínguez, J. R., & López, R. (2004). Treatment of Cork Process Wastewater by a Successive Chemical– Physical Method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4501-4507.

Benítez, F. J., Acero, J. L., & Leal, A. I. (2008). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination*, 229(1-3), 156-169.

Benitez, F. J., Acero, J. L., Garcia, J., & Leal, A. I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research*, 37(17), 4081-4090.

Benítez, F. J., Acero, J. L., Leal, A. I., & González, M. (2009). The use of ultrafiltration and nanofiltration membranes for the purification of cork processing wastewater. *Journal of hazardous materials*, 162(2-3), 1438-1445.

Benítez, F. J., Acero, J. L., Leal, A. I., & Real, F. J. (2008). Ozone and membrane filtration based strategies for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of hazardous materials*, 152(1), 373-380.

Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., & Minhalma, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: a biodegradation and valorisation study. *Water research*, 45(2), 904-912.

Bernards, M. A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 227-240. Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in chemistry*, 3, 62.

Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1988). Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in aqueous solution. *Journal of physical and chemical reference data*, 17(2), 513-886.

Cromley, J. T., & O'Connor, J. T. (1976). Effect of ozonation on the removal of iron from a ground water. *Journal (American Water Works Association)*, 315-319.

Curds, C. R. (1973). The role of protozoa in the activated-sludge process. *American Zoologist*, 13(1), 161-169.

Curds, C. R. (1982). The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annual Reviews in Microbiology*, 36(1), 27-28.

Curds, C. R., & Vandyke, J. M. (1966). The feeding habits and growth rates of some fresh-water ciliates found in activated-sludge plants. *Journal of Applied Ecology*, 127-137.

Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 66.

Daphtoxkit F. (1996). Crustacean toxicity screening test for freshwater.

De Torres-Socías, E., Cabrera-Reina, A., Trinidad, M. J., Yuste, F. J., Oller, I., & Malato, S. (2014). Dynamic modelling for cork boiling wastewater treatment at pilot plant scale. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(21), 12182-12189.

De Torres-Socías, E., Fernández-Calderero, I., Oller, I., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., & Malato, S. (2013). Cork boiling wastewater treatment at pilot plant scale: comparison of solar photo-Fenton and ozone (O₃, O₃/H₂O₂). Toxicity and biodegradability assessment. *Chemical engineering journal*, 234, 232-239.

Del Castillo, I., Hernández, P., Lafuente, A., Rodríguez-Llorente, I. D., Caviedes, M. A., & Pajuelo, E. (2012). Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro) phenol-degrading bacteria immobilised onto residual cork particles. *Water research*, 46(6), 1723-1734.

Dias, F. F., & Bhat, J. V. (1965). Microbial ecology of activated sludge II. Bacteriophages, bdellovibrio, coliforms, and other organisms. *Applied microbiology*, 13(2), 257-261.

Dias-Machado, M., Madeira, L. M., Nogales, B., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64(3), 455-461.

Eikelboom, D. H. (2000). Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA publishing.

Elnabarawy, M. T., Robideau, R. R., & Beach, S. A. (1988). Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox,[®] polytox,[®] and activated sludge respiration inhibition. *Environmental Toxicology*, 3(4), 361-370.

EPA Method 410.4: The Determination of Chemical Oxygen Demand by Semi-Automated Colorimetry. *Water CWA Methods*.

EPA, U. (1993). Method 180.1-Determination of turbidity by nephelometry (revision 2.0).

Fernandes, L., Lucas, M. S., Maldonado, M. I., Oller, I., & Sampaio, A. (2014). Treatment of pulp mill wastewater by *Cryptococcus podzolicus* and solar photo-Fenton: a case study. *Chemical Engineering Journal*, 245, 158-165.

García, M. T., Ribosa, I., Guindulain, T., Sanchez-Leal, J., & Vives-Rego, J. (2001). Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 111(1), 169-175.

Geraldes, V., Minhalma, M., De Pinho, M. N., Anil, A., Ozgunay, H., Bitlisli, B. O., & Sari, O. (2009). Nanofiltration of Cork Wastewaters and Their Possible Use in Leather Industry as Tanning Agents. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(3).

Gerhardt, A., Ud-Daula, A., & Schramm, K. W. (2015). *Tetrahymena* spp.(Protista, Ciliophora) as test species in rapid multilevel ecotoxicity tests. *Acta Protozoologica*, 49(4), 271-280.

Gomes, A. C., Silva, L., Simões, R., Canto, N., & Albuquerque, A. (2013). Toxicity reduction and biodegradability enhancement of cork processing wastewaters by ozonation. *Water Science and Technology*, 68(10), 2214-2219.

Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., ... & Saylor, G. S. (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental science & technology*, 37(2), 343-351.

Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology: metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481.

Isac, L., Rodríguez, E., Salas, M. D., Fernández, N., GBS, G. B. S., Pérez-Uz, B., & Serrano, S. PROTOZOOS EN EL FANGO ACTIVO.

ISO, W. (1998). Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri*.(Luminescent Bacteria Test). Iso 11348-1, 2 and, 3, 1-21.

Jenkins, D., Richard, M. G., & Daigger, G. T. (2003). Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. Crc Press.

Karlsson, T., & Persson, P. (2012). Complexes with aquatic organic matter suppress hydrolysis and precipitation of Fe (III). *Chemical Geology*, 322, 19-27.

Klimowicz, H. K. (1970). MICROFAUNA OF ACTIVATED SLUDGE: PART I. ASSEMBLAGE OF MICROFAUNA IN LABORATORY MODELS OF ACTIVATED SLUDGE.

Kokkali, V., Katramados, I., & Newman, J. D. (2011). Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii. *Biosensors*, 1(2), 36-45.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., ... & Thomsen, T. R. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS microbiology ecology*, 59(3), 671-682.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., ... & Nielsen, P. H. (2008). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the Bacteroidetes present in activated sludge plants. *Microbiology*, 154(3), 886-894.

Lan, B. Y., Nigmatullin, R., & Puma, G. L. (2008). Ozonation kinetics of cork-processing water in a bubble column reactor. *Water research*, 42(10-11), 2473-2482.

Lee, S., Basu, S., Tyler, C. W., & Wei, I. W. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Advances in Environmental Research*, 8(3-4), 371-378.

- Lee, S., Basu, S., Tyler, C. W., & Wei, I. W. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Advances in Environmental Research*, 8(3-4), 371-378.
- Legrini, O., Oliveros, E., & Braun, A. M. (1993). Photochemical processes for water treatment. *Chemical reviews*, 93(2), 671-698
- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*, 28(1), 67-75.
- Madoni, P., & Ghetti, P. F. (1981). The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage-treatment plants. *Hydrobiologia*, 83(2), 207-215. Madoni, P. (1986). Protozoa in waste treatment systems. *Perspectives in Microbial Ecology*, 86-90.
- Madoni, P., Davoli, D., & Chierici, E. (1993). Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Research*, 27(9), 1485-1491.
- Mantzavinos, D., & Psillakis, E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(5), 431-454.
- Mara, D., & Horan, N. J. (Eds.). (2003). *Handbook of water and wastewater microbiology*. Elsevier.
- Mendoça et al, Mendonça, E., Picado, A., Silva, L., y Anselmo, A. M. (2007). Evaluación ecotoxicológica de las aguas residuales de ebullición del corcho. *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 66 (3), 384-390.
- Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A., & Anselmo, A. M. (2004). Fungal biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Engineering in life sciences*, 4(2), 144-149.
- Metcalf& Eddy. (2003). *Wastewaterengineering: treatment and reuse*. McGraw-Hill.

Minhalma, M., & De Pinho, M. N. (2001). Flocculation/flotation/ultrafiltration integrated process for the treatment of cork processing wastewaters. *Environmental science & technology*, 35(24), 4916-4921.

Muñoz, M., Alonso, J., Bartrolí, J., & Valiente, M. (1990). Automated spectrophotometric determination of titanium (IV) in water and brines by flow injection based on its reaction with hydrogen peroxide. *Analyst*, 115(3), 315-318.

Nascimento, C. A., Teixeira, A. C., Guardani, R., Quina, F. H., Chiavone-Filho, O., & Braun, A. M. (2007). Industrial wastewater treatment by photochemical processes based on solar energy. *Journal of Solar Energy Engineering*, 129(1), 45-52.

Nübel, U., Bateson, M. M., Madigan, M. T., Köhl, M., & Ward, D. M. (2001). Diversity and Distribution in Hypersaline Microbial Mats of Bacteria Related to *Chloroflexus* spp. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 4365-4371.

Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental pollution*, 144(2), 453-462.

Carballo, O., Arencibia, G., Concepción, J., & Isla, M. (2003). Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de Toxicología en Línea*, 33-69.

Oliveira, J., Nunes, M., Santos, P., Cantinho, P., & Minhalma, M. (2009). Cork processing wastewater treatment/valorisation by nanofiltration. *Desalination and Water Treatment*, 11(1-3), 224-228.

Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. (2011). Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. *Science of the total environment*, 409(20), 4141-4166.

Papaphilippou, P. C., Yiannapas, C., Politi, M., Daskalaki, V. M., Michael, C., Kalogerakis, N., ... & Fatta-Kassinos, D. (2013). Sequential coagulation–flocculation, solvent extraction and photo-Fenton oxidation for the valorization and treatment of olive mill effluent. *Chemical Engineering Journal*, 224, 82-88.

Parra, S., Sarria, V., Malato, S., Péringer, P., & Pulgarin, C. (2000). Photochemical versus coupled photochemical–biological flow system for the treatment of two

biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon. *Applied catalysis B: environmental*, 27(3), 153-168.

Pauli, W., & Berger, S. (2000). A new Toxkit microbiotest with the protozoan ciliate *Tetrahymena*. In *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring* (pp. 169-176). Springer, Boston, MA.

Peyton, G. R., & Glaze, W. H. (1988). Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. 3. Photolysis of aqueous ozone. *Environmental science & technology*, 22(7), 761-767.

Pintor, A., Vilar, V. J., & Boaventura, R. A. (2011). Decontamination of cork wastewaters by solar-photo-Fenton process using bleaching wastewater as H₂O₂ source.

Polo-López, M. I., Castro-Alfárez, M., Nahim-Granados, S., Malato, S., & Fernandez-Ibanez, P. (2017). *Legionella jordanis* inactivation in water by solar driven processes: EMA-qPCR versus culture-based analyses for new mechanistic insights. *Catalysis Today*, 287, 15-21.

Pouran, S. R., Aziz, A. A., & Daud, W. M. A. W. (2015). Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 53-69.

Pourrezaei, P., Drzewicz, P., Wang, Y., Gamal El-Din, M., Perez-Estrada, L. A., Martin, J. W., ... & Giesy, J. P. (2011). The impact of metallic coagulants on the removal of organic compounds from oil sands process-affected water. *Environmental science & technology*, 45(19), 8452-8459.

Prieto-Rodríguez, L., Oller, I., Agüera, A., & Malato, S. (2017). Elimination of organic micro-contaminants in municipal wastewater by a combined immobilized biomass reactor and solar photo-Fenton tertiary treatment. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 20(1).

Protoxkit, F. (1998). Freshwater toxicity test with a ciliate protozoan. *Standard Operational Procedure*. Creasel, Deinze, Belgium, 18.

Pulgarin, C., & Kiwi, J. (1996). Overview on photocatalytic and electrocatalytic pretreatment of industrial non-biodegradable pollutants and pesticides. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 50(3), 50-55.

Pulgarin, C., Invernizzi, M., Parra, S., Sarria, V., Polania, R., & Péringier, P. (1999). Strategy for the coupling of photochemical and biological flow reactors useful in mineralization of biorecalcitrant industrial pollutants. *Catalysis today*, 54(2-3), 341-352.

Química, P. (2004). Aguas residuales Kits fotométricos para la determinación de la DQO según norma ISO 15705: 2002. *TECNICAS DE LABORATORIO-BARCELONA-*, 448-449. O'Dell, J. W. (1993).

Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.

Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., & Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *Journal of Hazardous Materials*, 239, 1-18.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., ... & Tiong, C. L. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2541-2547.

Salvado, H., Gracia, M. P., & Amigó, J. M. (1995). Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. *Water Research*, 29(4), 1041-1050.

Sarria, V., Péringier, P., Cáceres, J., Blanco, J., Malato, S., & Pulgarin, C. (2004). Solar degradation of 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone by TiO₂ and iron (III) catalyst with H₂O₂ and O₂ as electron acceptors. *Energy*, 29(5-6), 853-860.

Seviour, R. J., Kragelund, C., Kong, Y., Eales, K., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2008). Ecophysiology of the Actinobacteria in activated sludge systems. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 21-33.

Sorgeloos, P. (1987). *Artemia* research and its applications. Morphology, genetics. Strain characterization, toxicology.

Standard operational procedure. MicroBioTest Inc. Belgium OECD 202 (2004). Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilization test. Organization for Economic Cooperation and Development.

Teixeira, A. R. S., Santos, J. L. C., & Crespo, J. G. (2009). Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 35-44.

Teixeira, A. R. S., Santos, J. L. C., & Crespo, J. G. (2009). Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 35-44.

Van Aken, P., Van den Broeck, R., Degève, J., & Dewil, R. (2015). The effect of ozonation on the toxicity and biodegradability of 2, 4-dichlorophenol-containing wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 280, 728-736.

Vilar, V. J., Maldonado, M. I., Oller, I., Malato, S., & Boaventura, R. A. (2009). Solar treatment of cork boiling and bleaching wastewaters in a pilot plant. *Water research*, 43(16), 4050-4062.

Wang, Y., Gao, B., Yue, Q., & Wang, Y. (2011). Effect of viscosity, basicity and organic content of composite flocculant on the decolorization performance and mechanism for reactive dyeing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1626-1633.

Water quality – Determination of iron –Spectrometric method using 1,10-phenantroline (ISO 1998b).

Yoshikawa, H., Dogruman-Ai, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., & Sultan, N. (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitology research*, 109(4), 1045-1050.

CONCLUSIONS SUMMARY

The development of advanced analytical and microbiological techniques is of vital importance to assess the environmental impact that industrial wastewater can cause on terrestrial ecosystems. And also for the evaluation of any innovative treatment that aims to solve precisely the problem of specific wastewaters.

This PhD thesis is divided into three chapters. The first contains a general view of the environmental problems derived from industrial wastewater treatments, as well as the problems associated to complex industrial wastewater purification in conventional existing treatment plants.

In the second chapter, strategies for the determination of “target” and “non-target” compounds have been defined. The strategy for solving “target” compounds consists of the determination and quantification of a series of selected pesticides in activated sludge. The use of QuEChERS extraction method has been a fast, simple and robust alternative for the pesticides extraction in the solid fraction. For the development of the method, a cleaning step using different sorbents (C18+PSA, Zsep and Zsep+) has been optimized. The C18+PSA mixture has been chosen as the best option for the reduction of matrix interferences during LC-MS/MS analysis. The selected method provided a low (<20%) or medium (<50%) matrix effect, with recoveries in the range of 76-118 % in most cases. However, the pesticide imazalil didn't present reproducible results, probably as consequence of the complex composition of the sludge selected from the agro-food industry.

In addition, the method has been successfully applied to the determination of compounds in the sludge coming from an agro-food industry and from an urban wastewater treatment plant. The results showed the accumulation of high concentrations of mainly pesticides in the industrial sludge, especially thiabendazole and pyrimethanil.

It can be concluded that the food processing industry, where large volumes of water are consumed, constitutes a serious source of timely contamination of pesticides, whose evaluation and monitoring is still scarce.

On the other hand and due to the high complexity and unknown nature of industrial wastewaters, specifically cork boiling wastewater (target wastewater in this study); the identification of relevant and unknown compounds is extremely difficult. A good option is the fractionation of samples. For that, a strategy based on SPE and SSPE extraction

has revealed satisfactory results, showing different valuable chromatograms for each fraction. The qualitative evaluation of samples turns out to be a useful tool for the evaluation of the total number of relevant chromatographic peaks in samples as well as their reduction along a proposed complete treatment line.

Finally, the use of an approach based on the use of metabolomic techniques can be considered very useful for the identification of relevant unknown compounds in a series of specific samples, allowing analyzing and reducing the large amount of information within the HRMS data sets. This has also allowed finding atypical substances in the wastewater under study. The XICs of the selected markers have confirmed the high precision of the developed method.

The approach developed in this work for the localization and identification of different masses that can be found in aqueous samples of great diversity and complexity, opens a wide field of research and development in the complete characterization of samples along the treatment line of industrial and / or complex wastewaters.

In the third chapter of this PhD thesis, it has been demonstrated the great utility of advanced analytical and microbiological techniques for the evaluation of innovative technologies and their combination (physic-chemical and biological treatments) for complex wastewaters treatment. Cork boiling wastewater (CBW) has been selected as an example in this work.

First, the assessment of the possible adaptation of activated sludge from an urban WWTP to raw CBW has been addressed with the aim of facing the treatment of this wastewater with an aerobic biological process. A clear decrease in TSS and VSS, as well as in the total concentration of DNA, general bacteria (16S) and AOB has been measured along the adaptation process. On the other hand, plate count technique indicated a change of the global population after 31 hours of contact time, as well as the predominance of filamentous bacteria until the end of the experiment. In addition, several microorganisms died during the process, while other remained in the system showing a possible adaptation accompanied by a reduction in DOC values. However, the increase of total nitrogen and several specific ions such as phosphate and potassium in solution, suggested the malfunction of the adapted biological system as those ions came from the rupture of cell membranes. The use of advanced microbiological

techniques such as massive sequencing (after qPCR) has been demonstrated to be also a useful technique for the identification of the specific microfauna generated along the adaptation process. The appearance of chronic toxicity (with an increase of 23 to 73% during the contact time) jointly with the effect on other parameters described above, showed the impossibility of successfully adapt an aerobic biological system for the treatment of this type of wastewater.

For the particular case under study in this PhD thesis, a strategy based on the combination of a physic-chemical pre-treatment (coagulation/flocculation) by using 0.5 g/L of FeCl₃ followed by a solar photo-Fenton process was selected in order to find a definitive remediation for this specific type of wastewater. The slight improvement in biodegradability values observed along the chemical oxidation process made interesting checking the possibility of adapting an aerobic biological system for finishing the treatment of the partially treated CBW.

The application of advanced microbiological techniques demonstrated, again, the incompatibility of this partially treated wastewater with an adapted biological treatment, showing also the development of chronic toxicity along the contact time.

It can be concluded that CBW remediation requires the application of chemical oxidation technologies for its complete mineralization.

The remarkable high toxicity measured in samples even at the end of the solar photo-Fenton process when very low organic charge remained, made highly interesting the identification of those unknown compounds still present in the treated effluent (probably at very low concentrations).

Advanced analytical techniques based on metabolomics (using an LC-QTOF system) showed that the evaluation of “non-target” compounds during the proposed treatment line gave valuable information that could be highly helpful to understand the development of the proposed treatment line. This approach was useful to analyze a large amount of HRMS data, allowing to detect the presence of certain compounds that cause significant changes during the global process. After the application of a PCA analysis it was obtained a reduction from 2700 to 48 significant masses that presented a well-defined behavior during the processes. The overall results indicated that the Omics

approach has great potential for the identification of non-target compounds in complex mixtures.

The analytical and micro-biological methods described in this PhD thesis have been demonstrated to be highly useful not only for the complete assessment of combined technologies for complex industrial wastewater treatment, but also for tackling the design of specific and innovative treatments (based on chemical or biological processes) to face the depuration and reuse of similar types of complex wastewaters.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARC	Agua residual de cocido de corcho
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
C/F	Coagulación-Floculación
CI	Cromatografía Iónica (Ionic Chromatography)
CIPT	Código Internacional de Prácticas Taponeras
CIT	Carbono inorgánico total
COD	Carbono Orgánico Disuelto
Ct	Umbral de Ciclo (Cycle treshold)
CT	Carbono total
CXP	Potencial de salida de la celda de colisión (Collision Cell Exit Potential)
DMA	Directiva Marco del Agua
DP	Potencial de exclusion (Declustering Potential)
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DQOb	Fracción biodegradable de la DQO
EC	Energía de colisión (Collision Energy)
EDAR	Estación Depuradora de Aguas residuales
EM	Efecto matriz
EP	Potencial de entrada (Entrance Potential)
ESI	Ionización en Electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
FF	Foto-Fenton

GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HILIC	Cromatografía de interacciones hidrofílicas (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (High Resolution Mass Spectrometry)
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LLE	Extracción líquido-líquido
LOQ	Límites de cuantificación (Quantification Limit)
NCA	Normas de Calidad Ambiental
NF	Nanofiltración
NGS	Next Generation Sequencing
NT	Nitrógeno Total
NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez (Nephelometric Turbidity Units)
ODS	Objetivos para el desarrollo sostenible
OUR	Tasa de respiración (Oxygen Uptake Rate)
PAO	Procesos avanzados de oxidación
PCA	Análisis de Componente Principal (Principal Component Analysis)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PLS	Proyección sobre estructuras latentes
PSA	Plataforma Solar de Almería
qPCR	PCR en tiempo real (quantitative Polymerase Chain Reaction)
QqQ	Triple cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
Q-TOF	Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (<u>Quadrupole Time of Flight</u>)
Q-TRAP	Triple Cuadrupolo/Trampa de Iones lineal
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction)

SRM	Selected Reaction Monitoring
SSPE	Extracción en fase sólida secuencial (Sequential Solid Phase Extraction)
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
ST	Sólidos totales
TGYE	Tryptone Glucose Yeast Extract
TIRF	Fluorescencia de reflexión interna total
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias (CFU, Colony Formation Units)
V	Voltio
XIC	Cromatograma de iones extraídos (Extracted Ion Chromatogram)

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura I.1. Consumo de agua dulce y producción de aguas residuales a escala mundial.

Figura I.2. Clasificación general de los procesos avanzados de oxidación.

Figura I.3. Producción de corcho en el mundo.

Figura I.4. Planchas de corcho a) antes y b) después de la cocción.

CAPÍTULO II

Figura II.1. Estrategia general de análisis de contaminantes para muestras acuosas y sólidas.

Figura II.2. Método QuEChERS original y dos modificaciones (2007.01 y EN 15662:2008).

Figura II.3. Ionización en electrospray.

Figura II.4. Representación de la cantidad de información y multi-dimensionalidad de los datos proveniente de muestras de varios experimentos analizadas con HRMS.

Figura II.5. Esquema de la reducción dimensional de la información obtenida a través del análisis de componente principal.

Figura II.6. Sistema de extracción manual utilizado para todas las extracciones SPE y SSPE.

Figura II.7. Cartuchos utilizados para la extracción SPE y SSPE de las aguas residuales de la industria corchera: a) C18, b) LiChrolut EN.

Figura II.8. Esquema de extracción SPE y SSPE utilizado para aguas residuales procedentes de la industria corchera.

Figura II.9. Interacción de los adsorbentes C18 y Zsep con lípidos.

Figura II.10. Esquema del procedimiento de extracción QuEChERS aplicado a fangos de depuradora procedente de la industria agroalimentaria.

Figura II.11. Esquema de modos de adquisición permitidos en un instrumento QqQ.

Figura II.12. Sistema 5500 Q-TRAP[®] LC-MS-MS utilizado.

Figura II.13. Gradiente cromatográfico utilizado en el análisis LC-MS-MS.

Figura II.14. Sistema LC-ESI-QTOF-MS utilizado en este trabajo.

Figura II.15. Gradiente cromatográfico utilizado en el análisis LC-ESI-QTOF-MS.

Figura II.16. Recuperaciones obtenidas en la extracción de fangos de depuradora fortificados y extraídos mediante el método QuEChERS con los tres adsorbentes seleccionados (C18+PSA, Zsep y ZSep+).

Figura II.17. Efecto matriz obtenido en la extracción de fangos de depuradora fortificados y extraídos mediante el método QuEChERS con los tres adsorbentes seleccionados (C18+PSA, Zsep y ZSep+).

Figura II.18. Cromatograma de fango procedente de la industria agroalimentaria fortificado con todos los plaguicidas.

Figura II.19. Cromatograma obtenido tras la extracción de las diferentes fracciones del ARC seleccionada.

Figura II.20. Número de picos cromatográficos detectados para ARC extraída de forma fraccionada. La polaridad de los compuestos extraídos en cada fracción está ordenada de menor a mayor (A, B, C, y D).

Figura II.21. Gráfica de clasificación de muestras generada por el PCA de las diferentes fracciones del agua residual de cocido de corcho.

Figura II.22. Gráfico de influencia de variables obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones del ARC.

Figura II.23. Masas características y tiempo de retención de fracciones A, B, C, y D del ARC.

Figura II.24. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 645 en ARC.

CAPÍTULO III

Figura III.1. Interacciones tróficas entre los diferentes microorganismos que componen un sistema de fango estabilizado.

Figura III.2: Turbidímetro Hach modelo 2100N.

Figura III.3. Mecanismo de actuación de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Figura III.4. Coloración de muestras en función de la concentración de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Figura III.5. Termorreactor TR 300 de Merk y espectrofotómetro marca NOVA 30 de Merk para la medida de la DQO.

Figura III.6. Analizador de carbono orgánico total Shimadzu TOC-VCSN con el sistema TNM-1 utilizado en este trabajo.

Figura III.7. Fotografía del cromatógrafo iónico módulo de Metrohm IC850 y Metrohm 858.

Figura III.8. Microscopio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a una cámara Nikon DS utilizado en este estudio.

Figura III.9. a) Kit comercial utilizado para la extracción de ADN (FastDNA™ SPIN Kit for Soil) b) FastPrep® utilizado para favorecer la extracción del ADN.

Figura III.10. Procedimiento completo de la extracción de ADN utilizada.

Figura III.11. Esquema del procedimiento qPCR.

Figura III.12. Analizador genético MiseQ Illumina.

Figura III.13. Fotografía del respirómetro MB-Advance instalado en el laboratorio.

Figura III.14. Imagen de luminiscencia de *Vibrio fischeri*.

Figura III.15. Termoblock, Luminómetro Biofix®Lumi-10, kit BioFix®Lumi “Multi-shot” (solución reconstituyente, viales de bacteria liofilizada y solución salina 2% de NaCl 20g/L).

Figura III.16. Imagen de la especie *Artemia Franciscana*.

Figura III.17. Kit Artoxkit M utilizado.

Figura III.18. Imagen de la especie *Daphnia magna*.

Figura III.19. Kit Daphtoxkit FTM magna utilizado.

Figura III.20. Imagen de la especie *Tetrahymena termophyla*.

Figura III.21. Kit Protoxkit F utilizado.

Figura III.22. Sistema Jar-test disponible en el laboratorio.

Figura III.23. Fotografía del sistema de coagulación/floculación/filtración disponible en la PSA.

Figura III.24. Diseño del reactor biológico a escala de laboratorio utilizado.

Figura III.25. Fotografía del captador CPC utilizado para reacciones de foto-Fenton solar.

Figura III.26. Fotografía de la planta piloto de ozonización utilizada.

Figura III.27. Agua residual de cocido de corcho utilizada.

Figura III.28. Microfauna predominante en el fango activo de EDAR urbana observada mediante el uso de microscopía óptica (40X, contraste de fases). a) *Rotífero*, b) *Opercularia*, c) *Gimnameba*, d) *Arcella*, e) *Pernamena*.

Figura III.29. Evolución de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana.

Figura III.30. Evolución de ciertos iones a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana.

Figura III.31. Especies observadas en el microscopio óptico (40x, contraste de fases); a) a) *Phodophyra*, b) *Arcella* y c) *Opercularia* tras 72 horas de contacto; d) *Nematodo* y e) *Oligoqueto* tras 290 y 314 horas de contacto.

Figura III.32. Bacterias heterotróficas totales detectadas a lo largo del tiempo de contacto entre ARC y fangos de EDAR urbana mediante recuento en placa.

Figura III.33. Colonias presentes en las muestras a las 31 horas de contacto: a) Morfología de las colonias obtenidas mediante la técnica de recuento en placa; b) Imagen en microscopio óptico en contraste de fases (40X); c) Imagen en microscopio óptico en contraste de fases (100X).

Figura III.34. Evolución de la concentración de ADN durante el tratamiento biológico.

Figura III.35. Evolución de bacterias totales 16S rDNA y AOB durante el experimento de adaptación del fango activo de una EDAR urbana al ARC.

Figura III.36. Variación filogenética global encontrada para las muestras estudiadas.

Figura III.37. Abundancia relativa en cuanto a filo, clase y orden de las muestras seleccionadas durante la adaptación de los fangos de EDAR urbana a las ARC.

Figura III.38. Eliminación de COD utilizando coagulantes comerciales a diferentes concentraciones: a) 0.25 g/L, b) 0.5 g/L, c) 0.75 g/L y d) 1 g/L.

Figura III.39. Agua residual de cocido de corcho antes y después del pre-tratamiento físico-químico con FeCl_3 .

Figura III.40. Evolución de DOC y H_2O_2 en función del consumo de O_3 durante los tres experimentos de ozonización (pH natural 5.6, pH 12 y pH 12 + H_2O_2).

Figura III.41. Evolución de COD, DQO y hierro total en función del consumo de H_2O_2 durante el proceso de foto-Fenton solar.

Figura III.42. Evolución de ácidos carboxílicos en función del consumo de H_2O_2 durante el proceso de foto-Fenton solar.

Figura III.43. Imagen del ensayo de *Daphnia Magna* (48 horas) con ARC.

Figura III.44. Microfauna predominante en el fango activo observada mediante el uso de microscopía óptica (40X, contraste de fases). a) *Acinertia*, b) *Thuricola*, c) *Rotífero*, d) *Arcella*.

Figura III.45. Evaluación de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto del experimento B1 (utilizando fango activo y agua residual de cocido de corcho procedente del experimento FF-1).

Figura III.46. Evaluación de COD, NT, SST y SSV a lo largo del tiempo de contacto del experimento B2 (utilizando fango activo y agua residual de cocido de corcho procedente del experimento FF-2).

Figura III.47. Seguimiento de iones a lo largo del tiempo de contacto en experimentos B1 y B2.

Figura III.48. Evolución de la comunidad microbiana durante el proceso de adaptación en el experimento B1. Imágenes obtenidas en el microscopio óptico (40X, contraste de fases). a.1) *Thuricola* presente en el fango activo inicial a.2) *Thuricola* rota después de 144 horas de contacto; b.1) *Arcella* presente en el fango activo inicial; b.2) *Arcella* rota tras 216 horas de contacto; c.1) *Rotífero* presente en el fango activo inicial; c.2) *Rotífero* roto después de 169 horas de contacto.

Figura III.49. Bacterias heterotróficas totales detectadas a lo largo del tiempo de contacto mediante recuento en placa para los experimentos B1 y B2.

Figura III.50. Evolución de la concentración de ADN durante los experimentos B1 y B2 a escala de laboratorio.

Figura III.51. Evolución de bacterias totales 16S rDNA y AOB durante los experimentos B1 y B2 a escala de laboratorio.

Figura III.52. Número de picos cromatográficos relevantes detectados durante el tratamiento para las muestras extraídas de forma fraccionada (fracciones A, B, C, y D).

Figura III.53. Cromatograma de iones totales (TIC) para fracciones D a lo largo de la línea de tratamiento seleccionada.

Figura III.54. Gráfico de clasificación obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones de la línea de tratamiento para el agua residual de cocido de corcho.

Figura III.55. Gráfico de influencia obtenido para el análisis PCA de las diferentes fracciones de la línea de tratamiento para el agua residual de cocido de corcho.

Figura III.56. Resultados de PCA para las fracciones A (baja polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Figura III.57. Resultados de PCA para las fracciones B (baja-media polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Figura III.58. Resultados de PCA para las fracciones C (media-polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Figura III.59. Resultados de PCA para las fracciones D (alta polaridad) en las muestras seleccionadas; a) gráfico de clasificación, b) gráfico de influencia, c) masas que se eliminan durante el tratamiento, d) masas formadas durante el tratamiento.

Figura III.60. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 223 después del tratamiento de C/F. Fracción D.

Figura III.61. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 317 en ARC. Fracción A (línea azul), Fracción B (línea verde).

Figura III.62. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 453 en ARC (Fracción B, línea verde) y en aguas después del foto-Fenton (Fracción C, línea azul).

Figura III.63. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 460 después del proceso de FF solar. Fracción A.

Figura III.64. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 645 en ARC (fracciones B, C y D).

Figura III.65. Cromatograma de iones extraído (XIC) para las masas 689 en ARC (fracciones B y D).

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla I.1. Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas de la Unión Europea (2013/39/UE, Anexo I).

Tabla I.2. Potenciales de oxidación de algunos agentes oxidantes.

CAPÍTULO II

Tabla II.1. Estructura química y propiedades de los plaguicidas modelo seleccionados.

Tabla II.2. Parámetros para las condiciones óptimas de análisis Q-TRAP/MS para los compuestos estudiados.

Tabla II.3. Validación del método QuEChERS: Rango lineal, LOQ, recuperaciones a dos niveles de concentración y precisión.

Tabla II.4. Validación del método SPE: Rango lineal, LOQ, recuperaciones a dos niveles de concentración y precisión.

Tabla II.5. Concentración de plaguicidas en fangos de depuradora procedentes de una industria agroalimentaria (fase sólida y fase líquida).

Tabla II.6. Concentración de plaguicidas en fangos de depuradora urbana convencional (fase sólida y fase líquida).

CAPÍTULO III

Tabla III.1. Fase móvil y condiciones de operación (caudales y columnas utilizadas para la medida de aniones, cationes, aminas y ácidos carboxílicos).

Tabla III.2. Secuencia 5'-3' de los primers y sondas utilizadas para la amplificación de ADNr 16S bacteriano y gen AOB 16S ARNr (Harms y cols., 2003).

Tabla III.3. Mezcla de componentes y programa de qPCR para amplificación de ADNr 16S bacteriano y gen AOB 16S ARNr (Harms y cols., 2003).

Tabla III.4. Características físico-químicas de los coagulantes y floculantes comerciales seleccionados.

Tabla III.5. Caracterización de las aguas residuales industriales de cocido de corcho.

Tabla III.6. Caracterización del fango activo utilizado.

Tabla III.7. Toxicidad crónica (% de inhibición) obtenidos durante el tratamiento biológico descrito en la sección III.4.2.

Tabla III.8. Comparación de diferentes PAO (tras C/F): foto-Fenton, ozonización a pH 5.6, ozonización a pH 12 y ozonización a pH 12 + H₂O₂.

Tabla III.9. Bioensayos de toxicidad aguda y crónica para aguas de cocido de corcho a lo largo del tratamiento propuesto.

Tabla III.10. Caracterización de agua residual de cocido de corcho después de las diferentes etapas de la ruta de tratamiento.

Tabla III.11. Caracterización del fango activo utilizado.

Tabla III.12. Evolución del porcentaje de inhibición de los experimentos B1 y B2 durante el tiempo de contacto.

Tabla III.13. Masas significativas encontradas mediante el análisis PCA.

