

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Ingeniería Química



Tesis Doctoral

ELIMINACIÓN DE PLAGUICIDAS NO
BIODEGRADABLES EN AGUAS MEDIANTE
ACOPLAMIENTO DE FOTOCATÁLISIS SOLAR Y
OXIDACIÓN BIOLÓGICA

María de la Menta Ballesteros Martín

Almería, 2008

EMILIO MOLINA GRIMA, CATEDRÁTICO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada "Eliminación de plaguicidas no biodegradables en aguas mediante acoplamiento de fotocátalisis solar y oxidación biológica" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería, bajo la dirección de los doctores D. José Antonio Sánchez Pérez y D. Sixto Malato Rodríguez, por la Licenciada D. M^a de la Menta Ballesteros Martín para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Almería.

Fdo.: Emilio Molina Grima

Los Directores

Fdo.: José Antonio Sánchez Pérez

Fdo.: Sixto Malato Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las horas que un investigador dedica para completar un trabajo que culmine en la elaboración de una Tesis Doctoral. Pero por suerte, a mi me ha tocado compartir esta tarea con un equipo profesional que se ha volcado en ayudarme, con un montón de compañeros que se convirtieron en verdaderos amigos y una familia a la que se lo debo todo. A todos ellos quiero agradecerles hoy el fruto de mi trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia haberme dado la oportunidad de participar en los proyectos “Eliminación de contaminantes persistentes en efluentes acuosos mediante métodos integrados de oxidación avanzada (fotocatálisis solar) y oxidación biológica (PPQ2003-07596-C03-02)” y “Desarrollo de sistemas acoplados de oxidación (fotocatálisis solar y oxidación biológica) para la depuración de efluentes acuosos contaminados con plaguicidas no biodegradables (CTQ2006-14743-C03-03/PPQ)” y la concesión de una Beca de Formación de Profesorado Universitario.

A D. Emilio Molina Grima, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, quiero agradecerle su lucha diaria por el departamento y por seguir “al pie del cañón”.

A D. José Antonio Sánchez Pérez y a D. Sixto Malato Rodríguez me gustaría agradecerles ese empujón del principio, la confianza que depositaron en mí, el apoyo en estos años de trabajo y su ilusión en que siga investigando.

A Cynthia, Juanfra y Celeste, quiero agradecerles el haber estado a mi lado en los momentos más difíciles. Sois el verdadero ejemplo de buenos compañeros y amigos. De todo corazón, gracias.

A Inda quiero darle las gracias por ser un modelo a seguir, compañero de mis primeros pasos en la ciencia y amigo de los de quitarse el sombrero.

A Belén me gustaría darle las gracias por estar siempre pendiente de mí y por esas magníficas correcciones. Estrella, a ti te quiero agradecer todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Elisa le agradezco todos sus consejos para que no me conforme con nada y los buenos ratos de conversación en esas largas tardes en el laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento también para M^a Carmen, por ser tan curranta y estar siempre dispuesta a ayudarme, Maripili por darme siempre la mejor de sus sonrisas, Lourdes por toda la confianza que siempre puso en mi, Ester por sus sabios consejos y María del Mar por ser siempre tan sincera.

Quiero dar las gracias a mis nuevos compañeros del Ciesol. A Eli me gustaría agradecerle toda su ayuda y paciencia en este año de no parar y a Alex y Estefanía quiero agradecerles todo su esfuerzo y dedicación. Espero que estemos juntos en este barco muchos años.

Quiero agradecer a Nuria el enseñarme a tomarme las cosas con más filosofía, a Asterio su eterna sonrisa y a Garrido esas maravillosas tertulias. A Noemí y Lara los buenos ratos en el laboratorio y a Inma, Juanjo, Loli, M^a José, Yurena, Lorena, Alicia, Alba, Natalia y Jana esos divertidos desayunos.

También me gustaría dar las gracias a todos los profesores del departamento que me han ayudado. A José Luis Casas por estar siempre que le necesito y siempre con una sonrisa. Muchas gracias José. A José Luis García Sánchez, por su tremenda paciencia en esas sesiones aprendiendo Matlab, y a Pepe y a Gabi por sus buenos consejos.

A mi familia FOTODETOX y FOTOBIOX, a Ana Amat, Antonio, Rafa, Ana García, Nacho, Wolfgang, Isa y Ana Zapata. De todos he aprendido mucho y espero poder seguir por mucho tiempo asistiendo a esas geniales y divertidas reuniones de grupo.

Gran parte de esta Tesis Doctoral se debe a la estupenda labor de nuestros técnicos de los que he aprendido muchísimo. Luis, que tiene una paciencia tremenda con todos, Juan, extraordinario compañero y siempre dispuesto a ayudar y Juan Antonio con su buen humor. No puedo olvidar a todo el personal de la Universidad que colabora con el departamento y Ciesol, a Miguel, Lidia, Inma y en especial a Esther y Belén por todas esas risas madrugadoras que nos hemos echado.

A Reme quiero agradecerle su amistad, por estar siempre que la necesito y por ser tan maravillosa y auténtica. Con Isidro me quedo sin palabras, gracias Isi, gracias. Gracias a Carmen por ser siempre tan simpática y correcta. A Rosi por estar siempre ahí. A mis amigos cenácol@s, en especial a mi Auro por todos los buenos momentos que hemos pasado y por esas jornadas maratónicas de química orgánica y a Valverde por ser siempre tan cariñoso conmigo. A Rocío, M^a Encarna y Lourdes por esos buenos ratos en la

carrera y a Peta, Francis, Jose, Jesús, Sergio, Juan, Mamen, Foñi, Silvia, Doña, David y a todos mis amigos alpujarreños.

A las mujeres de mi familia. A mi madre, porque luchaste por mí, me educaste en valores y estas siempre a mi lado. A mi abuela y mi tía, mis otras dos madres y a mi prima, mi hermana, Maripi. A Elisea por todo su apoyo, a mis tíos, a mis primos y a Jesús.

No hay espacio suficiente para agradecer a Paco todo su esfuerzo, paciencia, dedicación y amor incondicional. Hemos crecido y aprendido juntos y superado muchas barreras y espero que siga siendo así toda la vida. Sabes que esta Tesis y todo lo que soy es gracias a ti.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1. Presentación | 5 |
| 1.2. Problemática del agua. Escasez y contaminación | 6 |
| 1.3. Legislación | 8 |
| 1.4. Tecnologías emergentes para el tratamiento de residuos persistentes no biodegradables | 11 |
| 1.4.1. Incineración..... | 13 |
| 1.4.2. Desorción con aire | 14 |
| 1.4.3. Adsorción en carbón activo | 14 |
| 1.4.4. Oxidación húmeda | 15 |
| 1.4.5. Oxidación electroquímica | 15 |
| 1.4.6. Oxidación química..... | 16 |
| 1.4.6.1. Tratamientos químicos clásicos | 17 |
| 1.4.6.2. Procesos de oxidación avanzada (PPOA)..... | 19 |
| 1.5. Depuración de contaminantes biodegradables mediante tratamientos biológicos | 25 |
| 1.5.1. Depuración mediante cultivos monoespecíficos empleando <i>Pseudomonas putida</i> | 25 |
| 1.5.1.1. Cinética de la degradación biológica con <i>P. putida</i> | 27 |
| 1.5.2. Depuración mediante fangos activos | 33 |
| 1.5.2.1. Tratamiento aerobio..... | 36 |
| 1.5.2.2. Tratamiento anaeróbico..... | 37 |
| 1.5.2.3. Sistemas de crecimiento | 39 |
| 1.6. Acoplamiento de PPOA con degradación biológica para el tratamiento de aguas contaminadas | 42 |
| 1.6.1. Aspectos prácticos en la combinación POA-Biológico..... | 45 |
| 1.6.1.1. Eliminación del oxidante químico..... | 45 |
| 1.6.1.2. Ajuste del pH..... | 45 |
| 1.6.1.3. Efecto del tiempo de reacción | 45 |
| 1.6.1.4. Aclimatación del cultivo biológico | 46 |
| 1.6.2. Medida de la biodegradabilidad como estudio del efecto del pretratamiento químico | 47 |
| 1.6.2.1. Parámetros totales..... | 47 |
| 1.6.2.2. Medidas cinéticas..... | 51 |
| 1.6.3. Eficiencia del proceso integrado | 52 |
| 1.6.4. Aplicaciones..... | 53 |
| 2. OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL | 57 |
| 2.1. Objetivos | 57 |
| 2.2. Plan Experimental | 59 |

| | |
|---|------------|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 65 |
| 3.1. Preparación del stock de <i>Pseudomonas putida</i> | 65 |
| 3.2. Experimentos en matraz | 65 |
| 3.3. Descripción de los reactores empleados para los ensayos bacterianos. | 67 |
| 3.3.1. Reactor tanque agitado | 67 |
| 3.3.2. Columna de burbujeo | 70 |
| 3.4. Ensayos con fangos activos | 73 |
| 3.5. Determinación simultánea del $K_L a$ y del consumo de oxígeno..... | 75 |
| 3.6. Plantas piloto para foto-Fenton | 77 |
| 3.6.1. Planta piloto CADOX (Plataforma Solar de Almería)..... | 77 |
| 3.6.2. Planta piloto FOTOBIOX (Centro de Investigación en Energía Solar, Universidad de Almería) | 79 |
| 3.7. Medidas analíticas..... | 81 |
| 3.7.1. Medida del Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Nitrógeno Total (NT) | 81 |
| 3.7.2. Medida de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) | 83 |
| 3.7.3. Medida de la concentración del contaminante por HPLC..... | 84 |
| 3.7.4. Medida de la concentración de hierro | 86 |
| 3.7.5. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno | 88 |
| 3.7.6. Medida de la concentración de NH_4-N | 90 |
| 3.7.7. Medida de la concentración de NO_3-N | 91 |
| 3.7.8. Medida de la concentración de biomasa de <i>P. putida</i> | 92 |
| 3.7.9. Medida de los sólidos totales y volátiles en suspensión | 94 |
| 3.7.10. Medida de la radiación UV..... | 95 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 97 |
| 4.1. Biodegradación de intermedios modelo generados en los PPOA mediante <i>Pseudomonas putida</i> CECT 324..... | 97 |
| 4.1.1. Estudio de la concentración mínima de intermedios modelo inhibitoria del crecimiento bacteriano..... | 99 |
| 4.1.2. Efecto del pH en la degradación de los intermedios modelo mediante <i>P.</i> <i>putida</i> | 100 |
| 4.1.3. Efecto de la temperatura en la degradación de los intermedios modelo mediante <i>P. putida</i> | 111 |
| 4.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con plaguicidas para el acoplamiento con una oxidación biológica posterior | 115 |
| 4.2.1. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de plaguicidas individuales (alaclor y pirimetanil) con <i>P. putida</i> | 117 |
| 4.2.1.1. Alaclor | 118 |
| 4.2.1.2. Pirimetanil | 128 |
| 4.2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales mediante <i>P. putida</i> | 135 |

| | |
|---|------------|
| 4.3. Acoplamiento de tratamiento mediante foto-Fenton y oxidación biológica para la depuración de efluentes contaminados con plaguicidas. | 146 |
| 4.3.1. Estudios preliminares. Degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas comerciales Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid | 147 |
| 4.3.2. Efecto de la influencia de la concentración inicial de COD. Degradación de la mezcla de cinco plaguicidas comerciales: Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala | 151 |
| 4.3.2.1. Degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton..... | 152 |
| 4.3.2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton con <i>P. putida</i> | 155 |
| 4.3.2.3. Acoplamiento de foto-Fenton y oxidación empleando fangos activos | 163 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES..... | 185 |
| | |
| 6. NOMENCLATURA | 187 |
| | |
| 7. BIBIOGRAFÍA | 189 |

RESUMEN

RESUMEN

El agua de calidad para satisfacer las necesidades humanas es un recurso cada vez más escaso, lo que lleva a la necesidad de un adecuado uso y reciclaje. Es por ello, que las normativas legales imponen continuamente criterios más estrictos para lograr una mayor y mejor depuración de las aguas. Además, el desarrollo humano ha llevado a que cada vez sea más habitual la presencia de sustancias antropogénicas no biodegradables en aguas residuales no solo industriales, sino también urbanas.

La utilización de Procesos de Oxidación Avanzada (PPOA) es, actualmente, uno de los recursos tecnológicos más prometedores para el tratamiento de aguas contaminadas con sustancias no biodegradables. En esta Memoria se estudia la depuración de aguas que contienen plaguicidas de uso frecuente en la agricultura mediterránea. Asimismo, como PPOA se ha seleccionado el proceso foto-Fenton por ser es el más efectivo entre los que pueden utilizar radiación solar.

Sin embargo, la mineralización completa de estos contaminantes mediante PPOA conlleva un alto coste. En todo caso, su uso como etapa de pretratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las aguas contaminadas puede estar justificado si un proceso biológico posterior es capaz de degradar los intermedios resultantes. Esto es económicamente deseable ya que los procesos biológicos tienen un coste mucho menor que los PPOA. Por tanto, una alternativa para abaratar el proceso de depuración consistiría en una primera oxidación mediante PPOA y en una segunda etapa, los intermedios generados (más biodegradables que el contaminante original) se someterían al tratamiento biológico, para llevar a cabo una completa descontaminación del agua a tratar.

Asimismo, para reducir los costes y conseguir una elevada eficiencia del proceso global, es determinante minimizar el tiempo de tratamiento fotocatalítico. De hecho, si la eliminación del contaminante se lleva a cabo empleando tiempos largos de proceso foto-Fenton, el efluente puede contener productos altamente oxidados con poco valor metabólico para los microorganismos, resultando en una pérdida de eficiencia en el sistema. Por el contrario, si el contaminante se expone a tiempos cortos de oxidación química, puede dar lugar a la formación de intermedios poco oxidados (difícilmente biodegradables) e incluso tóxicos para los microorganismos. Por tanto, es de suma importancia emplear métodos que permitan seleccionar adecuadamente la intensidad del tratamiento mediante foto-Fenton con el fin de obtener un efluente biodegradable.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio del efecto que la intensidad de la oxidación química tiene sobre la biodegradabilidad del agua tratada, así como sobre la cinética de la posterior depuración biológica. Para ello, se ha seleccionado como microorganismo patrón de un tratamiento biológico la bacteria *Pseudomonas putida*.

En primer lugar, se estudió la biodegradación mediante *P. putida* CECT 324 de cuatro intermedios modelo (vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico) que usualmente se generan en los PPOA. Para ello, se determinó la concentración mínima de intermedios que inhibía del crecimiento bacteriano. Posteriormente, a la concentración de intermedios que genera un mayor crecimiento, se estudió el efecto del pH y de la temperatura en la cinética de biodegradación de los intermedios modelo en un biorreactor tanque agitado de 5 L. Con estos ensayos se determinó que *P. putida* es capaz de degradar los cuatro compuestos en un amplio margen de valores de pH y temperatura, en 28 h en las mejores condiciones (30°C y pH 7) y en 70 h en las peores (35°C). Asimismo, se determinó que el consumo de vanilina no interacciona con el de fenol y sin embargo, sí existe interacción entre el ácido oxálico y el fórmico en todos los ensayos (excepto a 30°C y pH 7). También se concluyó que el consumo de fenol y ácido oxálico causan inhibición en el crecimiento de *P. putida*.

A continuación, se procedió a la determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con unos 120 mg L⁻¹ de plaguicida (alaclor o pirimetanil) que permita realizar, posteriormente, una oxidación biológica. Para ello, se corroboró previamente que la bacteria no es capaz de biodegradar los plaguicidas, poniéndose de manifiesto la necesidad de un pretratamiento mediante foto-Fenton. Dicho tratamiento se llevó a cabo en la planta CADOX con captadores solares parabólicos compuestos (CPC) ubicada en la Plataforma Solar de Almería. Después de someter las disoluciones acuosas de los plaguicidas a intensidades crecientes de tratamiento fotocatalítico, su biodegradación se llevó a cabo mediante *P. putida* en matraces Erlenmeyer. Dependiendo del plaguicida ensayado, varió el tiempo mínimo de tratamiento obtenido, así como la eficiencia del proceso biológico.

Posteriormente, al tiempo de tratamiento mínimo seleccionado, y en las mejores condiciones de pH y de temperatura obtenidas previamente, se llevó a cabo la biodegradación del efluente, empleando *P. putida*, en una columna de burbujeo de 12 L en modo discontinuo. El crecimiento bacteriano se ajusta a un modelo cinético que puso de manifiesto las diferencias en el metabolismo bacteriano debido a la presencia de los intermedios provenientes del tratamiento de cada plaguicida.

Para validar los resultados obtenidos con un único plaguicida y garantizar su generalidad, se siguió la misma metodología con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales. Dicha mezcla contenía unos 50 mg L⁻¹ de cada plaguicida: Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid; cuyos principios activos son: dimetoato, metiloxidemeton, carbaril y metidation, respectivamente. De estos experimentos se puede deducir que *P. putida* es útil para determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante PPOA para el acoplamiento con una oxidación biológica posterior. Asimismo, al tratarse de una sola especie bacteriana, los resultados son reproducibles, frente a la dificultad inherente a la utilización de fangos activos para dicha determinación, por la complejidad de microorganismos que constituyen la biomasa. Del mismo modo, pueden plantearse cinéticas de biodegradación utilizando un único microorganismo, que no son tenidas en cuenta con métodos basados en fangos activos, por lo que éstos últimos ofrecen una información limitada.

Seguidamente, con la misma mezcla de plaguicidas, se comprobó que la intensidad de tratamiento seleccionada con *P. putida* era también la adecuada para fangos activos. La biodegradación de dicho efluente se llevó a cabo con fangos activos de una EDAR en reactores tanque agitado de 6 L operados en modo discontinuo secuencial (SBR), alcanzándose eficiencias de biodegradación del 100%.

Finalmente, se estudió el efecto de la concentración inicial de COD en la selección del tiempo mínimo de tratamiento foto-Fenton y en la eficiencia del proceso biológico en el acoplamiento con fangos activos. Para ello, se utilizó una segunda mezcla de cinco plaguicidas comerciales compuesta por Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala cuyos principios activos son oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil, con una concentración inicial de COD de 500 mg L⁻¹ y 200 mg L⁻¹. Para estos plaguicidas los ensayos de degradación mediante foto-Fenton se realizaron en la planta FOTOBIOX con CPC ubicada en el Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) de la Universidad de Almería.

La determinación de la eficiencia de biodegradación de los efluentes resultantes de la aplicación de intensidades crecientes de tratamiento fotocatalítico se llevó a cabo mediante *P. putida* en matraces Erlenmeyer. De estos ensayos se dedujo que, al ampliar la complejidad de la mezcla de plaguicidas y la concentración inicial de COD, la intensidad de tratamiento fotocatalítico debía aumentarse para conseguir efluentes capaces de ser biodegradados por *P. putida*. Asimismo, las eficiencias de biodegradación se veían disminuidas para igual grado de mineralización.

Los tiempos mínimos anteriormente seleccionados fueron validados mediante ensayos de biodegradación con fangos activos de EDAR. Debido a que los tiempos de tratamiento biológico necesarios para eliminar prácticamente todo el COD eran largos (aproximadamente 200 horas), se realizó la biodegradación combinando el efluente del proceso foto-Fenton con un agua residual simulada conteniendo compuestos fácilmente biodegradables, de modo que el proceso se asemejara a una depuración real en una EDAR, donde la fuente de carbono puede provenir de compuestos difícilmente biodegradables y principalmente de otros muy biodegradables.

De este modo, operando en modo SBR, se consiguió la adaptación del fango a la mezcla del efluente de foto-Fenton y el agua residual simulada. Para la mezcla cuyo COD inicial era de 500 mg L^{-1} , la biodegradación del efluente del proceso foto-Fenton se consiguió en 4.5 h (en el quinto ciclo secuencial) obteniendo la máxima eficiencia global de biodegradación del 89% en el primer ciclo. Asimismo, cuando el COD inicial aportado por los plaguicidas es de 200 mg L^{-1} , el efluente fue finalmente degradado en menos de 5 h consiguiéndose en el primer ciclo una eficiencia de biodegradación del 98%.

Al mismo tiempo, se realizó un ensayo con un fango activo en el que la única fuente de carbono era el agua residual simulada. Al igual que en los ensayos con *P. putida*, cuando la biodegradación mediante fangos activos se realizaba sobre la mezcla del efluente de foto-Fenton, la velocidad máxima de consumo de oxígeno disminuía si se compara con la obtenida para un ensayo con agua conteniendo compuestos fácilmente biodegradables como única fuente de carbono. Esto puso de manifiesto un decrecimiento en la actividad metabólica del fango causada por la presencia de los intermedios de plaguicidas generados durante el proceso de foto-Fenton.

Para el ensayo a 500 mg L^{-1} , en los primeros ciclos en los que no se observó adaptación, el consumo de sustrato puede ajustarse a una cinética inhibitoria de Andrews. Sin embargo, cuando se adaptaba al efluente, la inhibición dejaba de apreciarse ajustándose a una cinética tipo Monod. No obstante, si la concentración inicial de carbono era menor (200 mg L^{-1}), para todos los ciclos de adaptación el consumo de sustrato sigue una cinética tipo Monod, degradándose el efluente al final del proceso biológico cinco veces más rápido que en el experimento a 500 mg L^{-1} .

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Presentación

El trabajo de investigación que se recoge en esta Memoria se enmarca dentro de los proyectos de investigación "Eliminación de contaminantes persistentes en efluentes acuosos mediante métodos integrados de oxidación avanzada (fotocatálisis solar) y oxidación biológica (PPQ2003-07596-C03-02)" que se realizó de diciembre de 2003 a noviembre de 2006 y "Desarrollo de sistemas acoplados de oxidación (fotocatálisis solar y oxidación biológica) para la depuración de efluentes acuosos contaminados con plaguicidas no biodegradables (CTQ2006-14743-C03-03/PPQ)" que se encuentra activo desde octubre de 2006 y finaliza en septiembre de 2009. Ambos proyectos se realizan en coordinación con la Escuela Politécnica Superior de Alcoy, Universidad Politécnica de Valencia y el Grupo de Detoxificación y Desinfección de Aguas de la Plataforma Solar de Almería-CIEMAT.

Durante el desarrollo de este trabajo, que se ha realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y en el Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) de la Universidad de Almería, se ha disfrutado de una beca de Formación del Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Anteriormente a la realización de la presente tesis, se llevó a cabo un trabajo de investigación tutelada dentro del segundo período del programa de doctorado "Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación", entre octubre del año 2004 y julio del 2005 titulado "Biodegradación de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos mediante cultivos de *Pseudomonas putida* CECT 324" con el que el doctorando obtuvo la suficiencia investigadora en septiembre de 2005 y posteriormente el Diploma de Estudios Avanzados en diciembre de 2005 con la calificación de sobresaliente. Con este trabajo se inicia dentro del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería una nueva línea de investigación en depuración de aguas contaminadas con compuestos biorrecalcitrantes.

1.2. Problemática del agua. Escasez y contaminación

El problema del agua cada día ocupa más la atención de la sociedad ya que es utilizada por el hombre para fines muy numerosos, y la dependencia de este elemento no hace más que crecer.

De toda el agua disponible en el Planeta, sólo un pequeño porcentaje puede ser empleada para el consumo del hombre, ya que, aproximadamente el 97% es agua de mar, el 2% está en los polos en forma de hielo y sólo el 1% es agua dulce que se encuentra en ríos, lagos y capas acuíferas subterráneas. Además, el agua tal como se encuentra en la naturaleza, para ser utilizada sin riesgo para el consumo humano requiere ser tratada, con el fin de eliminar las partículas y organismos que pueden ser dañinos para la salud (UNEP, 2002).

En Andalucía, el sector agrícola es el mayor consumidor de agua con el 80% aproximadamente. Le siguen el consumo doméstico, comercial y de otros servicios que requieren el 15% y el sector industrial que demanda el 5% restante. Mientras que en muchos lugares el agua limpia y fresca se da por hecho, en otros es un recurso muy escaso; aproximadamente 1100 millones de personas no tienen acceso a fuentes seguras de agua potable y más de 2400 millones de personas carecen de saneamiento adecuado. En los países en desarrollo, más de 2200 millones de personas, la mayoría de ellos niños, mueren cada año a causa de enfermedades asociadas con la falta de acceso al agua potable, saneamiento inadecuado e insalubridad (WHO y UNICEF Joint Monitoring Programme, 2005). De hecho, la tercera parte de los países en regiones con gran demanda de agua podrían enfrentarse a una escasez severa de ésta en el presente siglo, y para el 2025, dos tercios de la población mundial probablemente vivan en países con escasez moderada o severa. Uno de los retos globales es alcanzar los "Objetivos de Desarrollo del Milenio de la ONU" entre los que se encuentra reducir a la mitad el número de personas sin acceso a agua potable desde el año 2000 al 2015.

Por otro lado, la pérdida de calidad del agua dulce por contaminación repercute muy gravemente en su disponibilidad para consumo, una vez superada la capacidad natural de autodepuración. Esta pérdida de calidad está asociada muy a menudo a la contaminación de origen agropecuario (a través del uso incontrolado de plaguicidas tóxicos y fertilizantes) y a la contaminación industrial que se vierten sin ningún tratamiento y que consecuentemente contaminan el suministro del agua utilizable.

El incremento en la producción y el uso de los compuestos químicos en los últimos años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas terrestre y acuático. Debido a sus características químicas, los plaguicidas son en la mayoría de los casos contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada (van der Werf, 1996). La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos años y, debido al uso indiscriminado que en el pasado se ha dado a estos compuestos, en la actualidad se detectan residuos de estos en el ambiente que se asocian con riesgos potenciales para la salud pública.

Actualmente, los residuos de estos plaguicidas han sido identificados en todos los compartimentos ambientales (aire, agua y suelo), y en todas las regiones geográficas incluyendo aquellas muy remotas al lugar original de su liberación ambiental, como océanos, desiertos y zonas polares. Igualmente se ha demostrado su presencia en organismos de todos los niveles tróficos, desde el plancton hasta las ballenas y los animales del Ártico. Estos compuestos se pueden acumular a través de todas las redes tróficas del mundo. Los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas se han podido identificar en diversos tejidos y secreciones, incluso en habitantes de regiones muy aisladas.

La mayor fuente de contaminación de aguas por plaguicidas proviene de:

- Prácticas agrícolas (pueden generar niveles de contaminación de hasta $10 \mu\text{g L}^{-1}$).
- Aguas procedentes del aclarado de envases de plaguicidas y equipos de aplicación de los mismos ($10\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$).
- Aguas originarias de industrias agrícolas ($10\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$).
- Aguas procedentes de plantas de fabricación de plaguicidas ($1\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$).

Informes de Naciones Unidas estiman que de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 1% alcanza los cultivos. El resto contamina la tierra, el aire y, principalmente, el agua. Como estos contaminantes no son en su mayoría biodegradables y sólo una pequeña cantidad de los residuos son tratados actualmente (debido a la carencia de tecnologías de tratamiento *in situ* disponibles), existe un gran problema de contaminación medioambiental (Kopling y cols., 1996).

1.3. Legislación

El control de la contaminación del agua producida por las actividades industriales comenzó con la aprobación por el Congreso de los Estados Unidos de la enmienda de 1972 a la "Federal Water Pollution Control Act", que estableció un sistema nacional de descarga y eliminación de contaminantes. Las enmiendas de 1977 y 1987, conocidas como "Clean Water Act" y "Water Quality Act", completaron la regulación legal norteamericana. La tendencia en Europa y, por tanto en España, especialmente tras la promulgación de la Ley 16/2002 de prevención y control integrado de la contaminación y la puesta en marcha del Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (EPER-España), es reducir el vertido de algunos contaminantes específicos y emplear sistemas avanzados de tratamiento de aguas residuales *in situ*.

Dentro de la Unión Europea la presión en el suministro de agua es especialmente alta en regiones áridas, con recursos escasos de agua como es la cuenca del Mediterráneo (Comisión Europea, 2003). Además, la contaminación por sustancias orgánicas refractarias afecta significativamente a la viabilidad y sostenibilidad del agua, haciendo necesario reciclar efluentes acuosos para obtener fuentes alternativas a través del tratamiento de aguas municipales o industriales. Entre los métodos más rigurosos para determinar el potencial de reutilización de aguas se encuentra el elaborado por Hochstrat y cols. (2005), según el cual, España tiene un potencial de reutilización de 1200 Mm³ por año, un orden de magnitud superior a la realidad actual.

Los contaminantes más habituales son plaguicidas, fenoles sustituidos, disolventes clorados no biodegradables y detergentes (Directiva 76/464/EEC) y, más recientemente, productos farmacéuticos, productos de higiene personal y aditivos de gasolinas siendo especialmente preocupantes aquellos que pueden ser alteradores del sistema endocrino (Barceló, 2003) que se están considerando como contaminantes emergentes y están en proceso de regulación. De hecho, aún están siendo investigados efectos adversos para la salud de muchos contaminantes presentes en el agua. Estos grupos de contaminantes tienen además la característica de que no necesitan ser muy persistentes en el medio ambiente para causar un efecto negativo, ya que su alto grado de transformación/eliminación es compensado por su constante ingreso en el medio ambiente debido a su utilización masiva. Por ello, la legislación europea adapta continuamente las directivas legales, para proteger y mejorar la calidad de las aguas comunitarias.

La Directiva Marco del Agua (Water Framework Directive, WFD) 2000/60/CE, es la directiva de la CE que establece las bases para la protección de las aguas continentales de los estados miembros. La WFD, entre otros muchos temas, detalla la estrategia de la CE contra la contaminación del agua por sustancias peligrosas. Establece que se deben tomar medidas específicas a nivel comunitario contra la contaminación de las aguas, causada por determinados contaminantes o grupos de contaminantes que representen un riesgo significativo al medio acuático. Además, introduce una metodología científica para seleccionar las sustancias prioritarias en función de su riesgo significativo. La primera lista de sustancias seleccionadas se incluyó en la decisión 2455/2001/CE, donde se describen 33 sustancias prioritarias. Esta lista de sustancias es examinada cada cuatro años, y las revisiones tienen en cuenta toda la información procedente de los estados miembros, el Comité de Toxicología, Ecotoxicología y Medio Ambiente, la Agencia Europea de Medio Ambiente, los programas comunitarios de investigación, las asociaciones empresariales europeas y las organizaciones de protección del medio ambiente. A través de proyectos como CADOX, EMCO, POSEIDON, P-THREE, la CE promueve que se generen soluciones tecnológicas para el tratamiento de contaminantes que hasta el momento no se han podido eliminar (http://ec.europa.eu/environment/water/index_en.htm).

Como consecuencia de todo este trabajo desarrollado desde que se publicó la WFD, en Julio de 2006 la CE acordó intentar establecer una nueva directiva, que se conoce como "Directiva de Sustancias Prioritarias", que apoya a la WFD. Esta directiva (<http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/surfacewater.htm>) está desde enero de 2008 en fase de discusión en el Parlamento Europeo. La propuesta, que se espera sea definitiva durante el año 2008, es parte de una nueva estrategia contra la contaminación química de aguas, introducida por la WFD para la puesta en marcha de un nuevo marco de trabajo. Gran parte del establecimiento de estas nuevas propuestas, directivas y estándares de calidad, se debe a que existen los instrumentos legislativos, técnicos y científicos para llevar a cabo su implementación, provenientes principalmente de los proyectos financiados por la CE dentro de los programas marco (<http://cordis.europa.eu/>).

Un gran avance en este sentido ha sido la puesta en marcha del procedimiento REACH (acrónimo en inglés de Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances) dentro de la Unión Europea. El procedimiento REACH (<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l21282.htm>) es un sistema integrado único de registro, evaluación y autorización de sustancias y preparados químicos que crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. REACH obliga a las empresas que fabrican e

importan sustancias y preparados químicos a evaluar los riesgos derivados de su utilización y a adoptar las medidas necesarias para gestionar cualquier riesgo identificado. De este modo, la carga de la prueba de la seguridad de las sustancias y preparados químicos comercializados recae en la industria. El 1 de junio de 2007 entró en vigor este reglamento en los 27 países de la Unión Europea y el 31 de mayo de 2008 comenzaron las evaluaciones y registros de todas las sustancias y preparados químicos.

Los principales elementos del sistema REACH son:

- Un sistema de registro, en el que todo fabricante e importador de sustancias en cantidades superiores a una tonelada al año debe proporcionar una información básica.
- Un sistema de evaluación para gestionar y tomar decisiones a partir de los expedientes presentados.
- Un sistema de autorización que limita la fabricación e importación de las sustancias más peligrosas.

Antes de la WFD, la legislación de aguas contenía las siguientes directivas:

- Directiva de Sustancias Peligrosas (76/464/EEC) y sus directivas filiales, que controlan la contaminación de aguas superficiales con sustancias peligrosas procedentes de la industria.
- Directiva del Control y Prevención Integrada de la Contaminación, IPPC (96/61/EEC), que controla la contaminación de las aguas superficiales con sustancias peligrosas procedentes de grandes industrias y que obliga a la reutilización de dichas aguas.
- Directiva de Agua Potable (80/778/EEC), que salvaguarda la salud humana estableciendo normas estrictas para la calidad del agua de consumo humano.
- Directiva de Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (91/271/EEC), que controla la contaminación, en particular la eutrofización de aguas superficiales (por nitrógeno y fósforo) procedente de aguas residuales urbanas.
- Directiva de Nitratos (91/676/EEC), que controla la contaminación de fuentes agrícolas y ganaderas y que complementa la directiva anterior.
- Directiva de Aguas de Baño (76/160/EEC), que salvaguarda la salud de los bañistas y mantiene la calidad de las aguas usadas para este fin.

En cuanto a la reutilización de aguas, la última normativa española (Real Decreto 1620/2007) establece las condiciones básicas para la reutilización de aguas depuradas dependiendo de su calidad y de los usos mediante el seguimiento periódico de los nematodos intestinales, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión, turbidez, nitrógeno y fósforo y otros contaminantes (sustancias peligrosas como metales pesados y compuestos orgánicos).

1.4. Tecnologías emergentes para el tratamiento de residuos persistentes no biodegradables

Las aguas residuales son aquellas que proceden del uso doméstico o industrial que no pueden ser vertidas a ríos o mares debido a los problemas económicos, medioambientales o sanitarios que causarían. Las aguas residuales industriales deben ser tratadas previamente, antes de ser tratadas en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), ya que pueden contener sustancias persistentes no biodegradables.

El tratamiento en una EDAR típica es un proceso que se compone de múltiples etapas de carácter físico y biológico independientes (Figura 1.1), de modo que se realizan tratamientos primarios y secundarios.

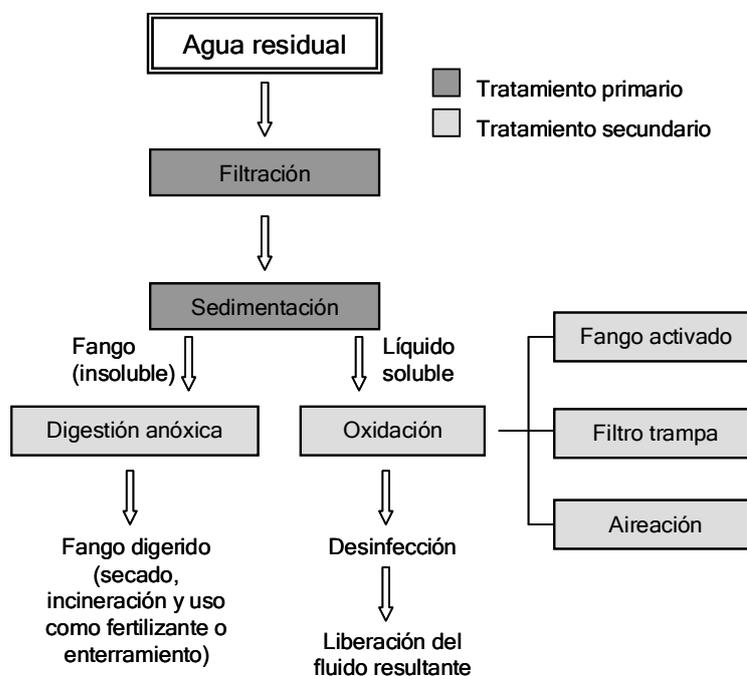


Figura 1.1. Proceso de tratamiento de aguas residuales.

El tratamiento primario consiste únicamente en separaciones físicas. El agua que entra en la planta de tratamiento se pasa a través de una serie de cribas y filtros que eliminan los objetos de gran tamaño. Posteriormente, el líquido resultante se deja que asiente durante unas horas para permitir la sedimentación de los sólidos.

Sin embargo, la mayoría de las plantas dispensan un tratamiento secundario destinado a reducir la carga orgánica del agua que se devuelve a la naturaleza. Este tratamiento se divide en tratamiento secundario aeróbico y anaeróbico. El tratamiento anaeróbico de las aguas residuales recoge una serie de reacciones digestivas y fermentativas y es empleado generalmente para tratar aguas con gran contenido en materia orgánica, con una demanda biológica de oxígeno, DBO, muy alta. La degradación anóxica se lleva a cabo en grandes tanques cerrados llamados digestores de fangos y requiere la cooperación de muchos tipos diferentes de microorganismos. A través de la acción de los microorganismos anóxicos los componentes macromoleculares son primero digeridos por polisacaridas, proteasas y lipasas generando componentes solubles. Estos componentes solubles son entonces fermentados produciendo una mezcla de ácidos grasos, hidrógeno y dióxido de carbono. Los ácidos grasos son después fermentados a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, que son usados por bacterias metanogénicas produciendo metano como resultado final, que puede ser recogido y quemado, o usado como combustible para calentar y abastecer de energía la planta de procesamiento.

Los tratamientos aerobios están basados en el empleo de fangos activos donde el agua que va a ser tratada es mezclada y aireada en un gran tanque. Las bacterias formadoras de limo crecen y forman flóculos (fangos activos), siendo estos flóculos los sustratos para el ataque de protozoos y otros microorganismos como hongos y bacterias filamentosas. Aquí el afluyente que contiene los flóculos es bombeado a un tanque de sedimentación o clarificador donde los flóculos se depositan. Algunos de los flóculos son devueltos al aireador donde se emplean como inóculo, y el resto es enviado al digestor anóxico de fangos o es retirado, secado y quemado o usado como fertilizante.

El agua residual normalmente se mantiene, entre 5 y 10 horas en el tanque de fango, tiempo insuficiente para la completa oxidación de la materia orgánica. No obstante, durante ese tiempo la mayoría de la materia orgánica soluble es adsorbida en los flóculos e incorporada a las células microbianas. La DBO del líquido efluente es considerablemente reducida (más del 95%) gracias a este proceso. La mayoría de las plantas de procesamiento cloran el efluente para evitar la posibilidad de posteriores contaminaciones biológicas y liberan el agua tratada a ríos o mares.

Los tratamientos primarios y secundarios son baratos y están bien implantados en las depuradoras. Sin embargo, muchos de estos métodos biológicos son susceptibles a muchos compuestos tóxicos que se caracterizan por ser muy estables, como los plaguicidas, siendo imposible su biodegradación. Por tanto, es necesario adoptar sistemas mucho más efectivos que los empleados en las depuradoras convencionales.

Algunas plantas, sin embargo, someten las aguas a un tratamiento terciario. El tratamiento terciario es el método más completo para el tratamiento de aguas residuales con contaminantes que no han podido ser eliminados en las fases de tratamiento primario y secundario anteriores. Este tratamiento debe garantizar la eliminación o recuperación del contaminante para lograr los niveles autorizados para el vertido de estos efluentes. Estos niveles están directamente relacionados con el tipo de contaminante presente en el agua a tratar.

Dependiendo del compuesto presente en el agua, los métodos usados deberán ser destructivos (oxidación química o incineración), que consiguen la eliminación del contaminante en medio acuoso, o no destructivos (ósmosis inversa y adsorción) que permiten la recuperación del contaminante. Por otra parte, la aplicación de un método u otro depende de la concentración del contaminante en el efluente, de modo que, para elevadas concentraciones se empleará la incineración o algún método de oxidación química y, para bajas concentraciones adsorción, técnicas basadas en membranas y algunos métodos de oxidación química. En general, la elección de uno u otro básicamente depende de los costes del proceso, concentración y volumen de efluente a ser tratado. Los métodos más usados son incineración, desorción con aire, adsorción en carbón activo, oxidación húmeda, oxidación electroquímica y oxidación química.

1.4.1. Incineración

La incineración es el método a emplear para pequeñas cantidades de efluente y cuya composición es altamente tóxica para los microorganismos que constituyen el fango activado. Sin embargo, cuando el contaminante se encuentra en una baja concentración la incineración es una opción económicamente inviable (Iojoiu y cols., 2006). Este método presenta la desventaja de que puede verter toxinas a la atmósfera y de que es dificultosa la eliminación de algunos compuestos como metales pesados, aunque existen incineradoras capaces de capturarlos con diferentes adsorbentes (Hoi y cols., 1989).

Además de requerir unas altas inversiones, un aspecto económico fundamental en la incineración de disoluciones orgánicas es la necesidad de combustible auxiliar para mantener la combustión. También incrementa el coste el hecho de que normalmente este proceso implica transportes a largas distancias desde donde se encuentra el residuo hasta la central incineradora (Steverson, 1991; Kakko y cols., 1995).

Mediante incineración se han tratado pesticidas (Kakko y cols., 1995), aguas residuales de la industria textil (Masselli y cols., 1970), compuestos policíclicos aromáticos (Horii y cols., 2007), etc.

1.4.2. Desorción con aire

La desorción con aire se basa en la transferencia de compuestos volátiles orgánicos de una fase líquida a otra gaseosa por incremento del área de contacto aire-agua. Esta tecnología tiene la ventaja de encontrarse más establecida y haber sido ampliamente estudiada. Asimismo, esta técnica es la más simple y barata para la eliminación de compuestos volátiles en agua si no se regulan las emisiones de aire.

La desorción con aire ha sido usada, entre otros, en el tratamiento de tricloroetileno, diclorometano, 1,2-dicloroetileno, 1,2-dicloroetano, clorobenceno y dicloroetil éter (Li y cols., 2000). Igualmente, se ha empleado para la descontaminación de suelos con tolueno (Cardenosa y cols., 1989) o en aguas con bifenilos policlorados (Rorschach y cols., 1989).

1.4.3. Adsorción en carbón activo

La adsorción en carbón activo es un método de separación en el que el contaminante es transferido de la fase acuosa, donde se encuentra disuelto, a la superficie del carbón activo, donde es acumulado para su subsiguiente extracción o destrucción.

Es un tratamiento terciario ampliamente utilizado para eliminar compuestos orgánicos recalcitrantes, así como cantidades residuales de nitrógeno, sulfuros y metales pesados. Se utiliza en el control del olor y color, para la eliminación de trihalometanos y es muy eficaz en la industria textil para la reducción de la DQO (demanda química de oxígeno) y la eliminación del color (Yeh y cols., 2002).

Existen muchos procesos para la eliminación de contaminantes que están equipados con un sistema de adsorción en carbón activo combinado con otras técnicas como por ejemplo la desorción con aire (McCarty, 1991) o la incineración (Balogh y Nollet, 2008).

1.4.4. Oxidación húmeda

En el proceso de oxidación húmeda, los compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados en fase acuosa, con oxígeno o aire, en condiciones de alta presión y temperatura. La temperatura necesaria depende de la naturaleza del compuesto a degradar, variando entre 150 y 350°C y la presión entre 20 y 200 bar. El mecanismo de oxidación húmeda ha sido profundamente estudiado y tiene lugar por medio de un proceso de radicales libres. Además, si se combina con un proceso de fangos activos, es capaz de reducir la DQO de un agua residual con altas concentraciones de contaminante realizando así un vertido seguro (Lin y Chuang, 1994).

Entre los compuestos que han sido catalogados como fácilmente oxidables por medio de oxidación húmeda están los compuestos alifáticos, cloruros alifáticos y compuestos aromáticos que no contengan grupos funcionales halogenados como fenoles o anilinas. Sin embargo, los compuestos que contienen grupos funcionales *nitro* son difíciles de degradar por este método.

1.4.5. Oxidación electroquímica

El uso de la oxidación electroquímica para la destrucción de compuestos orgánicos en disoluciones acuosas ha sido probado en planta piloto (Saracco y cols., 2000; Raghu y Basha, 2007) pero no se ha utilizado comercialmente debido a su elevado coste de operación. Una de las principales ventajas del proceso electroquímico es que los electrones son producidos o consumidos en los electrodos, proporcionando así un reactivo limpio que no supone la adición de sustancias químicas al agua. Sin embargo, presentan algunas desventajas, como:

- Es caro en comparación con otros procesos y el mecanismo en aguas es complejo.
- Es necesario que el efluente sea conductor, por tanto, en caso de que el agua a tratar no presente una buena conductividad deben añadirse sales.

Existen muchos estudios de degradación de compuestos orgánicos mediante oxidación electroquímica en la industria textil (Vlyssides y cols., 1999; Mohan y cols., 2007; Panizza y Cerisola, 2008) o en la del aceite de oliva (Saracco y cols., 2000), en el tratamiento de lixiviados de vertedero (Deng y Englehardt, 2007) y de contaminantes como fenol (Yavuz y Koparal, 2006) con eficiencias muy altas. Además, la oxidación electroquímica se puede emplear combinada con otros procesos como fotocátalisis (Neelavannan y cols., 2007) o desorción con aire (Shibin y cols., 2007).

1.4.6. Oxidación química

La oxidación química es el proceso más efectivo para eliminar contaminantes orgánicos presentes a baja concentración (mg L^{-1}) en el agua. Con esta técnica se consigue la mineralización del contaminante a CO_2 , agua y compuestos inorgánicos, o al menos, su transformación en compuestos biodegradables. Generalmente, es usada cuando el proceso biológico presenta poca eficiencia respecto al agua a tratar. Asimismo, se suele considerar económicamente viable como paso previo a un tratamiento de oxidación biológico secundario con el fin de destruir compuestos no biodegradables que pueden inhibir dicho proceso biológico. La optimización del proceso estriba en encontrar unas condiciones en las cuales el compuesto no biodegradable es eliminado por oxidación química y se consume poca cantidad de oxidante. Es decir, aplicando oxidación química al contaminante hasta la formación de intermedios biodegradables y no llegando a la completa mineralización.

Estas técnicas son apropiadas para pequeñas concentraciones de contaminante en el efluente, ya que las cantidades que se consumen de oxidante son muy grandes. Se aplican en la destrucción de compuestos como plaguicidas, compuestos aromáticos, colorantes, etc., para concentraciones que suelen ser inferiores a 500 mg L^{-1} . En el caso de concentraciones superiores, serían más efectivas otras técnicas como la adsorción selectiva o la incineración.

En general, la oxidación química se puede utilizar en la eliminación de compuestos no biodegradables en los siguientes casos:

- Para el tratamiento de concentraciones altas de contaminante, cuando la incineración no es una alternativa viable porque el volumen de efluente es grande.
- Como un pretratamiento, para reducir la toxicidad evitando los problemas de inhibición en la biomasa al introducirse en un tratamiento biológico. En este caso los intermedios generados con la oxidación química, con un consumo reducido de

oxidante, deben reunir las condiciones para que el efluente pueda ser tratado biológicamente.

- Como tratamiento terciario para el ajuste del efluente a las condiciones de vertido deseadas.

Un parámetro de referencia para determinar si es conveniente el uso de oxidación química es la DQO (Figura 1.2). Solo aguas con un contenido en DQO relativamente pequeño ($\leq 5 \text{ g L}^{-1}$) son susceptibles de ser tratadas mediante estos procesos, ya que mayores contenidos en DQO requerirían unas cantidades demasiado grandes de reactivos oxidantes. En estos casos ($\text{DQO} > 20 \text{ g L}^{-1}$), es más conveniente usar la oxidación húmeda o la incineración (Mantzavinos y cols., 1997; Luck, 1999) comentadas anteriormente. En la Figura 1.2 se muestra el intervalo de concentración, según el contenido en DQO del agua residual, en el cual se debe utilizar una u otra tecnología de tratamiento.

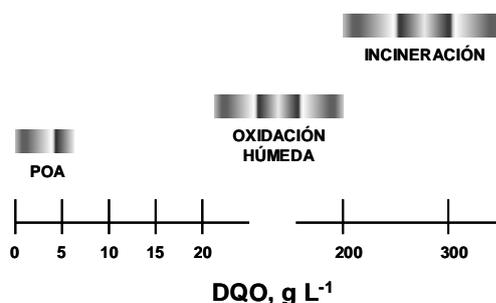


Figura 1.2. Conveniencia de la tecnología de tratamiento según el contenido en DQO del agua residual (Andreozzi y cols., 1999).

Los procesos de oxidación química se pueden dividir en dos clases:

- Tratamientos químicos "clásicos".
- Procesos de oxidación avanzada (PPOA).

1.4.6.1. Tratamientos químicos clásicos

Los tratamientos químicos clásicos consisten generalmente en la adición de un agente oxidante al agua que contiene el contaminante a fin de oxidarlo. Entre los oxidantes más utilizados cabe destacar (Chamarro y cols., 1996):

- Cloro. Es un fuerte oxidante, con un elevado potencial de oxidación, $E^0=1.36 \text{ V}$, muy barato y ampliamente estudiado. Sus principales desventajas son su poca selectividad, la necesidad de grandes cantidades y que puede generar

subproductos organoclorados cancerígenos. Sin embargo, es muy empleado en depuración de aguas porque también es desinfectante.

- Permanganato potásico. Ha sido un oxidante extensamente usado en el tratamiento de aguas durante décadas. Puede ser introducido en el sistema en su forma sólida o en disolución preparada *in situ*. Es un oxidante fuerte ($E^0=1.67$ V) pero es caro y además genera dióxido de manganeso durante la oxidación, que precipita y tiene que ser retirado con el consiguiente coste adicional.
- Oxígeno atómico ($E^0 = 2.42$ V). La reacción de un compuesto orgánico con oxígeno no tiene lugar en condiciones normales, sino que necesita alta presión y temperatura para incrementar su carácter oxidante. Es un proceso que requiere inversiones grandes en instalaciones, pero los bajos costes de operación hacen el proceso atractivo.
- Ozono. Es un fuerte oxidante ($E^0 = 2.07$ V). Es efectivo en muchas aplicaciones como la eliminación del color, olor y gusto, desinfección, eliminación de compuestos orgánicos, etc. Sus principales desventajas son su baja solubilidad en agua y su inestabilidad (Whitby, 1989), con una vida media de unos pocos minutos (Staehelin y Hoigné, 1982). Por consiguiente, para tener la cantidad necesaria de ozono en el medio de reacción se necesitan grandes concentraciones que, además, se deben preparar *in situ* a partir de aire u oxígeno y una descarga eléctrica, lo que conlleva un alto coste. Además, como se trata de un gas tóxico, debe tenerse previsto un sistema de eliminación del ozono que no haya reaccionado, con lo que el sistema se encarece.
- Peróxido de hidrógeno. Es un oxidante utilizado en muchos sistemas que puede ser aplicado directamente o con un catalizador. El catalizador normalmente utilizado es sulfato de hierro (proceso Fenton, descrito en el apartado 1.4.6.2). Sus principales ventajas son que es uno de los oxidantes más baratos usados normalmente en aguas residuales, su alto poder oxidante ($E^0 = 1.77$ V), su fácil manejo, es soluble en agua y no produce compuestos tóxicos o color. Puede ser usado en presencia de radiación ultravioleta u ozono, estando en este caso basada la oxidación en la generación de radicales hidroxilo, HO^* ($E^0 = 2.80$ V), con lo que el proceso pasaría de ser un tratamiento químico clásico a ser un proceso de oxidación avanzada (POA).

1.4.6.2. Procesos de oxidación avanzada (PPOA)

Algunas de las operaciones de tratamiento terciario descritas anteriormente se encuentran actualmente implantadas en las depuradoras. Sin embargo, parecen no ser eficaces para conseguir aguas con un mínimo contenido en los contaminantes no biodegradables (plaguicidas, fenoles, disolventes clorados, antibióticos, etc.). Por ello, resultan necesarias otras etapas de tratamiento que logren este objetivo. En este sentido, los PPOA posiblemente constituyan, en un futuro próximo, uno de los recursos tecnológicos más utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos procedentes de efluentes industriales, que no son tratables mediante técnicas convencionales debido a su elevada estabilidad química y/o baja biodegradabilidad.

Los PPOA fueron definidos por Glaze y Chapin (1987) como procesos a temperatura y presión cercanas a las ambiente que generan unos radicales altamente reactivos (especialmente radicales hidroxilo, HO^{*}) en cantidad suficiente para producir la purificación de un agua.

Se clasifican dependiendo de la fase de reacción (homogéneos y heterogéneos) o dependiendo del método usado para generar los radicales hidroxilo (químicos, electroquímicos, fotoquímicos, sonoquímicos o radiolíticos). Entre ellos, los más usados son fotocatalisis heterogénea con TiO₂ (Pérez y cols., 1997; Konstantinou y Albanis, 2004; Herrmann, 2005; Hincapié y cols., 2005; Marugán y cols., 2006; Oller y cols., 2006), tratamiento con ozono, a menudo combinado con H₂O₂ y/o UV (Urs von Gunten, 2003; Gogate y Pandit, 2004a; Gogate y Pandit, 2004b), sistemas H₂O₂/UV (Legrini y cols., 1993; Gogate y Pandit, 2004b), tratamiento mediante Fenton (Kiwi y cols., 1994; Chamarro y cols., 2001; Neyens y Baeyens, 2003; Gogate y Pandit, 2004a; Pignatello y cols., 2006), foto-Fenton (Kim y Vogelpohl, 1998; Gogate y Pandit, 2004b; Pignatello y cols., 2006; Maldonado y cols., 2007), o procesos electro-Fenton (Brillas y cols., 1998; Pignatello y cols., 2006). Cada uno ofrece una vía diferente para producir radicales hidroxilo con lo que se evidencia la versatilidad de los PPOA.

Los radicales hidroxilo son inestables y deben estar continuamente produciéndose mediante reacciones químicas o fotoquímicas. Estos radicales son especies extraordinariamente reactivas, que atacan a la mayoría de moléculas orgánicas y que poseen un potencial de oxidación ($E^0 = 2.80 \text{ V}$) mayor que los oxidantes clásicos descritos anteriormente. La cinética de reacción es generalmente de primer orden respecto a la concentración de radicales hidroxilo y la concentración de las especies a ser oxidadas. Las

constantes de velocidad están normalmente en el intervalo de 10^8 - 10^{11} L mol⁻¹ s⁻¹, mientras que la concentración de radicales hidroxilo está entre 10^{-10} y 10^{-12} mol L⁻¹, con lo que se obtiene una constante de pseudo-primer orden entre 10 y 10^{-4} s⁻¹ (Glaze y Kang, 1989).

Los radicales hidroxilo también se caracterizan por su baja selectividad en el ataque a moléculas orgánicas, siendo esta una característica muy atractiva para ser utilizado como oxidante en el tratamiento de aguas residuales. Así, son muchos los compuestos orgánicos susceptibles de ser degradados mediante los radicales hidroxilo, como se muestra en la Tabla 1.1. No obstante, algunas de las moléculas orgánicas más simples como los ácidos acético, maleico y oxálico, acetona o derivados clorados simples como cloroformo o tetracloroetano son lentamente atacados por los radicales HO^{*} (Haag y Yao, 1992; Bigda, 1995).

Tabla 1.1. Compuestos oxidables mediante radicales hidroxilo (Bigda, 1995; Gogate y Pandit, 2004a).

| Compuestos | |
|---------------------------------|---|
| Ácidos | Fórmico, glucónico, glicólico, cítrico, láctico, málico, propiónico, tartárico, fenoxiacético, 2,4-diclorofenoxiacético, clorobenzoicos. |
| Alcoholes | Bencílico, <i>tert</i> -butilo, etanol, etilenglicol, glicerol, metanol, propendiol, 1-octanol, 2-propanol. |
| Haloalcanos/haloalquenos | Cloroformo, tricloroetileno, percloroetileno, tetracloruro de carbono, tribromometano, diclorometano. |
| Aldehídos | Acetaldehído, benzaldehído, formaldehído, glioxal, isobutaraldehído, tricloroacetaldehído. |
| Aromáticos | Benceno, clorobenceno, clorofenol, diclorofenol, hidroquinona, p-nitrofenol, fenol, tolueno, triclorofenol, xileno, trinitrotolueno, 2-clorobifenilo, 2,4-diclorofenol, 2,4-clorofenol. |
| Aminas | Anilina, aminas cíclicas, aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, dietilamina, dimetilformamida, propanodiamina, n-propilamina. |
| Amidas | Benzamida, 4-hidroxibenzamida. |
| Éteres | Tetrahidrofurano. |
| Cetonas | Dihidroxiacetona, metil etil cetona. |
| Compuestos con azufre | Sulturo de trimetileno, sulfuro de propileno, tiofurano, disulfuro de metilo. |
| Tintes | Antraquinona, azul de metileno, rodamina B, naranja de metilo, fluoresceína, tinte SBB, reactivo azul 5. |
| Surfactantes | Dodecasulfato sódico, polietilenglicol, trimetil fostato, dodecil benceno sultonato sódico. |
| Herbicidas | Atrazina, herbicidas s-trizina, bentazona. |
| Plaguicidas/fungicidas | Fenitrotrión, Metalaxil. |

Dependiendo de la naturaleza de las especies orgánicas son posibles varios tipos de ataque inicial (Ecuaciones 1.1-1.4) por parte del radical hidroxilo (Bossmann y cols., 1998; Pignatello y cols., 2006). Se puede producir la abstracción de hidrógeno (Ecuación 1.1) en el caso de alcoholes, alcanos, etc., o la adición electrofílica (Ecuaciones 1.3 y 1.4) a dobles enlaces (olefinas, compuestos aromáticos, etc.). De esta forma se generan radicales orgánicos libres R^{\bullet} , que reaccionan a su vez con moléculas de oxígeno formando un peroxirradical, iniciándose una serie de reacciones de degradación oxidativa que pueden conducir a la completa mineralización del contaminante (Buxton y cols., 1988). Igualmente, los radicales hidroxilo pueden atacar a los anillos aromáticos en posiciones ocupadas por un halógeno.



En la Tabla 1.2 se observa que el tratamiento más eficiente ocurre con los alquenos clorados ya que el doble enlace es muy susceptible del ataque del radical hidroxilo. Las moléculas saturadas tienen constantes de velocidad menores y por consiguiente son más difíciles de oxidar.

Tabla 1.2. Constante de velocidad de reacción (k , $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$).

| Compuesto | |
|------------------------------------|------------------|
| Alquenos clorados | $10^9 - 10^{11}$ |
| Fenoles | $10^9 - 10^{10}$ |
| Cetonas | $10^9 - 10^{10}$ |
| Aromáticos | $10^8 - 10^{10}$ |
| Compuestos orgánicos con nitrógeno | $10^8 - 10^{10}$ |
| Alcoholes | $10^8 - 10^9$ |
| Alcanos | $10^6 - 10^9$ |

La principal desventaja de los PPOA es su elevado coste de operación asociado a su alto consumo de energía eléctrica (particularmente si se emplea radiación UV) y el empleo de reactivos caros (H_2O_2 , O_3 , etc.). Sin embargo, no todos los PPOA fotoquímicos requieren irradiación en la misma longitud de onda. Mientras que la fotólisis directa con O_3 o H_2O_2 requiere fotones de longitud de onda menor de 300 nm (Huston y Pignatello, 1999), la

catálisis heterogénea con TiO₂ y foto-Fenton deben usar fotones de longitud de onda de hasta 400 (Herrmann, 2005) y 550 nm (Sun y Pignatello, 1993; Hislop y Bolton, 1999; Pignatello y cols., 1999), respectivamente. Consecuentemente, ambos procesos serán efectivos bajo la acción de la radiación solar ($\lambda > 300\text{nm}$) reduciendo significativamente el coste del proceso y haciéndolos especialmente interesantes en su aplicación a gran escala (Bauer y Fallman, 1997).

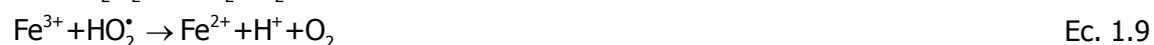
En todo caso, aunque los costes sean elevados, el uso de los PPOA como etapa de pretratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las aguas contaminadas puede estar justificado si el biotratamiento es capaz de degradar los intermedios resultantes de los PPOA. Por tanto, una alternativa para abaratar el proceso de depuración consistiría en una primera depuración mediante un POA del agua contaminada y en una segunda etapa, los intermedios generados (más biodegradables que el contaminante original) se someterían al tratamiento biológico, para llevar a cabo una completa descontaminación del agua a tratar.

Proceso foto-Fenton

El reactivo de Fenton (Fenton, 1884) consiste en una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno e iones ferrosos que genera radicales hidroxilo (Ecuación 1.5).

En ausencia de luz y de otros ligandos complejos sino el agua, el mecanismo más aceptado para la descomposición de H₂O₂ en disoluciones acuosas ácidas homogéneas incluye la formación de los radicales hidropéroxido (HO₂[•]/O₂⁻) e hidroxilo HO[•] (Gallard y cols., 1999). El radical hidroxilo es, como se comentó anteriormente, un poderoso agente oxidante frente a compuestos orgánicos.

La regeneración de Fe²⁺ puede seguir diferentes rutas, sin embargo, la más aceptada se describe según las siguientes ecuaciones (Sychev e Isak, 1995):



Sin embargo, la velocidad de degradación de los compuestos orgánicos aumenta significativamente al complementar el proceso con radiación UV/visible, llamándose entonces proceso foto-Fenton. Este proceso es fotocatalítico puesto que el ión Fe^{2+} que se oxida a Fe^{3+} en la reacción de Fenton se reduce nuevamente a Fe^{2+} por acción de la radiación (Ecuación 1.12) produciéndose una regeneración fotoquímica y obteniéndose nuevamente radicales hidroxilo y continuando el ciclo.



Además el ión férrico acelera la fotodescomposición (a longitud de onda inferior a 300 nm) del peróxido de hidrógeno, produciendo, en soluciones ácidas de H_2O_2 radicales HO^\bullet como fotoproducto primario (Ecuación 1.13) junto con pequeñas cantidades de radicales HO_2^\bullet (Ecuación 1.14). Sin embargo, un exceso de H_2O_2 puede ser perjudicial por la formación de radical hidroperoxido que tiene menor poder oxidante que el radical hidroxilo (Ecuación 1.8). Es preciso remarcar que las reacciones 1.13 y 1.14 no tienen lugar si la fuente de radiación proviene de la luz solar.



Los radicales hidroxilo formados en el sistema son altamente oxidantes e inician la destrucción oxidativa del contaminante (RH) en agua, lo que puede conllevar a una total mineralización del contaminante orgánico. El radical orgánico generado (Ecuación 1.15) reacciona instantáneamente con el oxígeno disuelto (Ecuación 1.16) produciéndose un radical peroxilo que inicia la reacción radicalaria y la consecuente oxidación del contaminante (Gogate y Pandit, 2004b).



Entre los diferentes PPOA, Fenton y, sobre todo, foto-Fenton son considerados los más prometedores para la depuración de aguas residuales (Bossmann y cols., 1998). Son capaces de conseguir la mineralización completa de contaminantes, en muchos casos con una efectividad en la oxidación claramente superior a otros PPOA (Bauer y Fallman, 1997; Pignatello y cols., 2006). Asimismo, desde un punto de vista económico y medioambiental, el proceso foto-Fenton también puede superar la mayoría de ellos.

Ambos procesos constituyen unos sistemas oxidativos que no requieren ni reactivos caros ni instrumentación sofisticada. El hierro es el cuarto elemento más abundante de la tierra, no es tóxico y es seguro, mientras que el peróxido de hidrógeno comparado con otros oxidantes tiene un precio razonable, es fácil de manejar y no es dañino para el medioambiente (Pignatello y cols., 2006). Asimismo, el reactivo Fenton se considera un reactivo "limpio" (Huston y Pignatello, 1999) ya que una vez el tratamiento ha terminado, el hierro disuelto puede retirarse por precipitación simplemente aumentando el pH (Malato y cols., 2003a). Es más, si la cantidad de catalizador empleado es pequeña (del orden de unos pocos mg L^{-1}), podría permanecer disuelto sin afectar la calidad del agua resultante. Igualmente, cualquier peróxido de hidrógeno residual se descompone rápidamente a O_2 y H_2O , no planteando ninguna amenaza medioambiental perdurable (Huston y Pignatello, 1999; Pignatello y cols., 2006).

La principal ventaja del proceso foto-Fenton es que puede utilizarse la luz solar. Este proceso hace uso de fotones con longitudes de onda de hasta 550 nm, con la posibilidad de ser efectivo bajo la acción de la irradiación solar (Bauer y Fallman, 1997). Una de las mayores ventajas del proceso es que la profundidad de penetración de la luz es grande, ya que el catalizador está en disolución y se permite la penetración de la luz en función de la concentración de hierro añadido. Además, al tratarse de una solución homogénea el contacto entre el contaminante y el agente oxidante es mayor que en catálisis heterogénea (con TiO_2 como catalizador). La aireación también aumenta significativamente la velocidad de degradación (Kim y Vogelpohl, 1998).

El pH es uno de los factores cruciales también para maximizar la velocidad de degradación con foto-Fenton estando el óptimo alrededor de 2.8 (Nogueira y Cuimaraes, 2000; Pérez-Estrada y cols., 2005a; Malato y cols., 2007a). Este pH es necesario para evitar la precipitación de hidróxidos de hierro y es la principal desventaja del proceso. Otras desventajas asociadas son la inestabilidad de la mezcla de reactivos ($\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$), la baja reactividad de algunos complejos organoférricos y la posible generación de lodos de óxido de hierro cuando se usan concentraciones elevadas de hierro (Pignatello y cols., 2006). En este sentido, estudios recientes apuntan a la aplicación de hierro en fase heterogénea (Kiwi y cols., 2002) soportado sobre polímeros y otros materiales, lo que evita la etapa de separación del agua y permite trabajar sin ajustes de pH (Parra y cols., 2004).

Actualmente, la aplicación de Fenton y foto-Fenton es un campo creciente en investigación aplicada en el que se desarrollan numerosas publicaciones. Mediante ambos procesos se pueden degradar diversos contaminantes orgánicos, como compuestos

fenólicos (Tang y Huang, 1996; Chamarro y cols., 2001; Pera-Titus y cols., 2004) colorantes (Stalikas y cols., 2001), compuestos aromáticos nitrogenados (Kiwi y cols., 1994; Wang y cols., 1999), mezclas complejas, como por ejemplo la mezcla de benzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol, 2-hidroxibenzotiazol (Andreozzi y cols., 2001), aguas residuales de la industria textil (López Cisneros y cols., 2002; Bandala y cols., 2008), efluentes de la industria papelera (Pérez y cols., 2002; Amat y cols., 2005; Catalkaya y Kargi, 2007) efluentes de la industria del vino (De Heredia y cols., 2001), etc. También existen numerosos trabajos para la degradación de plaguicidas disueltos en agua (Malato y cols., 2000, Malato y cols., 2001; Lapertot y cols., 2006; Oller y cols., 2007a).

Además, se han diseñado plantas solares a escala piloto para el uso de foto-Fenton mediante luz solar (Gernjak y cols., 2002; Malato y cols., 2003a; Amat y cols., 2004; Maldonado y cols., 2007; Malato y cols., 2007a). También existen plantas a mayor escala para el tratamiento mediante foto-Fenton con luz solar de aguas residuales provenientes del reciclado de envases de plástico que han contenido plaguicidas (Malato y cols., 2007b).

1.5. Depuración de contaminantes biodegradables mediante tratamientos biológicos

1.5.1. Depuración mediante cultivos monoespecíficos empleando *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida (Figura 1.3) es una bacteria aerobia no fermentativa y quimioorganotrófica del género *Pseudomonas* que se encuadra dentro de la subclase gamma de las Proteobacterias. Es Gram negativa, con un tamaño mayor de 0.5-1.0 por 1.5-4.0 μm , sin esporas y que posee varios flagelos polares (Montie, 1998; Madigan y cols., 2004). Es capaz de colonizar diferentes ambientes, incluyendo suelos (limpios y contaminados), ambientes acuáticos, rizosfera de plantas y está presente en los lodos activos de las depuradoras.

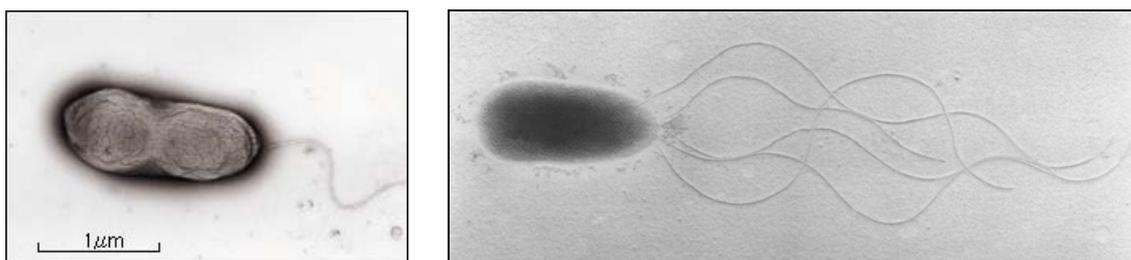


Figura 1.3. Fotografías de *Pseudomonas putida*.

Cuando una molécula orgánica se incorpora en el medio ambiente, bien por accidente o como vertido, a menudo es degradada por un microorganismo. A lo largo del último siglo, los microorganismos han sido aislados del medioambiente para estudiar su metabolismo degradativo en el laboratorio, siendo *P. putida* mucho más estudiada que cualquier otra especie bacteriana.

En 1926, den Dooren de Jong publicó que las especies de *Pseudomonas* podrían crecer en 80 moléculas orgánicas diferentes. En 1955, una especie de *Pseudomonas* fue la fuente de una novedosa clase de enzimas conocidas como oxigenasas (Hayaishi y cols., 1955). Desde 1955, cientos de oxigenasas han sido identificadas causantes de la oxidación de miles de compuestos en el medioambiente, incluyendo hidrocarburos aromáticos.

Esta bacteria desempeña, por tanto, una importante actividad metabólica en el medioambiente, incluyendo la degradación de compuestos bióticos y xenobióticos (Timmis, 2002). *Pseudomonas* tiene además un considerable potencial en cuanto a aplicaciones biotecnológicas, particularmente en las áreas de biorremediación (Cheung y cols., 2007), biocatálisis (Schmid y cols., 2001), como agente de protección de plantas (Walsh y cols., 2001) y para la producción de nuevos bioplásticos (Olivera y cols., 1998).

P. putida es además manejable desde el punto de vista genético. La cepa *P. putida* mt-2 aislada originalmente en Japón porta el plásmido TOL pWW0 (Greated y cols., 2002), que codifica una ruta de degradación de tolueno y xileno; siendo esta una de las mejor caracterizadas en el ámbito de la biodegradación atendiendo a los aspectos bioquímico y genético. La degradación de moléculas aromáticas por parte de *P. putida* ocurre mediante rutas de degradación bien establecidas (Jiménez y cols., 2002). Los compuestos aromáticos son primero transformados en los intermedios dihidroxilados mediante determinadas rutas y posteriormente son metabolizados en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) por un limitado número de etapas, iniciadas con la rotura del anillo aromático. Al igual que otras *Pseudomonas* muchas de sus enzimas inducidas son no específicas y sus rutas metabólicas contienen un elevado grado de convergencia. La convergencia de rutas catabólicas permite la eficiente utilización de un amplio número de sustratos. Un ejemplo es su capacidad de cometabolizar la biodegradación de tricloroetano en presencia de tolueno y otros aromáticos (Wackett y Gibson, 1988). Un gran avance para conocer la base molecular de estas biotransformaciones ha sido el análisis completo de la secuencia de su genoma (Nelson y cols., 2002).

Las rutas metabólicas de los compuestos aromáticos que se han estudiado en este trabajo, fenol y vanilina son distintas. La enzima responsable del paso inicial en el

metabolismo del fenol (monohidroxilación del fenol al catecol) por *P. putida* es la enzima tolueno dioxigenasa (Spain y Gibson, 1988; Spain y cols., 1989), y la transformación de vanilina en protocatecuato es llevada a cabo por una aldehído deshidrogenasa y una demetilasa (Jiménez y cols., 2002).

La degradación biológica de fenol con cultivos de *P. putida* se ha estudiado ampliamente (Hill y Robinson, 1975; Monteiro y cols., 2000; Chen y cols., 2007a), y de otros compuestos como benceno (Monero y cols., 2003), 2,4-diclorofenol (Kargi y Eker, 2004; Kargi y Eker, 2005), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Marrón-Montiel y cols., 2006), tricloroetileno (Guo y cols., 2001), carbazol (Loh y Yu, 2000), etc. También han sido estudiadas mezclas de compuestos como fenol y catecol (Kumar y cols., 2005), benceno, tolueno y fenol (Reardon y cols., 2000; Abuhamed y cols., 2004), benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (Shim y Yang, 1999; Shim y cols., 2002), etc., y otras mezclas más complejas como ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido verátrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido cinámico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, ácido cafeico y ácido vanilínico simulando aguas residuales procedentes del tratamiento de la aceituna (Bertin y cols., 2001). Existen trabajos sobre las rutas metabólicas de degradación de vanilina (Priefert y cols., 1997; Segura y cols., 1999), de la degradación biológica de ácido oxálico (Stowell y cols., 1992) y fórmico (Adroer y cols., 1990; Glancer-Soljan y cols., 2001) pero no se ha estudiado su degradación en biorreactor con fines industriales.

1.5.1.1. Cinética de la degradación biológica con *P. putida*

En el cultivo en discontinuo de un microorganismo se observan varias fases de crecimiento celular (Panikov, 1995) ya que, al no haber regeneración del medio de cultivo, el crecimiento se detiene cuando se llega a algún tipo de limitación (consumo de nutriente esencial, acumulación de un producto tóxico del metabolismo o limitación por oxígeno son los más frecuentes).

Las diferentes fases de crecimiento se distinguen fácilmente cuando se representa el logaritmo neperiano de la concentración de células viables ($\ln X$) frente al tiempo (Figura 1.4) obteniéndose la curva típica del crecimiento de un microorganismo. La velocidad de crecimiento de dicho microorganismo (μ) depende de la fase de crecimiento:

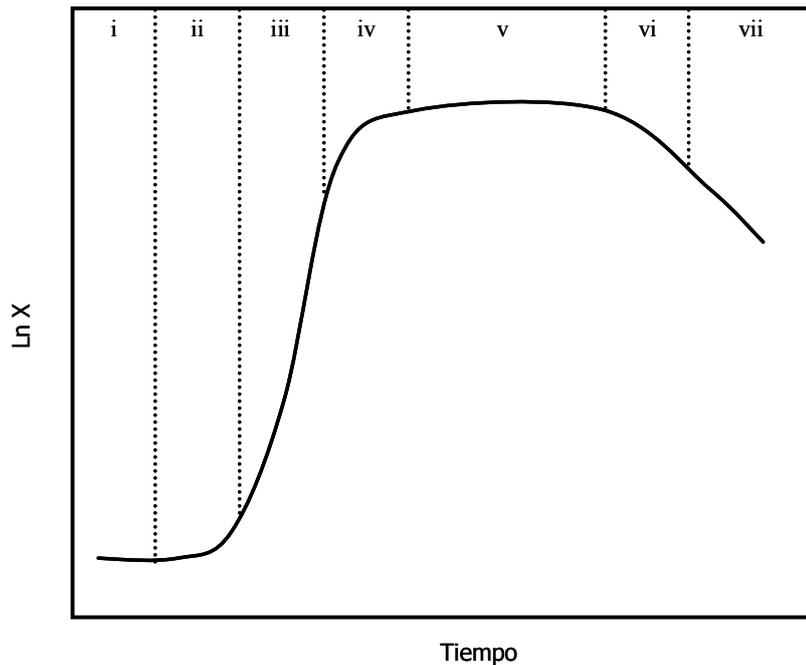


Figura 1.4. Fases del crecimiento de un microorganismo.

- Fase de adaptación o fase *lag*. Durante la fase de adaptación o latencia, inmediatamente después de la inoculación, no se produce un aumento sustancial en el número de células y la velocidad de crecimiento es prácticamente cero. Las células utilizan esta fase para adaptarse al nuevo ambiente y, algunas veces, se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales. La duración de esta fase es variable y, en general, es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo.
- Fase de aceleración del crecimiento. Tras el período de adaptación, comienza el crecimiento en la fase de aceleración en el que la velocidad específica de crecimiento (μ) es menor que la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}).
- Fase de crecimiento exponencial. En esta fase el crecimiento alcanza su máxima velocidad ($\mu = \mu_{max}$). Puede considerarse que el crecimiento está balanceado o equilibrado, de modo que no existen limitaciones y el comportamiento metabólico y fisiológico de las células es básicamente el mismo.
- Fase de desaceleración. Por carencia de un nutriente, acumulación de algún producto inhibitor o algún cambio en el entorno físico-químico, el crecimiento se hace más lento, siendo la velocidad específica de crecimiento otra vez menor que la velocidad específica de crecimiento máxima.
- Fase estacionaria. Tras el anterior período de transición, se alcanza la fase estacionaria en la que no existe crecimiento y la cantidad de biomasa permanece constante ($\mu = 0$). En la fase estacionaria muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos.

- Fase de declinación. En esta fase las células pierden viabilidad ($\mu < 0$).
- Fase de muerte. Las células comienzan a morir ya sea por rotura o como consecuencia del propio metabolismo disminuyendo la población celular. Un microorganismo muerto es aquel que ha perdido irreversiblemente la capacidad de dividirse, aunque metabólicamente no tiene por qué estar inactivo.

Efecto de la temperatura y del pH en el crecimiento de P. putida

Todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento. Esto significa que a determinada temperatura su velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) es mayor. A medida que se eleva la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de una cierta temperatura algunas proteínas particulares pueden sufrir desnaturalizaciones irreversibles. Hay que tener en cuenta que no todos los microorganismos crecen en el mismo intervalo de temperatura (Tabla 1.3), de forma que se pueden clasificar en psicrófilos, mesófilos o termófilos si crecen a temperaturas óptimas bajas, moderadas o altas, aunque también existen los hipertermófilos cuyas temperaturas óptimas de crecimiento son muy elevadas.

Tabla 1.3. Clasificación de los microorganismos según la temperatura.

| Clasificación | Intervalo de crecimiento (°C) | Intervalo óptimo de crecimiento (°C) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Psicrófilos | -5 - 30 | 10 - 20 |
| Mesófilos | 10 - 45 | 20 - 40 |
| Termófilos | 25 - 80 | 50 - 60 |

A pesar de la capacidad de algunos organismos para crecer a bajas temperaturas, existe un límite por debajo del cual es imposible la reproducción. Aunque la congelación evita el crecimiento microbiano no causa necesariamente la muerte celular. Además, el medio de suspensión de las células afecta a su sensibilidad al frío. Los líquidos solubles en agua, como la glicerina, cuando se añaden al medio a una concentración final aproximada del 10%, penetran en las células y las protegen de los efectos de la deshidratación a la vez que evitan la formación de cristales de hielo. De hecho, la adición de estos agentes, denominados crioprotectores (o criogénicos), es un método habitual para conservar los cultivos microbianos a temperaturas muy bajas, normalmente de -70 a -196°C. Las células congeladas, preparadas adecuadamente, pueden permanecer viables durante mucho tiempo, al menos varias décadas (Madigan y cols., 2004).

Al mismo tiempo, la mayoría de los microorganismos crecen a pH cercanos a la neutralidad, lo que no excluye que existan microorganismos que puedan soportar valores de pH extremos y se desarrollen. Según el intervalo de pH del medio en el cual se desarrollan pueden dividirse en acidófilos, neutrófilos y alcalófilos (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Clasificación de los microorganismos según el pH.

| Clasificación | pH externo | pH interno |
|---------------|------------|------------|
| Acidófilos | 1.0 - 5.0 | 6.5 |
| Neutrófilos | 5.5 - 8.5 | 7.5 |
| Alcalófilos | 9.0 - 10.0 | 9.5 |

Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente. El intervalo de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos es estrecho, debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno. Además, un cambio en el pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases, lo que puede afectar la floculación de la biomasa. En general, para la mayor parte de las bacterias el pH óptimo varía entre 6.5 y 7.5 y no crecen bien fuera del intervalo 5.0-8.5.

P. putida es considerado un organismo mesófilo y neutrófilo (Madigan y cols., 2004) porque la temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y el pH es 7.

Modelos de crecimiento de microorganismos. Determinación de los parámetros cinéticos.

La determinación de los parámetros cinéticos se puede realizar cultivando las células en discontinuo o continuo. Los cultivos en continuo ofrecen la ventaja de mantener las células cuando las concentraciones de sustrato son bajas, con lo que resultan más adecuados al estimar constantes de afinidad (por ejemplo K_s en el modelo de Monod) que en cultivos en discontinuo. Sin embargo, la estimación de la velocidad específica de crecimiento máxima puede ser menos exacta en los cultivos continuos (Reardon y cols., 2000), y los resultados pueden verse afectados por mutaciones debido a los largos períodos del cultivo requeridos por esta técnica. Además, es difícil mantener cultivos en continuo bajo condiciones de inhibición por sustrato o producto. Por estas razones, se ha elegido en el presente estudio realizar los cultivos en discontinuo para determinar los parámetros del modelo de crecimiento.

i) Modelo de Monod

El crecimiento de un microorganismo puede calcularse con la Ecuación 1.17, en la que X representa la concentración de biomasa y μ es la velocidad específica de crecimiento.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. 1.17}$$

Además, el consumo de sustrato limitante por parte de un microorganismo también puede expresarse mediante la Ecuación 1.18, donde S_i es la concentración de sustrato limitante e $\frac{Y_X}{S_i}$ es la relación que existe entre la formación de biomasa y el sustrato i utilizado (rendimiento biomasa-sustrato).

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{\mu_i X}{Y_{X/S_i}} \quad \text{Ec. 1.18}$$

Para aplicar estas ecuaciones a un proceso de crecimiento en particular debe existir una relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato limitante. Si este crecimiento es no inhibitorio suele describirse esta relación con el modelo de Monod (Ecuación 1.19), en el que μ aumenta hasta un máximo (μ_{\max}) mientras se incrementa el valor de la concentración de sustrato.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 1.19}$$

En dicha ecuación, K_S es la constante de Monod o constante de saturación, y es una medida de la afinidad de las células por el sustrato limitante (a menor valor de K_S mayor afinidad).

ii) Modelo de Andrews

El modelo de Andrews (Andrews, 1968) es el más sencillo cuando el sustrato limitante produce inhibición en el crecimiento del microorganismo (Ecuación 1.20).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{Ec. 1.20}$$

En este modelo se introduce la constante de inhibición K_i , que indica el grado de inhibición que produce un sustrato al crecimiento del microorganismo.

iii) Crecimiento sobre varios sustratos

Es muy habitual que en el medio de cultivo puedan existir varios sustratos. En la forma más simple, siempre que la presencia de uno de los sustratos no afecte la velocidad de biodegradación del otro, podría utilizarse una ecuación de Monod (o la de Andrews, si existe inhibición) para cada sustrato, de modo que la velocidad específica de crecimiento sería la suma de la velocidad específica de crecimiento individual para cada sustrato. Para dos sustratos la velocidad específica de crecimiento vendría expresada por la Ecuación 1.21 o por la Ecuación 1.22, si existe además inhibición:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1} S_1}{K_{S,1} + S_1} + \frac{\mu_{\max,2} S_2}{K_{S,2} + S_2} \quad \text{Ec. 1.21}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1} S_1}{K_{S,1} + S_1 + \frac{S_1^2}{K_{i,1}}} + \frac{\mu_{\max,2} S_2}{K_{S,2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{i,2}}} \quad \text{Ec. 1.22}$$

Si la ruta metabólica usada en el catabolismo de los sustratos es la misma, es posible que los dos sustratos compitan por el sitio activo de la enzima. De este modo, el modelo anterior de suma de cinéticas incorporaría una cinética de sustrato puramente competitiva (Yoon y cols., 1977). Si suponemos que además existe inhibición por sustrato la Ecuación 1.22 se convierte en la Ecuación 1.23:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1} S_1}{K_{S,1} + S_1 + \frac{S_1^2}{K_{i,1}} + \left(\frac{K_{S,1}}{K_{S,2}}\right) S_2} + \frac{\mu_{\max,2} S_2}{K_{S,2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{i,2}} + \left(\frac{K_{S,2}}{K_{S,1}}\right) S_1} \quad \text{Ec. 1.23}$$

Otra forma de interacción entre la enzima y los dos sustratos es una inhibición no competitiva, en la que un complejo no reactivo es formado cuando ambos sustratos son simultáneamente anclados a la enzima. El modelo basado en este tipo de interacción es el expresado en la Ecuación 1.24:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1}S_1}{\left(K_{S,1} + S_1 + \frac{S_1^2}{K_{i,1}}\right)\left(1 + \frac{S_2}{K_{S,2}}\right)} + \frac{\mu_{\max,2}S_2}{\left(K_{S,2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{i,2}}\right)\left(1 + \frac{S_1}{K_{S,1}}\right)} \quad \text{Ec. 1.24}$$

La inhibición enzimática anticompétitiva es similar a la no compétitiva excepto que uno de los compuestos (el inhibidor) puede unirse solo al complejo enzima-sustrato y no a la enzima libre. Un crecimiento basado en un modelo de interacción de sustrato anticompétitivo se expresaría según la Ecuación 1.25:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1}S_1}{K_{S,1} + S_1\left(1 + \frac{S_2}{K_{S,2}}\right) + \frac{S_1^2\left(1 + \frac{S_2}{K_{S,2}}\right)^2}{K_{i,1}}} + \frac{\mu_{\max,2}S_2}{K_{S,2} + S_2\left(1 + \frac{S_1}{K_{S,1}}\right) + \frac{S_2^2\left(1 + \frac{S_1}{K_{S,1}}\right)^2}{K_{i,2}}} \quad \text{Ec. 1.25}$$

Un modelo alternativo a los tres anteriores es el modelo SKIP (siglas en inglés de sum kinetics with interaction parameters). Dicho modelo refleja el grado en que el consumo de un sustrato por parte del microorganismo afecta a la degradación de otro sustrato presente en el medio de cultivo. Para tener en cuenta las interacciones por sustrato se incluye una nueva constante (I_{ij}) que indica el grado en que el sustrato "j" afecta a la biodegradación del sustrato "i" (valores grandes indican una fuerte inhibición). De este modo para dos sustratos con interacciones el modelo SKIP se escribiría según la Ecuación 1.26:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1}S_1}{K_{S,1} + S_1 + \frac{S_1^2}{K_{i,1}} + I_{2,1}S_2} + \frac{\mu_{\max,2}S_2}{K_{S,2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{i,2}} + I_{1,2}S_1} \quad \text{Ec. 1.26}$$

Este modelo fue propuesto por Yoon y cols. en 1977 y ha sido utilizado por otros autores (Reardon y cols., 2000; Abuhamed y cols., 2004) para la degradación por parte de *P. putida* de mezclas de benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono.

1.5.2. Depuración mediante fangos activos

El proceso de fangos activos fue desarrollado por Clark y Gage en 1913 en la estación experimental de Lawrence en Massachusetts, y posteriormente en Inglaterra en 1914 por Arern y Lockett. Su nombre proviene de la producción de una masa activada de microorganismos capaz de estabilizar un residuo por vía aerobia. El principal objetivo del tratamiento biológico con fangos activos es eliminar o reducir la materia orgánica presente

en el agua residual. Adicionalmente, puede además ser útil para reducir la concentración de materia inorgánica eliminando nutrientes como nitrógeno y fósforo (Metcalf y Eddy, 1985).

En los fangos activos, el residuo orgánico a tratar se introduce en un reactor, donde se mantiene un cultivo biológico, habitualmente en suspensión. El ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores, que además ayudan a mantener el fango en estado de mezcla completa. Al cabo de un periodo determinado de tiempo, la mezcla de las nuevas células con las viejas se conduce hasta un tanque de sedimentación para su separación del agua residual tratada. Una parte de las células sedimentadas se recircula para mantener en el reactor la concentración de células deseada, mientras que la otra parte se purga del sistema. La principal restricción de los fangos activos es la limitación del proceso de sedimentación y consecuentemente el mantenimiento de la concentración de biomasa.

El proceso de reducción de materia orgánica ocurre cuando un grupo de células microbianas, por medio de una serie de reacciones bioquímicas, usa carbono y energía para el crecimiento celular y el mantenimiento. Dependiendo de si los organismos obtienen el carbono de una fuente orgánica o inorgánica se dividen en heterótrofos (el grupo más importante) o autótrofos, respectivamente. Por otro lado, la entrada de energía puede proporcionarse por la luz del sol o por reacciones químicas de oxidación-reducción. Los organismos autotróficos pueden tomar la energía de una u otra fuente, mientras que los heterótrofos principalmente obtienen la energía por vía fermentativa o por la oxidación de la materia orgánica (Madigan y cols., 2004).

La biodegradación la llevan a cabo los microorganismos presentes en la balsa de activación que forman el flóculo. El flóculo individual es la unidad ecológica y estructural del fango activo, y constituye el núcleo alrededor del cual se desarrolla el proceso de depuración biológica. El tamaño medio del flóculo varía entre las 100 y 500 micras. A medida que aumenta el tamaño del flóculo, el oxígeno en su interior disminuye, y se pueden formar zonas de anoxia donde pueden crecer bacterias anaerobias metanogénicas, que pueden realizar el proceso de digestión anaerobia de fangos. El flóculo de fangos activos está constituido por una amplia variedad de microorganismos:

- Bacterias. Básicamente son heterótrofas: Bacilos Gram negativos del grupo de las *Pseudomonas* como *Zoogloea* (principalmente la especie ramígera), *Pseudomonas* o *Comamonas*, bacterias filamentosas sin septos como *Flavobacterium-Cytophaga* o

proteobacterias oxidantes del hidrógeno como *Alcaligenes* (con capacidad desnitrificante). Entre las bacterias Gram positivas se pueden encontrar *Arthrobacter* (corineformes con morfogénesis coco-bacilo, muy abundantes en el suelo) y *Bacillus* (Bacilo esporógeno aerobio). Un flóculo "ideal" contiene una serie de bacterias filamentosas desarrollándose en equilibrio con el resto de las bacterias. Lo descrito hasta ahora constituiría la estructura básica del flóculo del fango activo. No obstante, se pueden encontrar un gran número de bacterias autótrofas que suelen ser nitrificantes Gram negativas como los géneros *Nitrosomonas* o *Nitrobacter*, o bacterias rojas no del azufre como el género *Rhodospirillum* o *Rhodobacter*.

- Hongos. Los fangos activados no suelen favorecer el crecimiento de hongos, aunque algunos filamentosos sí pueden ser observados, ocasionalmente, en los flóculos de los fangos activos, como los géneros: *Geotrichum*, *Penicillium* o *Cephalosporium*.
- Protozoos. Los principales microorganismos eucariotas presentes en los fangos activos son los protozoos ciliados libres (*Paramecium*), fijos (*Vorticella*) o reptantes (*Aspidisca*, *Euplotes*), que se encuentran en altas densidades y desempeñan un importante papel en el proceso de depuración y en la regulación del resto de la comunidad biótica. Mejoran la calidad del efluente y regulan la biomasa bacteriana al preñar sobre las bacterias dispersas del licor mezcla. Otros protozoos presentes son los flagelados *Bodo* o *Pleuromonas* y, dentro del grupo sarcodina, el género *Amoeba*.
- Metazoos. Aunque pueden estar presentes en las balsas de activación organismos multicelulares tales como nemátodos, anélidos, crustáceos o ácaros, los organismos multicelulares más comunes son los Rotíferos (*Lecane*, *Philodina* o *Notommata*). Eliminan bacterias libres y posibles patógenas (Salmonelas, bacterias fecales, etc.) y producen un mucus que mantiene el flóculo junto con el exopolisacárido producido por la bacteria *Zooglea ramigera*.
- Algas microscópicas: Si bien no suelen formar parte del flóculo, pueden aparecer en aquellas aguas residuales con gran cantidad de materia orgánica. Entre las más comunes se encuentran *Cosmarium* y *Pediastrum*, *Euglena* y *Pinnularia*.

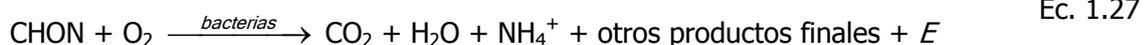
Algunas condiciones ambientales influyen en la selección del microorganismo, supervivencia y crecimiento y, consecuentemente, en la operación del proceso biológico (Stephenson y Blackburn, 1998). Así, es esencial tener un control efectivo de algunos parámetros como el mezclado o el régimen hidráulico, que determina la accesibilidad del sustrato por los microorganismos y la disponibilidad de oxígeno y nutrientes (elementos inorgánicos como nitrógeno, fósforo y elementos traza como sulfuros, potasio, calcio y magnesio) que son de vital importancia para la síntesis celular. Además, el pH del medio debe estar entre 6 y 8 y la temperatura generalmente entre 25 y 33°C.

El tratamiento biológico para la eliminación de carbono orgánico puede ser clasificado en aeróbico o anaeróbico dependiendo si se realiza en presencia o ausencia de oxígeno, respectivamente.

1.5.2.1. Tratamiento aerobio

El tratamiento aerobio es usualmente el método elegido para el tratamiento de aguas residuales puesto que muchos compuestos orgánicos son aeróbicamente oxidables (Stephenson y Blackburn, 1998). Principalmente, las bacterias heterotróficas oxidan la materia orgánica hasta dióxido de carbono y agua como productos finales de la mineralización proveyendo la energía requerida (E) para la síntesis celular. En ausencia de materia orgánica, las propias células son empleadas endógenamente (autooxidación) para obtener la energía para el mantenimiento de los microorganismos. El proceso íntegro se puede describir mediante una serie de reacciones (Ecuaciones 1.27-1.29) bioquímicas (Metcalf y Eddy, 1985), donde CHON representa la materia orgánica y $C_8H_{15}O_4N$ una célula de composición química modelo.

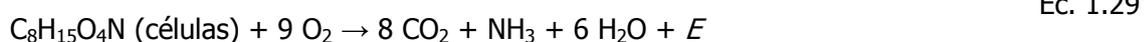
Oxidación



Producción de células

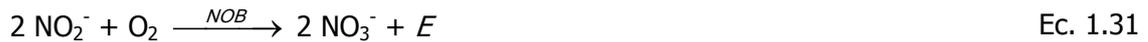
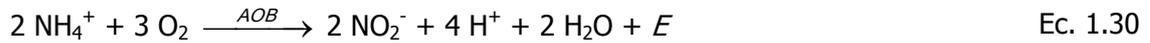


Respiración endógena (autooxidación)



A parte de la biodegradación de materia orgánica, algunas bacterias autotróficas son capaces de metabolizar los compuestos inorgánicos presentes en el medio. El

compuesto inorgánico más importante es el amonio, que interviene en un proceso biológico de nitrificación (Metcalf y Eddy, 1985) en dos pasos (Ecuaciones 1.30 y 1.31). De estas reacciones, las bacterias autotróficas por ejemplo, bacterias que oxidan amonio (AOB) y bacterias que oxidan nitrito (NOB) obtienen energía que será usada junto con más NH_4^+ y carbono inorgánico (CO_2 , HCO_3^-) para construir material celular.

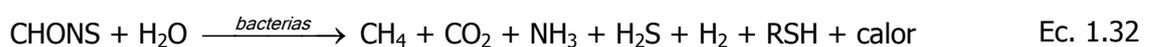


Bajo condiciones medioambientales y de operación apropiadas, el proceso de nitrificación puede tener lugar simultáneamente con la biodegradación de materia orgánica. No obstante, la velocidad de crecimiento de bacterias nitrificantes es menor que la de las heterotróficas, siendo la nitrificación el paso limitante en el tratamiento biológico.

La principal desventaja del tratamiento aeróbico es la producción asociada de fango. Supone una alta contribución a la contaminación medioambiental y es una parte importante a resolver en un proceso aeróbico (Hospido y cols., 2004). Existen diferentes tecnologías para administrar el exceso de fango. Un esquema general se compone de los siguientes pasos: espesado, deshidratación, estabilización y tratamiento principal (Suh y Rousseaux, 2002). Finalmente los residuos sólidos son incinerados, depositados en un vertedero o destinados a otras aplicaciones.

1.5.2.2. Tratamiento anaeróbico

El tratamiento anaeróbico principalmente descompone la materia orgánica en ausencia de oxígeno molecular (Ecuación 1.32) en metano y dióxido de carbono, entre otros (biogas).



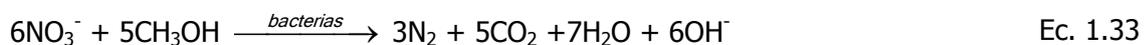
Su principal y más antigua aplicación es la estabilización del fango concentrado generado a través del tratamiento aeróbico del agua residual (Metcalf y Eddy, 1985), sin embargo, puede ser también aplicado en el tratamiento de aguas residuales con fuertes cargas orgánicas (Stephenson y Blackburn, 1998). Desafortunadamente, los organismos anaeróbicos son muy sensibles a ciertos compuestos químicos y su campo de aplicación no es tan extenso como la biorremediación aerobia. Sin embargo, las técnicas y métodos

anaeróbicos han progresado muy rápido en los últimos años y aguas que no eran tratables mediante procesos anaeróbicos ahora lo son.

La degradación anaerobia es una cadena de procesos complejos que requiere la acción sinérgica de diferentes tipos de organismos facultativos y anaeróbicos (van Rijn y cols., 2006). Puede simplificarse en tres fases separadas:

- En una primera fase, las bacterias hidrolizantes y fermentantes convierten los compuestos orgánicos complejos (lípidos, polisacáridos, proteínas, etc.) en ácidos grasos volátiles, alcoholes, dióxido de carbono, amonio e hidrógeno.
- El segundo grupo de bacterias acetogénicas que producen hidrógeno convierten el producto del primer grupo en hidrógeno, dióxido de carbono, ácido acético, metanol, etc.
- Finalmente, en una tercera fase, las bacterias que forman metano (metanogénicas) convierten los compuestos intermedios en dióxido de carbono y metano. La biodegradación de productos finales es la responsable de los olores característicos emitidos por las unidades de tratamiento anaeróbico.

También existen otros grupos de bacterias heterótrofas y autótrofas que pueden usar los diferentes iones inorgánicos presentes (durante la reducción de sulfato y el proceso de desnitrificación la bacteria reduce sulfato a sulfuro y nitrato a nitrito y, posteriormente, a nitrógeno gas, respectivamente). Para que se produzca el proceso de desnitrificación (Ecuación 1.33) debe haber ausencia de oxígeno libre, pero no de nitratos, denominándose medio anóxico.



Debido al lento metabolismo de las bacterias metanogénicas, especialmente las responsables de la degradación de los ácidos propiónico y acético, la metanogénesis es el paso que limita la velocidad del proceso completo. Este factor se traduce en unos tiempos de degradación mayores que los requeridos en las unidades de tratamiento aeróbico (Metcalf y Eddy, 1985). Adicionalmente, la biodegradación anaerobia debe ser desarrollada en reactores completamente cerrados con control de temperatura. Los microorganismos anaeróbicos son además más sensibles a la temperatura y el pH que los aeróbicos. El intervalo óptimo de temperaturas está entre 30-38°C y 49-57°C para condiciones mesófilas y termófilas, respectivamente (Metcalf y Eddy, 1985). Respecto al pH, merece la pena

notar que si se generan altas concentraciones de ácidos grasos volátiles, los microorganismos metanogénicos pueden ser inhibidos (Stephenson y Blackburn, 1998).

El tratamiento anaeróbico tiene la ventaja de una menor demanda de energía (se omite la aireación) y una menor producción de fango comparada con el tratamiento aeróbico (O'Neill y cols., 2000). Además, se puede operar con cargas orgánicas superiores que en los aerobios, ya que los últimos están limitados por la velocidad de transferencia de oxígeno. El fango resultante es también estabilizado y depositado al vertedero o aplicado en agricultura. Finalmente, es una ventaja añadida la producción de metano, que puede ser posteriormente reutilizado para obtención de energía térmica o mecánica requerida en los procesos anaeróbicos.

Sin embargo, son necesarios mayores tiempos de residencia, y por tanto los costes de inversión correspondientes al tamaño del biorreactor serán superiores. Además, son necesarias temperaturas más altas para asegurar velocidades razonables, lo que implica el precalentamiento de la alimentación o el calentamiento del reactor anaerobio. Asimismo, la sedimentación de la biomasa anaerobia es más difícil que la decantación de la biomasa en el proceso de lodos activos, por tanto, los costes de inversión para la clarificación son superiores. Además produce malos olores (principalmente de H₂S y RSH).

1.5.2.3. Sistemas de crecimiento

Sistemas de crecimiento en suspensión

En el tratamiento de aguas residuales los sistemas de crecimiento en suspensión mantienen la biomasa en suspensión creciendo como flóculos de microorganismos. Generalmente, algún tipo de mezclador es usado para asegurar un contacto continuo con el sustrato. Una vez que la biodegradación concluye, los flóculos de biomasa son eliminados por clarificación.

Este tipo de sistemas consiste principalmente en reactores en continuo o discontinuo. Los procesos de fangos activos aeróbicos que operan en modo continuo son los más usuales en el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas. Consisten en la introducción del agua residual en un tanque aireado mezclado conteniendo un cultivo en suspensión. Una vez que la degradación se lleva a cabo la biomasa es separada en un tanque clarificador. Entonces, una parte de esta biomasa es reciclada y revierte al proceso y otra parte es desechada periódicamente.

Por otro lado, el modo en discontinuo es el más simple y antiguo para sistemas de crecimiento en suspensión. Una versión comúnmente usada es la llamada reactor discontinuo secuencial (SBR, siglas en inglés de sequencing batch reactor), introducido por Irvine en 1971, y aplicado satisfactoriamente en la biodegradación de aguas residuales industriales y municipales (Mace y Mata-Álvarez, 2002; Dosta y cols., 2007; Tian-Ming y cols., 2007).

El SBR lleva a cabo el tratamiento biológico completo en un único reactor (sin clarificador independiente) mediante una sucesión controlada en el tiempo compuesta de cinco ciclos (Figura 1.5) en forma secuencial: llenado, reacción, sedimentación (clarificación), extracción (vaciado por decantación) y fase inactiva.

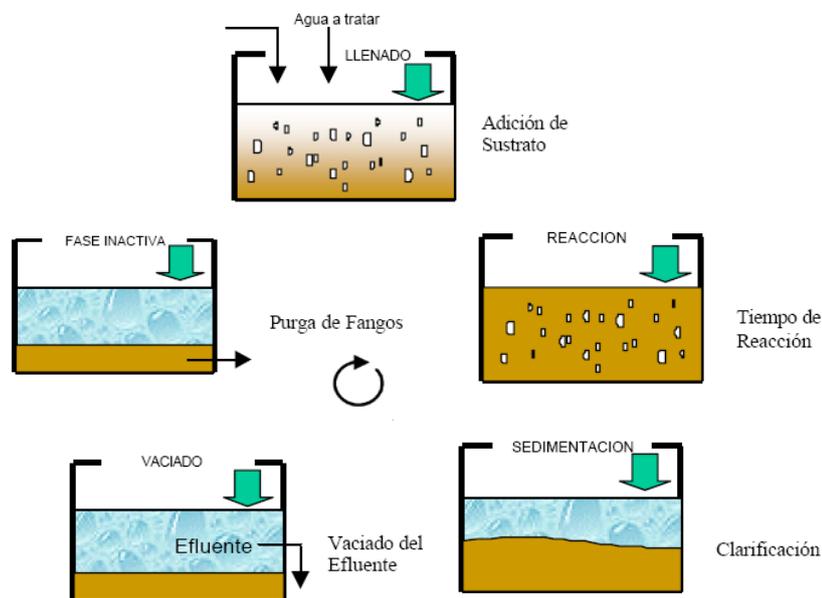


Figura 1.5. Esquema del un reactor biológico secuencial (SBR) durante un ciclo de operación.

El agua residual entra en el reactor durante la fase de llenado (que lleva aproximadamente el 25% de la duración total del ciclo), iniciándose la biodegradación que se completa en la fase de reacción por iniciación del mezclado y/o aireación. Esta etapa puede tener lugar bajo condiciones forzadas de aireación que permiten la actividad aeróbica, o sin aireación forzada dando lugar a posibles reacciones anóxicas y anaeróbicas, ocupando el 35% de la duración total del ciclo. En la sedimentación se separa la biomasa del agua tratada consiguiendo un sobrenadante clarificado como efluente. El tiempo dedicado a la extracción (retirada del sobrenadante formado durante la sedimentación) puede variar entre el 20% y el 50% de la duración total del ciclo (entre 15 minutos y 2 horas), siendo 45 minutos la duración típica. Finalmente, existe una fase inactiva, cuyo

objetivo es permitir que un reactor termine su fase de llenado antes de conectar otra unidad (en un sistema de múltiples tanques). El exceso de fango es desechado durante la fase de sedimentación o fase inactiva, aunque puede llevarse a cabo durante cualquier fase, dependiendo del modo de operación. La purga del lodo es otro paso importante en el funcionamiento de los SBR que afecta, de manera importante, a su rendimiento.

En comparación con el proceso convencional de fangos activos, la tecnología SBR incorpora varias ventajas principalmente debido a su simplicidad, flexibilidad de operación (incluso proporcionando la capacidad de influir en la comunidad microbiana) y coste (EPA, 1999; Mace y Mata-Álvarez, 2002). Asimismo, están especialmente diseñados para el tratamiento de aguas residuales con carga baja o intermitente (EPA, 1999).

Sistemas de crecimiento inmovilizados

El crecimiento inmovilizado consiste en un sistema en el que los microorganismos se unen por sí mismos dentro o sobre un soporte sólido inerte que rellena el reactor en forma de soportes. Una vez terminada la biodegradación, el agua residual tratada es retirada mientras que la biomasa permanece fijada al soporte.

Los tipos más habituales de biorreactores inmovilizados consisten en un lecho fijo o un lecho fluidizado (Metcalf y Eddy, 1985). En el reactor tipo lecho fijo los soportes (de piedra, plástico, etc.) se localizan en un sitio fijo y no se mueven con el agua residual que pasa a través de los soportes creando un contacto con la biomasa adherida. Sin embargo, en el reactor de lecho fluidizado los soportes son suspendidos por el flujo de agua residual ascendente. En esta configuración han sido usadas partículas pequeñas, como arena, carbón activo, lechos de cambiadores iónicos y óxidos metálicos.

Los reactores inmovilizados de lecho fijo poseen diversas ventajas como la mayor diversidad microbiana y un mayor espectro de actividades bioquímicas, el incremento del tiempo de vida de las células, una mayor cantidad de biomasa por volumen de biorreactor (haciendo posible el uso de reactores de menor tamaño que en sistemas suspendidos), una mayor velocidad de degradación, la facilidad de operación (no es necesaria la clarificación), la prevención del lavado de biomasa y la resistencia a cargas más tóxicas ya que existe una mayor actividad biológica en la superficie. Algunas de sus desventajas son la dificultad de transferencia de materia (principalmente oxígeno) y la mayor demanda de energía asociada con la aireación (aunque ésta también es usada en la mayoría de los sistemas en suspensión).

1.6. Acoplamiento de PPOA con degradación biológica para el tratamiento de aguas contaminadas.

El tratamiento de contaminantes orgánicos de un modo medioambientalmente aceptable y a un coste razonable es una cuestión de gran importancia en los países desarrollados. Existe la duda de si los procesos biológicos continuarán siendo empleados como un proceso de tratamiento básico para la mayoría de aguas residuales ya que no siempre se obtienen resultados satisfactorios, especialmente cuando se aplican al tratamiento de aguas residuales industriales, porque muchas sustancias orgánicas producidas por las industrias son inhibitorias, tóxicas o resistentes al tratamiento biológico. Por consiguiente, como se describe en el apartado 1.4.6.2, los procesos de oxidación avanzada pueden ser una alternativa.

Los PPOA pueden usarse para la mineralización completa de todos los contaminantes presentes hasta anhídrido carbónico, agua y sales minerales o para la eliminación parcial hasta la conversión del contaminante en compuestos más oxidados. En general, si se pretende realizar la mineralización completa, el POA podría suponer un coste muy elevado (Esplugas y Ollis, 1997). Una alternativa muy atractiva para completar la oxidación es el uso de un pretratamiento utilizando un POA (Gogate y Pandit, 2004a), de modo que el contaminante orgánico, inicialmente recalcitrante, se convierta en una serie de intermedios biodegradables que, seguidamente, pueden ser degradados en un proceso biológico porque ya no serían inhibitorias o tóxicas.

Por ejemplo, macromoléculas orgánicas como polímeros solubles pueden ser demasiado grandes para permeabilizar a través de las paredes celulares y producir una oxidación biológica efectiva. Un POA podría romper estas moléculas en intermedios más pequeños (ej. ácidos orgánicos de cadena corta) que lograrían introducirse en las células y ser más biodegradables que las moléculas originales, ya que, generalmente, se acepta que la biodegradabilidad se incrementa al decrecer el tamaño molecular. Por el contrario, la oxidación química total de estos intermedios más simples a anhídrido carbónico y agua puede ser difícil y requerir condiciones oxidantes severas, ya que la velocidad de escisión del enlace C-C disminuye al reducirse el tamaño molecular. Reuniendo estas dos observaciones separadas, en un sentido cualitativo, el concepto de un acoplamiento de los procesos químico y biológico se puede ilustrar esquemáticamente (Figura 1.6). En la Figura 1.6 se puede observar que existe un punto más allá del cual el tratamiento biológico es más atractivo que la oxidación química en términos de velocidad (Mantzavinos y Psillakis, 2004).

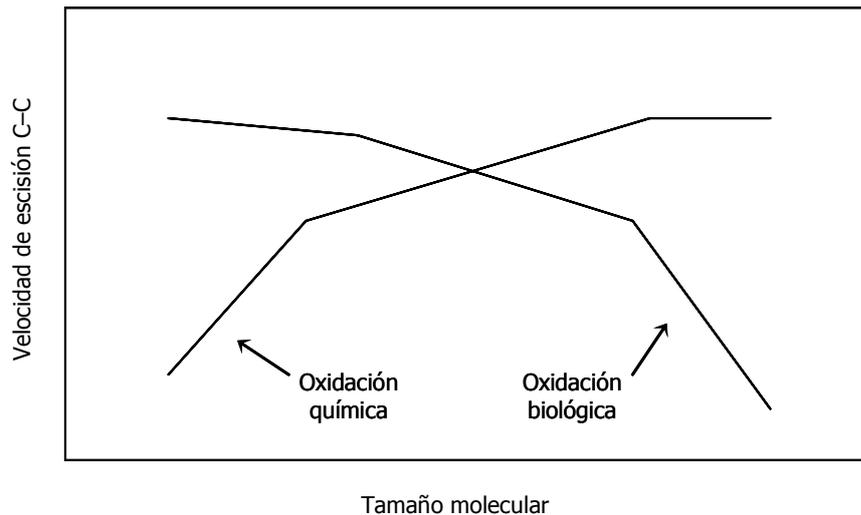


Figura 1.6. Combinación de tratamiento químico y biológico.

La combinación de la oxidación química y biológica puede llevarse a cabo en los siguientes casos (Ollis, 2001):

- La corriente de alimentación es biorrecalcitrante o no biodegradable totalmente por enzimas intracelulares. La oxidación parcial debe incrementar la biodegradabilidad por formación de especies de menor tamaño más oxidadas que se parezcan a intermedios naturales de las rutas metabólicas.
- La corriente de alimentación es inhibitoria para el cultivo biológico. La oxidación destruye el compuesto inhibitorio y normalmente se obtienen efluentes tratados con mucha menor toxicidad.
- El contaminante es insoluble. Weng y cols., (1999) publicaron que el compuesto insoluble benzo [a] pireno podía ser tratado parcialmente con ozono dando lugar a compuestos más solubles, que eran más tarde procesados para reducir el peso molecular, abrir los anillos y producir sustancias biodegradables.
- Si el contaminante es soluble pero es un polímero de peso molecular suficiente para impedir su consumo por medio de un cultivo biológico. Por ejemplo, la degradación del compuesto no biodegradable polietilenglicol (peso molecular=10000) mediante oxidación húmeda produce un efluente biodegradable (Mantzavinos y cols., 1999).

En la Figura 1.7 se presenta un posible esquema estratégico, modificado del propuesto por Sarria y cols. (2002), que se puede seguir para el tratamiento de un agua

residual. Como se ilustra en dicha figura, las aguas biodegradables y no tóxicas pueden ser directamente tratadas por degradación biológica. Por otra parte, cuando son aguas completamente biorrefractarias el POA se realiza en un primer paso (evitando la completa mineralización) para, estrictamente, aumentar la biodegradabilidad y generar una nueva disolución capaz de ser tratada posteriormente en la planta biológica.

Si las aguas son parcialmente biocompatibles hay dos posibles alternativas: puede someterse primeramente al tratamiento biológico (para eliminar la fracción biodegradable) y entonces conducirlos al POA para rebajar el carbono orgánico refractario restante; o puede tratarse químicamente antes del biotratamiento (análogamente al no biodegradable). Dependiendo de las características del agua residual será preferible una u otra opción, ya que algunas sustancias pueden ser acumuladas e inhibir el crecimiento de los microorganismos, requiriendo una oxidación química previa.

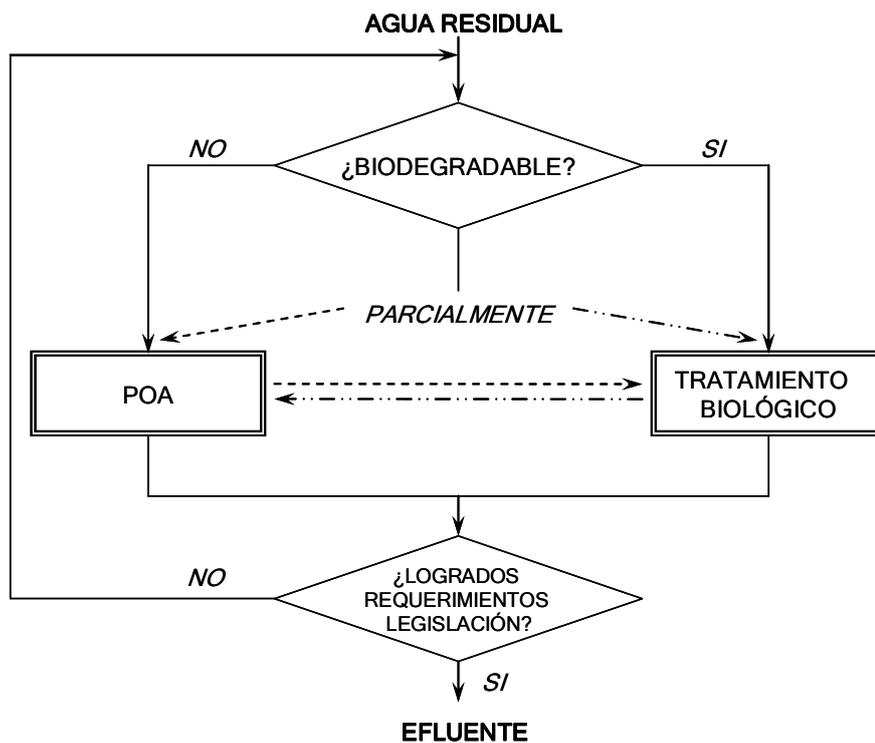


Figura 1.7. Estrategia para el tratamiento de aguas residuales.

1.6.1. Aspectos prácticos en la combinación POA-Biológico

1.6.1.1. Eliminación del oxidante químico

En la combinación de ambos procesos es importante que el oxidante químico y el cultivo biológico no se mezclen por lo que, si es posible, el oxidante químico debe ser eliminado completamente en el pretratamiento (Gogate y Pandit; 2004b). Por ejemplo, altas concentraciones de peróxido de hidrógeno pueden producir una inhibición del cultivo aunque concentraciones relativamente bajas (menores de 10 mg L^{-1}) no suponen un problema serio para el microorganismo. En muchos trabajos experimentales (Lapertot y cols., 2006; Oller y cols., 2007a) el exceso de peróxido de hidrógeno es retirado con la enzima catalasa, (1U destruye $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 a $\text{pH} = 7.0$ y $T = 25^\circ\text{C}$) o con sulfito sódico (Adams y cols., 1994). En todo caso, estos procedimientos pueden ser útiles para experimentación a escala de laboratorio, pero en aplicaciones industriales lo más conveniente es adaptar la dosis de oxidante a la estrictamente necesaria para conseguir el tratamiento deseado. De esta forma al final del POA el oxidante habrá sido completamente consumido y no entrará en contacto con la biomasa (Sarria y cols., 2003b; Oller y cols., 2007b). En otros tipos de PPOA, como por ejemplo los que usan ozono, también es necesario controlar los niveles de éste ya que el ozono se usa como desinfectante y podría afectar al cultivo si quedan cantidades remanentes del pretratamiento.

1.6.1.2. Ajuste del pH

Como se ha comentado anteriormente, el pH es uno de los factores cruciales para la velocidad de degradación en algunos procesos fotocatalíticos. Así, el pH utilizado para foto-Fenton está en torno a 2.8 (necesario para evitar la precipitación de hidróxidos de hierro). A este pH la mayoría de los microorganismos son incapaces de crecer y/o degradar compuestos. Por tanto, para el acoplamiento del POA-tratamiento biológico es necesario ajustar el pH hasta valores próximos a $\text{pH} = 7$ (Oller y cols., 2007c).

1.6.1.3. Efecto del tiempo de reacción

El tiempo de reacción de un POA determina el coste del proceso cuando se pretende acoplar posteriormente con una oxidación biológica. Además, tiempos largos producen un exceso de oxidación química y generan intermedios altamente oxidados con poco valor metabólico para los microorganismos, con la consiguiente pérdida de eficiencia en el sistema (Scott y Ollis, 1995).

Adams y cols., (1994) estudiaron la oxidación de 1,4-dioxano usando peróxido de hidrógeno y ozono, y determinaron que el acoplamiento con un tratamiento biológico era efectivo cuando se eliminaba por completo el contaminante, coincidiendo este momento con el mayor nivel de DBO en el efluente del tratamiento químico. Sin embargo, una mayor oxidación química únicamente servía para reducir la DBO residual. Asimismo, Takahashi y cols., (1994) encontraron un tiempo óptimo de oxidación para la ozonización de nitrofenoles y dos colorantes sintéticos. Dicha ozonización generaba sustancias más biodegradables pero después de una dosis mayor de ozono decrecía la relación DBO₅/COD del efluente.

Sin embargo, tiempos cortos de oxidación química pueden dar lugar a la formación de intermedios más tóxicos que el contaminante a tratar. Así, en la oxidación parcial con peróxido de hidrógeno de 2,4-diclorofenol el efluente presenta una mayor toxicidad que decrece cuando se aplica un mayor tiempo de tratamiento (Bowers y cols., 1989).

1.6.1.4. Aclimatación del cultivo biológico

Un punto interesante asociado a los experimentos de biodegradación es si los microorganismos deben aclimatarse o no para maximizar la eficiencia de degradación. Contreras y cols. (2003) encontraron que la biodegradación con fangos activos no aclimatados de 2,4-diclorofenol previamente tratado con ozono era más eficiente que si el fango era adaptado a fenol (intermedio primario en la ozonización). Esto implica que un cultivo no aclimatado puede degradar un mayor número de especies intermedias. Además, si se usa aclimatación debe decidirse si se aclimata el cultivo al efluente original, a los intermedios de oxidación química o a ambos. Rivas y cols. (2001) encontraron que la biodegradación del efluente del tratamiento mediante oxidación húmeda de alpechín con biomasa adaptada a los intermedios de oxidación, era más rápida que con biomasa adaptada al efluente original. Sin embargo, en muchos estudios se demuestra que la adaptación de los cultivos al efluente original hace que la biodegradación sea más efectiva (Zhuang y cols., 2005; Wang y cols., 2007).

1.6.2. Medida de la biodegradabilidad como estudio del efecto del pretratamiento químico

1.6.2.1. Parámetros totales

El parámetro más comúnmente usado para describir la actuación del pretratamiento con oxidación química es la reducción del COD (carbono orgánico disuelto) y la DQO (demanda química de oxígeno). El COD es proporcional a la concentración de compuestos orgánicos en el agua, está limitado a describir la oxidación total y permanece invariable cuando no existe oxidación o es muy pequeña. Por otro lado, los datos de DQO por si mismos no pueden diferenciar entre oxidación parcial y total, ya que ambas reacciones contribuyen a decrecer su valor. Por tanto, COD y DQO si se usan de manera aislada dan una visión poco útil con respecto a la oxidación parcial.

Una vía para obtener información sobre la oxidación parcial es combinar los datos de COD y DQO, propuesta por Scott y Ollis (1995) y definida como el estado de oxidación promedio, EOP (Ecuación 1.34):

$$EOP = \frac{4 \times (COD - DQO)}{COD} \quad \text{Ec. 1.34}$$

donde COD tiene unidades de moles de carbono por litro y DQO se expresa en moles de oxígeno por litro. El estado de oxidación promedio tiene valores de entre -4 (ej. CH_4) y $+4$ (ej. CO_2) en el que altos valores indican un elevado estado de oxidación de los compuestos orgánicos en el agua. La principal desventaja asociada al uso de este parámetro es que no puede indicar cuánta oxidación parcial o total ha tenido lugar desde el comienzo de la reacción, aunque si indica que la reacción está generando sustancias con estados de oxidación más elevados. Por ejemplo, cuando EOP es estable pero se observa descenso de COD significa que el POA está mineralizando (hasta CO_2) los compuestos orgánicos (lo que no suele ser rentable si se quiere combinar con un tratamiento biológico). De la misma forma, si se observa un ascenso de EOP asociado a un valor de COD estable, significa que el POA está degradando los compuestos orgánicos a otros más oxidados, pero no convirtiéndolos en CO_2 , lo que es deseable si se pretende combinar con un tratamiento biológico.

El efecto del pretratamiento químico en las propiedades del efluente se mide normalmente por medio de:

- test de biodegradabilidad,
- test de toxicidad,
- estudios integrados donde el efluente parcialmente tratado es alimentado a un postratamiento biológico y
- combinación de los anteriores.

El test estándar de la DBO se ha utilizado comúnmente como una medida de la biodegradabilidad aeróbica (Scott y Ollis, 1997). Cambios en la biodegradabilidad se evalúan midiendo las relaciones DBO_x/DQO y/o DBO_x/COD y comparando sus valores en las muestras tratadas con los de los efluentes originales (Mantzavinos y Psillakis, 2004). Estas relaciones dan un índice de la proporción de materia orgánica presente que es aeróbicamente degradable dentro de un cierto periodo de tiempo (ej. 5 días en la DBO_5). Las limitaciones del test de la DBO surgen principalmente del hecho de que la velocidad de biodegradación varía con la concentración. Así, los resultados de la DBO deben interpretarse con precaución y no deben compararse con datos de otras fuentes. Además, las relaciones DBO_x/DQO (o DBO_x/COD) por si solas pueden conducir a error a menos que también se den los valores de DBO individuales. Esto es debido a que, en muchos casos, durante el pretratamiento químico ocurre una reducción sustancial de la DQO (o del COD), produciendo un aumento de las relaciones no vinculado a un incremento en la DBO_x . La biodegradabilidad aerobia también puede ser evaluada por medio del uso del test de Zahn-Wellens (Zahn y Wellens, 1974; Rodríguez y cols., 2002; Oller y cols., 2007c), aunque suele ser lento (28 días).

Mediante el ensayo de Zahn-Wellens es posible evaluar el potencial de la biodegradabilidad final de sustancias orgánicas no volátiles y solubles en agua cuando se exponen a una concentración relativamente alta de microorganismos (fangos activos). Dicho método se aplica a concentraciones de sustancias que correspondan a valores de COD en el intervalo de 50 a 400 $mg L^{-1}$ o de DQO entre 100 y 1000 $mg L^{-1}$. Estas altas concentraciones permiten obtener resultados analíticos fiables. El uso paralelo de un sistema analítico específico (como HPLC-UV), hace posible la evaluación de la biodegradabilidad inicial de la sustancia (desaparición de la estructura del compuesto original).

En este ensayo las muestras acuosas deben tener un pH entre 6.5 y 7.5. A continuación, se mezclan con medio mineral y fangos activos (Directiva 88/303/EEC) y se agita y se airea durante un período de 28 días, manteniéndose las muestras a 20-25°C en la oscuridad o bajo luz difusa. En paralelo se preparan un blanco que sólo contiene fangos

activos y medio mineral en agua destilada y un control compuesto por una concentración representativa de dietilenglicol (dependiendo de los valores de COD de las muestras), que es una sustancia completamente biodegradable. Este control sirve para comprobar que los fangos activados están en buen estado y son capaces de degradar ese compuesto rápidamente.

La degradación biológica se sigue mediante la medición del COD a diversos intervalos de tiempo. La primera medida de COD se realiza siempre después de 3.5 h de haber iniciado el ensayo para poder detectar la posible adsorción de las sustancias químicas sobre los fangos activados. La razón del COD después de cada intervalo de tiempo con respecto al valor tomado 3.5 h después del comienzo del ensayo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradabilidad (Ecuación 1.35).

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right) \times 100 \quad \text{Ec 1.35}$$

donde D_t es el porcentaje de biodegradabilidad medido en el intervalo de tiempo t , C_t es el COD a tiempo t , C_B es el COD en el blanco a tiempo t , C_A es el COD medido después de 3.5 h desde el comienzo del ensayo y C_{BA} es el COD del blanco medido después de 3.5 h. Todos los datos de concentración de COD se expresan en mg L^{-1} .

Los resultados de los ensayos de Zahn-Wellens pueden ser usados para predecir la biodegradabilidad en una EDAR siempre y cuando el 70% de biodegradabilidad se alcance en 7 días y la fase de adaptación no sea superior a 3 días. Además, si se elimina al menos el 70% del COD procedente del dietilenglicol en menos de 14 días, se demuestra que la actividad de los fangos activados es la correcta, con lo que se puede asegurar la buena calidad del ensayo. Cualquier otro resultado procedente de aguas no biodegradables pre-tratadas mediante un método de oxidación química debe interpretarse caso por caso. Muy a menudo estas aguas precisan de un periodo de adaptación de más de 3 días, otras veces el 70% de biodegradabilidad se alcanza más lentamente, etc.

La toxicidad aguda de muestras provenientes de los tratamientos de oxidación química se ha medido en numerosos estudios (Fernández-Alba y cols., 2001; Hernando y cols., 2005; Hernando y cols., 2007; Pérez-Estrada y cols., 2007). Para ello, se exponen las muestras a microorganismos acuáticos como *Daphnia magna* y *Selenastrum capricornutum* y microorganismos marinos como *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* y *Artemia salina* y los efectos tóxicos de la muestra se determinan mediante la medida de diferentes

parámetros intrínsecos a cada método (movilidad, crecimiento, emisión de luz, etc.). El parámetro de toxicidad más utilizado es el EC_{50} , que es la concentración efectiva de agente tóxico que produce un efecto desfavorable y medible en el 50 % de los microorganismos después de un tiempo de exposición (habitualmente 24 o 48 horas) de éstos al agente tóxico. Otro método para medir toxicidad es la determinación de la inhibición de la respiración de fangos activos con el que también se determina EC_{50} , concentración específica de muestra que provoca una inhibición del 50% en la respiración de los fangos activos (Arqués y cols., 2007a; Vicente Candela, 2007; Santos-Juanes y cols., 2008).

Los niveles de toxicidad durante el pretratamiento químico están fuertemente influenciados por las condiciones de tratamiento. En muchos casos, la toxicidad del efluente original se incrementa fuertemente y alcanza un máximo durante las primeras etapas del pretratamiento presuntamente debido a la formación de intermedios tóxicos. Parra y cols. (2002) encontraron que la toxicidad aumentaba al comienzo del tratamiento del pesticida isoproturon, debido a que los intermedios formados eran más tóxicos que el pesticida a tratar, pero después de dos horas de fototratamiento la toxicidad de la disolución disminuía bruscamente. Un ejemplo paradigmático es la oxidación de fenol, que produce hidroquinona durante los primeros pasos de la oxidación y que es tres órdenes de magnitud más tóxica que el propio fenol (Santos y cols., 2004).

A tiempos de tratamiento mayores, la toxicidad suele decrecer. Es importante destacar que un incremento en la toxicidad no está necesariamente acompañado de un descenso en la biodegradabilidad. De la misma forma, un descenso en la toxicidad no siempre viene acompañado de un aumento en la biodegradabilidad. Wang y cols. (2003) estudiaron que la ozonización de muestras con tinte Remazol Black tratadas durante 150 minutos eran más biodegradables (en términos de incremento de DBO_5 y DBO_{28}) pero más tóxicas para *Vibrio fischeri* que en el efluente original. Por tanto, la medida de toxicidad puede ayudar a determinar a menudo que el efluente está alcanzando niveles más adecuados de biocompatibilidad, pero no es determinante para conocer la biodegradabilidad, que debe evaluarse mediante métodos específicos. Sin embargo, la rapidez de las medidas de toxicidad comparada con las determinaciones de biodegradabilidad las hace a menudo útiles para seguir la evolución de un POA.

Aunque los ensayos de biodegradabilidad y toxicidad facilitan una información muy útil con respecto al efecto del pretratamiento químico, a menudo son necesarios ensayos que integren degradación química y biológica para obtener una valoración adicional más realista del proceso combinado. En la mayoría de los casos, es conveniente realizar un

tratamiento mediante degradación aerobia con fangos activos tomados de una EDAR (Hörsch y cols., 2003; Chen y cols., 2007b; Essam y cols., 2007; Oller y cols., 2007a; Lapertot y cols., 2007).

1.6.2.2. Medidas cinéticas

Algunos estudios también explican la biodegradabilidad en forma de medidas cinéticas, de modo que se obtiene una información más cuantitativa que con los parámetros globales y puede ser usada en el diseño de reactores biológicos y para predecir el desarrollo del proceso (Scott y Ollis, 1995). La mayoría de estos estudios se basan en que la eliminación del sustrato sigue una cinética de Monod o cinéticas con modelos inhibitorios (Scott y Ollis, 1996).

El parámetro global DQO ha sido usado tradicionalmente para describir la carga orgánica de las aguas residuales (Henze y cols., 1995) debido a que la composición de las aguas residuales industriales está habitualmente poco caracterizada y la carga orgánica varía considerablemente. Por tanto, en la ecuación cinética la concentración de sustrato S puede ser sustituida por la medida de DQO (o COD). Igualmente, el proceso biológico en un fango activado es realizado por un grupo muy diverso de microorganismos y la biomasa es usualmente expresada en SVS, sólidos volátiles en suspensión (Eckenfelder y Musterman, 1995). Introduciendo estos parámetros globales la velocidad de consumo de sustrato (r) puede ser expresada según la Ecuación 1.36:

$$r = \left(\frac{-1}{SVS} \right) \frac{dDQO}{dt} = r_{\max} \left(\frac{DQO}{K_S + DQO} \right) \quad \text{Ec 1.36}$$

donde $r_{\max} = \mu_{\max}/Y_{X/S}$ es la velocidad específica máxima de consumo de sustrato ($\text{mg O}_2 \text{ mg SVS}^{-1}$). Calculando K_S se puede predecir la afinidad del microorganismo por el sustrato como una medida de la biodegradación y se puede relacionar de forma cualitativa con el EC_{50} para dicho sustrato en un agua residual (Ledakowicz y cols., 2001). El modelo de Contois (Ecuación 1.37) también ha sido empleado para estudiar la biodegradabilidad (Beltrán y cols., 1999a; Beltrán-Heredia y cols., 2001), así como el modelo de Grau que se muestra en la Ecuación 1.38 (Lafi y Al-Qodah, 2006) donde K_2 y n son parámetros cinéticos del proceso de degradación y r es la velocidad específica de consumo de DQO, o modelos inhibitorios (Ecuación 1.39) como el de Andrews (Esplugas y Ollis, 1997).

$$r = r_{\max} \frac{DQO}{K_c X + DQO} \quad \text{Ec 1.37}$$

$$r = K_2 \left(\frac{DQO}{DQO_0} \right)^n \quad \text{Ec 1.38}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} COD}{K_s + COD + \frac{COD^2}{K_i}} \quad \text{Ec 1.39}$$

1.6.3. Eficiencia del proceso integrado

La medida de la efectividad de un proceso depende de la meta fijada en el tratamiento. Una medida de la efectividad podría ser el grado de mineralización de todo el carbono orgánico si necesitan alcanzarse aguas de pureza alta o efluentes con determinados límites de COD. Otros tratamientos pueden considerar como objetivo principal la reducción total de la toxicidad o la eliminación específica de un componente principal.

El paso primario del proceso acoplado influye fuertemente en la efectividad del proceso secundario y, por tanto, en la eficiencia global. Así, comparar el porcentaje de tratamiento obtenido en cada uno de los pasos no es adecuado en todos los casos. Por ejemplo, el 95% de un efluente pretratado mediante un POA puede ser mineralizado en el proceso biológico, mientras que, sin pretratamiento la mineralización puede ser despreciable. El pretratamiento químico juega un papel importante en conseguir una alta mineralización global aunque la mayor mineralización pueda no ocurrir en este paso.

El método más simple para comparar la eficiencia de cada proceso (Scott y Ollis, 1995) es por medio de la relación del porcentaje del tratamiento logrado en el proceso individual respecto la eficiencia del proceso global (Ecuaciones 1.40-1.42), donde Z es la eficiencia total del proceso combinado.

$$X = \% \text{ tratamiento paso químico} / 100\% \text{ tratamiento global} \quad \text{Ec 1.40}$$

$$Y = \% \text{ tratamiento paso biológico} / 100\% \text{ tratamiento global} \quad \text{Ec 1.41}$$

$$Z = X + Y \quad \text{Ec 1.42}$$

Un segundo método compara la eficiencia del proceso combinado con la eficiencia que debería lograrse si se usara cada proceso de forma individual. Esta relación proporciona una medida del sinergismo cuando se combinan ambos procesos. En

consecuencia, se puede describir la eficiencia con el indicador “++”, si se produce un gran incremento en la eficiencia global al combinarse ambos procesos, “+” si el incremento es modesto, “0” si es despreciable o “-” si produce un efecto decreciente o adverso (Scott y Ollis, 1995).

Esplugas y Ollis (1997) representaron los términos de eficiencia para cada proceso (Ecuaciones 1.43 y 1.44).

$$\eta_Q = \frac{C_{A0} - (C_{AQ} + C_{SQ})}{C_{A0}} \quad \text{Ec 1.43}$$

$$\eta_B = \frac{(C_{SQ} - C_{SB})}{C_{A0}} \quad \text{Ec 1.44}$$

donde los subíndices Q y B representan la concentración de efluente del proceso químico y biológico respectivamente, A es el contaminante primario, S es el intermedio químico (y sustrato biológico) y el subíndice 0 indica la entrada en el reactor químico. La suma de las Ecuaciones 1.43 y 1.44 define la eficiencia de mineralización del proceso integrado (Ecuación 1.45).

$$\eta_G = \eta_Q + \eta_B = \frac{C_{A0} - C_{SB} - C_{AQ}}{C_{A0}} \quad \text{Ec 1.45}$$

1.6.4. Aplicaciones

Un amplio número de estudios han revelado el potencial de estos sistemas acoplados para tratar diferentes compuestos modelo y aguas residuales reales provenientes de diversos orígenes. Algunos ejemplos son aguas contaminadas con sustrancias provenientes de la industria farmacéutica (Oller y cols., 2007c), alpechín (Benítez y cols., 1999; Beltrán-Heredia, 2001), efluentes de la industria textil (Ledakowicz y cols., 2001; García-Montaño y cols., 2008), efluentes de la industria de la nitrocelulosa (Barreto-Rodrigues y cols., 2008), plaguicidas (Parra y cols., 2000; Oller y cols., 2007a) y otros contaminantes como por ejemplo TNT (Hess y cols., 1998), ácido *p*-nitro-*o*-toluensulfónico (Pulgarín y cols., 1999), AMBI (Sarria y cols., 2001), etc.

La elección de la combinación química y biológica apropiada depende de las características del agua a tratar y del objetivo del tratamiento (Scott y Ollis, 1995). El

proceso biológico puede incluir microorganismos aislados, como la bacteria *P. putida* (Tabla 1.5) o mezclas de microorganismos, siendo entonces los más empleados los fangos activos (Tabla 1.5) y localizados de forma fija (en soportes) o suspendidos en el medio.

Existen múltiples estrategias de combinación; ozono-tratamiento aeróbico (Beltrán y cols., 1999a; Benítez y cols., 1999; Beltrán-Heredia y cols., 2001), ultrasonidos-tratamiento biológico (Gonze y cols., 1999; Entezari y Pétrier, 2003; Gonze y cols., 2003); oxidación electroquímica-tratamiento biológico (Chiang y cols., 1997; Torres y cols., 2003) fotocatalisis con TiO_2 -tratamiento aeróbico (Parra y cols., 2000; Sarria y cols., 2002; Parra y cols., 2002), etc. El presente trabajo se centra en el empleo de foto-Fenton seguido de un tratamiento biológico con un microorganismo modelo (*P. putida*) y con mezclas de microorganismos (fangos activos). Existen trabajos previos de acoplamiento de tratamiento mediante foto-Fenton-fango activo (Tabla 1.5.), sin embargo la mayoría de estudios realizados con *P. putida* han sido combinados con ozono (Tabla 1.5.).

Tabla 1.5. Ejemplos de acoplamiento oxidación química-biológica llevados a cabo con *P. putida* y hongos activos.

| Referencia | Efluente | Concentración | Oxidación química | Oxidación biológica | Medida biodegradabilidad | Orden esquema | Efecto |
|----------------------------|--|--|--|--|--|---------------|--------|
| Suzuki y cols., 1976 | Polietilenglicol (PM=8000) | Disolución 2% | Ozono (pH 12) y H ₂ O ₂ | <i>P. aeruginosa</i> PEG-K | Consumo de oxígeno y medidas de crecimiento | Q→B | + |
| Kearney y cols., 1983 | Trinitrotolueno | 1 y 10 mg L ⁻¹ | UV/ozono | <i>P. putida</i> | Evolución del ¹⁴ CO ₂ | Q→B | + |
| Baxter y Sutherland, 1984 | 2,4-diclorobifenil | 0.1-1 mg/50 mL suspensión bacterias | Irradiación luz solar artificial | <i>P. putida</i> aislada de un fango activo | Degradación de compuestos intermedios y primarios | B→Q | + |
| Kearney y cols., 1988 | Atrazina | 33 y 100 mg L ⁻¹ | Ozono (pH 6.5, 8, 10) | <i>Pseudomonas</i> sp. A, <i>Pseudomonas</i> sp. D | Evolución del ¹⁴ CO ₂ | Q→B | + |
| Lee y Carberry, 1992 | Pentaclorofenol | 10 ⁻³ mol L ⁻¹ | Reactivo Fenton o H ₂ O ₂ | Microorganismos (<i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i>) y fango activo | Consumo oxígeno, constantes cinéticas, degradación de compuesto primario, eliminación de DQO | Q→B | + |
| Stowell y cols., 1992 | 2-clorofenol | 1.43·10 ⁻³ mol L ⁻¹ | Ozono | <i>P. putida</i> | Degradación de compuesto primario e intermedios, eliminación COD | Q→B | + |
| Parra y cols., 2000 | Metobromuron e isoproturon | 0.93 y 0.21 mmol L ⁻¹ | UV/TiO ₂ , UV/TiO ₂ /H ₂ O ₂ , Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ , UV/Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ | Fango activo | Zahn-Wellens | Q→B | ++ |
| Park y cols., 2001 | DMSO | 800 mg L ⁻¹ | Fenton | Fango activo | DBO/DQO | Q→B | 0 |
| Sarria y cols., 2001 | AMBI | 0.57-0.91 mg L ⁻¹ | H ₂ O ₂ /hv, TiO ₂ /H ₂ O ₂ /hv, Fe ³⁺ /hv, Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ , Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ /hv, Foto-Fenton solar | Fango activo | Zahn-Wellens, DBO ₅ , COD | Q→B | + |
| Sarria y cols., 2002 | p-NTS, MB, IP, AMBI | 1 g L ⁻¹ , 50 mg L ⁻¹ , 30 mg L ⁻¹ , 2 mmol L ⁻¹ | Foto-Fenton, Fe ³⁺ /UV, TiO ₂ | Fango activo | Zahn-Wellens, DBO ₅ , COD | Q→B | ++ |
| Contreras y cols., 2003 | 2,4-diclorofenol | 100 mg L ⁻¹ | Ozono | Fango activo | DBO/DQO | Q→B | + |
| Sarria y cols., 2003a | AMBI | 1 mmol L ⁻¹ | Foto-Fenton | Fango activo | Zahn-Wellens | Q→B | ++ |
| Dias-Machado y cols., 2006 | Agua residual con polifenoles | 660-780 m L ⁻¹ de ácido tánico | Reactivo Fenton | <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> y <i>Burkholderia</i> | DBO/DQO | Q→B | + / ++ |
| Sarria y cols., 2003b | 5-amino-6-metil-2-benzimidazolona (AMBI) | COD: 100-800 mg L ⁻¹ | Foto-Fenton | Fango activo | EOP | Q→B | ++ / + |
| Lapertot y cols., 2007 | Alaclor, atrazina, clorfenvinfos, diuron e isoproturon | 30 mg L ⁻¹ /cada plaguicida | Foto-Fenton | Fango activo | Zahn-Wellens | Q→B | ++ |
| Malato y cols., 2007a | Efluente industrial con α-metilfenilglicina | 500 mg L ⁻¹ | Foto-Fenton | Fango activo | Zahn-Wellens | Q→B | ++ |

OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL

2. OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL

2.1. Objetivos

El trabajo de investigación que se recoge en esta Memoria se enmarca dentro de los proyectos de investigación “Eliminación de contaminantes persistentes en efluentes acuosos mediante métodos integrados de oxidación avanzada (fotocatálisis solar) y oxidación biológica (PPQ2003-07596-C03-02)” que se realizó de diciembre de 2003 a noviembre de 2006 y “Desarrollo de sistemas acoplados de oxidación (fotocatálisis solar y oxidación biológica) para la depuración de efluentes acuosos contaminados con plaguicidas no biodegradables (CTQ2006-14743-C03-03/PPQ)” que se encuentra activo desde octubre de 2006 y finaliza en septiembre de 2009. Ambos proyectos se realizan en coordinación con la Escuela Politécnica Superior de Alcoy, Universidad Politécnica de Valencia y el Grupo de Detoxificación y Desinfección de Aguas de la Plataforma Solar de Almería-CIEMAT.

El objetivo de estos proyectos es demostrar la eficacia del uso combinado de los Procesos de Oxidación Avanzada (PPOA) y los tratamientos biológicos para la depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes. Los costes de operación de estos PPOA para la oxidación completa de compuestos orgánicos tóxicos son elevados (entre 1€ y 15€ por metro cúbico de agua, dependiendo de la concentración y resistencia a la oxidación de estos compuestos), si se comparan con los de los tratamientos biológicos. Por ello, se propone su uso como etapa de pretratamiento para aumentar la biodegradabilidad de las aguas contaminadas generando intermedios que el posterior sistema biológico sea capaz de degradar, con el fin de reducir los costes del tratamiento de estas aguas.

Se conocen ejemplos de combinación de procesos avanzados de oxidación y tratamientos biológicos, que sugieren grandes ventajas para la depuración de aguas. Sin embargo, existe un déficit de estudios que aborden una detallada caracterización cinética del proceso que permita un diseño adecuado del tratamiento. Asimismo, para reducir los costes de operación, es de suma importancia determinar el tiempo mínimo de tratamiento que genere un agua biodegradable y por tanto, tratable en un proceso biológico posterior.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio del efecto que la intensidad de la oxidación química tiene sobre la biodegradabilidad del agua tratada, así como sobre la cinética de la posterior depuración biológica. Para ello se ha seleccionado como POA el proceso foto-Fenton (fotocatálisis solar) y como microorganismo patrón de un tratamiento biológico *Pseudomonas putida*.

El tratamiento de foto-Fenton ha sido escogido dentro de los procesos de oxidación avanzada porque puede ser llevado a cabo utilizando radiación solar. Frente al tratamiento con UV/TiO₂ se ha demostrado que foto-Fenton es más efectivo por su mayor velocidad de reacción y porque la separación del catalizador no es siempre necesaria.

La bacteria *P. putida* es ampliamente conocida por su capacidad para degradar compuestos fenólicos como única fuente de carbono (de estructuras similares a los intermedios que provienen de los PPOA) y es una de las especies mayoritarias en los fangos activos de las depuradoras de aguas residuales. Además de esto y para validar los resultados obtenidos con el microorganismo patrón, se han utilizado también fangos activos de EDAR.

A continuación se detallan los objetivos específicos secuenciados en el desarrollo del Plan Experimental.

1. Estudiar la influencia del pH y de la temperatura en la cinética de la degradación biológica de cuatro compuestos (vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico) considerados como modelo de aquellos intermedios generados durante la oxidación mediante PPOA de contaminantes persistentes empleando la bacteria *P. putida*.
2. Determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con plaguicidas que permita realizar, posteriormente, una oxidación biológica. Para ello, se procede a un estudio cinético de la biodegradación mediante *P. putida* de los intermedios provenientes del tratamiento del plaguicida. Este estudio se ha llevado a cabo con dos plaguicidas, alaclor y pirimetanil, individualmente. Asimismo, se pretende determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de aguas contaminadas con una mezcla de plaguicidas comerciales (Laition, Metasystox, Sevnotol y Ultracid) para contrastar los resultados anteriores con un único plaguicida y ampliar su generalidad. Además, se realiza un estudio cinético con *P. putida* con el fin de determinar los cambios producidos en el metabolismo bacteriano por la presencia de los intermedios.
3. Acoplamiento fotocatalisis-biológico mediante fangos activos. Con la mezcla de plaguicidas anteriores, se comprobará que la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton seleccionada con *P. putida* es también la idónea para fangos activos de una EDAR en reactores tanque agitado operados en modo discontinuo secuencial. Finalmente, se determinará el efecto de la concentración inicial de COD en la selección del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton y en la eficiencia del proceso biológico en el

acoplamiento con fangos activos. Para ello se utilizará una segunda mezcla de cinco plaguicidas (Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala) con una concentración inicial de COD de 500 mg L⁻¹ y 200 mg L⁻¹.

2.2. Plan experimental

Para la consecución de los objetivos enumerados en el apartado anterior, ha sido necesario llevar a cabo el Plan Experimental que a continuación se detalla.

1. Biodegradación de intermedios modelo generados en los PPOA mediante *Pseudomonas putida* CECT 324

1.1. Estudio de la concentración mínima de intermedios modelo inhibitoria del crecimiento bacteriano

Para conocer qué concentración de los compuestos seleccionados (vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico) puede inhibir el crecimiento de la bacteria, se cultivó *P. putida* en matraces Erlenmeyer con 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹ de COD, manteniendo una relación molar 1:1:1:1 entre los cuatro sustratos.

1.2. Efecto del pH en la degradación de los intermedios modelo mediante *P. putida*

La neutralización es un paso imprescindible cuando se pretende acoplar un tratamiento mediante foto-Fenton, que se realiza a pH en torno a 2.8-2.9 con un tratamiento biológico. Para el caso de *P. putida* cabría esperar que el pH al que se debe ajustar el efluente tratado fotoquímicamente fuera en torno a 7 puesto que se considera un microorganismo neutrófilo. Sin embargo, resulta interesante la posibilidad de reducir los costes del proceso realizando un control del pH después del tratamiento mediante foto-Fenton a valores más bajos (con el consecuente ahorro de disolución básica) o incluso realizar el ajuste de pH al comienzo del biotratamiento y proseguir la biodegradación sin controlar el pH. Para ello, se ensayaron tres condiciones en reactor tanque agitado en modo discontinuo: i) controlando el pH a 7; ii) controlando el pH a 5; iii) sin control de pH; comenzando a pH 6. Para estos ensayos la temperatura escogida fue 30°C (referenciada en bibliografía como el óptimo para *P. putida*). En todos los casos la única fuente de carbono proviene de los compuestos seleccionados (vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico).

1.3. Efecto de la temperatura en la degradación de los intermedios modelo mediante *P. putida*

Para estudiar si variaciones en la temperatura pueden afectar al consumo de los intermedios, se modificó la temperatura hasta 25°C y 35°C, cubriendo un intervalo de 10°C alrededor del óptimo. Ambas temperaturas se ensayaron en las mejores condiciones de pH (pH=7) alcanzadas anteriormente. Los experimentos se realizaron en el mismo reactor, siendo la concentración de intermedios igual que la empleada en el estudio del efecto del pH.

2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con plaguicidas para el acoplamiento con una oxidación biológica posterior

2.1. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de plaguicidas individuales (alaclor y pirimetanil) con *P. putida*

2.1.1. Estudio de la biodegradabilidad de los plaguicidas puros

Antes de acometer la degradación biológica de los productos de degradación de estos plaguicidas, se comprueba que *P. putida* no es capaz de degradar las sustancias originales. Para ello se realiza el estudio en matraz con diferentes concentraciones de alaclor y pirimetanil (0, 30, 60, 90 y 120 mg L⁻¹) haciendo un seguimiento del crecimiento bacteriano.

2.1.2. Degradación de los plaguicidas mediante foto-Fenton

Para determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton para el acoplamiento con una oxidación biológica posterior, se someten disoluciones acuosas de cada plaguicida (120 mg L⁻¹) a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton, empleando 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺ como catalizador y realizando la oxidación parcial mediante adiciones de peróxido de hidrógeno. Este pretratamiento se lleva a cabo en la planta CADOX con captadores solares parabólicos compuestos (CPC) en la Plataforma Solar de Almería.

2.1.3. Análisis de la biodegradabilidad de los intermedios generados en la degradación de los plaguicidas a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton

La biodegradación se lleva a cabo mediante *P. putida* en matraces Erlenmeyer empleando las aguas obtenidas anteriormente por la aplicación de intensidades crecientes de tratamiento de foto-Fenton. Cada 24 h se mide el crecimiento bacteriano, la concentración de plaguicidas y el consumo de COD y se calcula la eficiencia de biodegradación de las aguas parcialmente tratadas.

2.1.4. Cinética de biodegradación de los intermedios generados en la degradación de los plaguicidas mediante foto-Fenton

Se lleva a cabo la biodegradación en modo discontinuo empleando *P. putida* en una columna de burbujeo de 12 L con el agua obtenida para la intensidad de tratamiento seleccionada en el apartado 2.1.3. Asimismo, se realiza un blanco con *P. putida* en el mismo reactor sin intermedios para comparar los parámetros cinéticos obtenidos. Los resultados experimentales así obtenidos se ajustan a un modelo cinético con el que se ponen de manifiesto las diferencias en el metabolismo bacteriano debido a la degradación de los intermedios provenientes del tratamiento de cada plaguicida. En todos los casos las condiciones de pH y temperatura son las mejores estudiadas previamente.

2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento por foto-Fenton de un agua contaminada con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales mediante *P. putida*

2.2.1. Degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton

Un agua que contiene 50 mg L⁻¹ de los compuestos dimetoato, metiloxidemeton, carbaril y metidation, que son los principios activos de los plaguicidas comerciales Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid, respectivamente, se somete a diferentes tiempos de tratamiento de foto-Fenton (hasta un tiempo de iluminación ~ 200 min). El tratamiento mediante foto-Fenton se lleva a cabo empleando 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺ y realizando la oxidación parcial mediante adiciones controladas de peróxido de hidrógeno en la planta CADOX con captadores solares parabólicos compuestos (CPC) en la Plataforma Solar de Almería.

2.2.2. Análisis de la biodegradabilidad de los intermedios generados en la degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton

Se hace crecer *P. putida* en matraces Erlenmeyer en las aguas obtenidas anteriormente por la aplicación de crecientes intensidades de tratamiento de foto-Fenton, empleando como única fuente de carbono los intermedios de reacción. Cada 24 h se mide el crecimiento bacteriano, la concentración de plaguicidas y el consumo de COD y se calcula la eficiencia de biodegradación.

2.2.3. Cinética de biodegradación de los intermedios generados en la degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas mediante foto-Fenton

La cinética de biodegradación de los intermedios, generados al tiempo de tratamiento fotocatalítico seleccionado en el apartado anterior, se estudia con *P. putida* en un biorreactor tipo columna de burbujeo de 12 L a 30°C y pH 7 en modo discontinuo. Además, se compara con la cinética resultante de realizar el mismo tratamiento pero sin intermedios provenientes del tratamiento fotocatalítico de la mezcla.

3. Acoplamiento de tratamiento mediante foto-Fenton y oxidación biológica para la depuración de efluentes contaminados con plaguicidas

3.1. Estudios preliminares. Degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas comerciales Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid

El efluente tratado mediante foto-Fenton al tiempo mínimo seleccionado con *P. putida* se somete a biodegradación en un reactor con fangos activos de la EDAR "El Bobar" de Almería. Así, en la reacción foto-Fenton se parte de un COD de 180 mg L⁻¹ de la mezcla de los cuatro plaguicidas y se mineraliza el 30% del COD inicial.

El reactor tanque agitado tiene 6 L de capacidad y se opera en modo discontinuo secuencial con fangos de depuradora sin adaptación previa al efluente. Durante el ensayo, la temperatura promedio fue de 26.7°C y el pH se mantuvo entre 6 y 8. No obstante, se realiza un seguimiento de ambos parámetros. Durante el transcurso de cada ciclo se determina el consumo de COD, DQO y la concentración de nitrógeno en forma de amonio y nitrato.

3.2. Estudio de la influencia de la concentración inicial de COD. Degradación de la mezcla de cinco plaguicidas comerciales: Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala

3.2.1. Degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton

Se lleva a cabo la mineralización mediante foto-Fenton de una mezcla de oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil que son los principios activos de los plaguicidas comerciales Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala, respectivamente. La degradación se realiza a dos concentraciones iniciales de COD distintas (500 y 200 mg L⁻¹) aportando cada plaguicida la misma concentración de COD. La mineralización parcial con foto-Fenton se realiza mediante adiciones controladas de peróxido de hidrógeno, con 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺ y en la planta FOTOBIOX con captadores solares parabólicos compuestos (CPC) ubicados en el Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) de la Universidad de Almería.

3.2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton con *P. putida*

Se hace crecer *P. putida* en matraces Erlenmeyer en las aguas obtenidas anteriormente por la aplicación de crecientes intensidades de tratamiento de foto-Fenton, empleando como única fuente de carbono los intermedios de reacción. Se mide el crecimiento bacteriano, la concentración de plaguicidas y el consumo de COD y se calcula la eficiencia de biodegradación.

3.2.3. Acoplamiento de foto-Fenton y oxidación biológica empleando fangos activos

Para el ensayo a 500 mg L⁻¹ de COD se lleva a cabo la degradación de la mezcla de cinco plaguicidas con foto-Fenton hasta el tiempo mínimo de tratamiento determinado en el apartado anterior. Análogamente al estudio preliminar con la mezcla de cuatro plaguicidas, este efluente se trata posteriormente en un reactor tanque agitado conteniendo 6 L de fangos activos de la EDAR "El Bobar" de Almería en modo discontinuo secuencial.

Debido a que los tiempos necesarios para que prácticamente todo el COD se consuma son muy largos, se repite la biodegradación mezclando el efluente del proceso foto-Fenton con un agua residual simulada, de modo que el proceso se asemeje a una depuración real en una EDAR donde la fuente de carbono puede provenir de compuestos

difícilmente biodegradables y de otros muy biodegradables. Se realizan cinco ciclos, hasta que el fango está adaptado a la nueva mezcla, y el sexto ciclo se lleva a cabo con efluente de foto-Fenton como única fuente de carbono para verificar su biodegradabilidad. Estos ensayos se realizan a una temperatura media de 21°C y pH 7-8. Durante el transcurso de cada ciclo se determina el consumo de COD, DQO y la concentración de nitrógeno en forma de amonio y nitrato.

Para la mezcla con una concentración inicial de 200 mg L⁻¹ son necesarios cuatro ciclos para la adaptación y el quinto ciclo se realiza únicamente con efluente de foto-Fenton a 23.7°C y pH 6.5-7.5. Este efluente es el resultado de tratar la mezcla el tiempo mínimo determinado en el apartado anterior.

A su vez se realiza un ensayo con un fango activo proveniente de la misma EDAR en el que la única fuente de carbono es el agua residual simulada con el fin de comparar su biodegradabilidad con la del efluente. Para este experimento el COD inicial es similar al cultivo blanco de *P. putida* (aproximadamente de unos 370 mg L⁻¹).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación del stock de *Pseudomonas putida*

La bacteria *Pseudomonas putida* CECT 324 se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Los cultivos se mantuvieron en placas Petri durante 24 horas a 30°C con medio de cultivo conteniendo extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹, NaCl, 5 g L⁻¹ y agar, 15 g L⁻¹ a pH 7.2. Una vez formadas las colonias se recoge una y se cultiva en medio líquido en un matraz Erlenmeyer de 25 mL que contiene 5 mL del medio anterior (a excepción del agar). Se mantiene esta disolución en agitación 24 horas y se reparte en tubos Eppendorf con 800 µL en cada uno. A cada tubo se le añaden 200 µL de disolución de glicerina al 87% (v/v). Una vez agitados, cada Eppendorf se introduce en nitrógeno líquido y se conserva a -70°C.

3.2. Experimentos en matraz

Los experimentos en matraz se llevaron a cabo en una cámara de cultivo termostatazada a 30°C con agitación continua a 150 rpm aportada por un agitador orbital Infors AG CH-4103 con una excentricidad de 2.6 cm. La esterilización del material se realizó mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 20 minutos.

Concentración mínima de intermedios modelo inhibitoria del crecimiento bacteriano

Se realizan 33 ensayos (tres réplicas para cada concentración) en matraces Erlenmeyer de 100 mL, conteniendo 20 mL de disolución acuosa esterilizada con filtros de jeringa de 0.20 µm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore) compuesta por: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹ de COD de fenol, vanilina, ácido fórmico y ácido oxálico como única fuente de carbono. Además, se adicionan los compuestos inorgánicos y la disolución de metales traza (10 mL L⁻¹) mostrados en la Tabla 3.1.

El inóculo proviene del stock de *P. putida*, que se centrifuga (J. P. Selecta) a 1370 g durante 15 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante, se resuspende en el mismo volumen final con el medio en el que después se llevará a cabo el crecimiento y se repite de nuevo la operación. De este modo se retira el medio criogénico que protege el stock bacteriano evitándose la adición de otra fuente de carbono. Del inóculo así preparado se utiliza un volumen en cada matraz de 30 µL.

Tabla 3.1. Medio mineral (Shim y cols., 2002) empleado en los ensayos con *P. putida*.

| Compuesto inorgánico | |
|--|------------------------|
| NH ₄ Cl | 0.5 g L ⁻¹ |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 0.5 g L ⁻¹ |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g L ⁻¹ |
| Disolución de metales traza | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.98 g L ⁻¹ |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 1 g L ⁻¹ |
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O | 0.8 g L ⁻¹ |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 g L ⁻¹ |
| ácido nitrilotriacético | 0.2 g L ⁻¹ |

La viabilidad del inóculo se comprueba con 30 µL de stock bacteriano en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL del medio de cultivo líquido descrito en el apartado 3.1.

Estudio de la biodegradabilidad de los plaguicidas alaclor y pirimetanil

Se realizan ensayos por duplicado en matraces Erlenmeyer de 100 mL, conteniendo 20 mL de disoluciones de alaclor y pirimetanil (0, 30, 60, 90 y 120 mg L⁻¹), sales inorgánicas y 10 mL L⁻¹ de metales traza (Tabla 3.1) esterilizadas con filtros de jeringa de 0.20 µm (Millex®-GN, 25 mm, Millipore). El inóculo proviene del stock de *P. putida* y se utiliza un volumen en cada matraz de 80 µL. El stock de bacteria aporta extracto de buey, 3.2 mg L⁻¹, extracto de levadura, 6.4 mg L⁻¹, peptona, 16 mg L⁻¹, NaCl 16 mg L⁻¹ y glicerina 87% (v/v), 0.8 mL L⁻¹, provenientes del medio criogénico, con lo que suministra un COD adicional de aproximadamente 360 mg L⁻¹. La viabilidad del inóculo se comprueba con 80 µL de stock bacteriano en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL del medio de cultivo líquido descrito en el apartado 3.1.

Determinación de la eficiencia de biodegradación

Se realizan los ensayos por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de efluente del proceso foto-Fenton a diferentes intensidades de tratamiento, al que se adicionan las sales minerales y la disolución de metales traza (10 mL L⁻¹) mostrados en la Tabla 3.1. A continuación, el pH se ajusta a 7 añadiendo NaOH 0.1 M y se filtra a través de filtros de 0.80 µm (AAWG, 47 mm, Millipore) ya que si la filtración se realiza con filtros de 0.20 o 0.45 µm parte del COD queda retenido en éste. Finalmente los matraces se inoculan con 200 µL del stock de *P. putida*.

En este ensayo no se retira el medio criogénico, por lo que el propio stock bacteriano aporta al medio final extracto de buey, 3.2 mg L⁻¹, extracto de levadura, 6.4 mg

L⁻¹, peptona, 16 mg L⁻¹, NaCl 16 mg L⁻¹ y glicerina 87% (v/v), 0.8 mL L⁻¹, con lo que suministra un COD adicional de aproximadamente 360 mg L⁻¹, fundamentalmente procedente de la glicerina. De esta forma, se simula que el efluente del proceso fotocatalítico se combina con un agua residual (con un COD biodegradable). Por tanto, estarán presentes dos fuentes de carbono; la proveniente de los intermedios generados mediante foto-Fenton y la fuente de carbono biodegradable del medio criogénico (agua residual simulada). La viabilidad del inóculo se comprueba igual que en el apartado anterior.

3.3. Descripción de los reactores empleados para los ensayos bacterianos

3.3.1. Reactor tanque agitado

El estudio del efecto del pH y la temperatura en la degradación de los intermedios modelo mediante *P. putida* se lleva a cabo en un reactor tanque agitado New Brunswick Scientific Bioflo III. El biorreactor en conjunto, incluidas las sales inorgánicas, el medio mineral y las sondas de pH y oxígeno se esterilizan mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 20 minutos. A continuación se adicionan los cuatro intermedios modelo como única fuente de carbono en una proporción molar 1:1:1:1; vanilina, 111.8 mg L⁻¹ (COD=70.6 mg L⁻¹), fenol, 69.2 mg L⁻¹ (COD=52.9 mg L⁻¹), ácido oxálico, 66.2 mg L⁻¹ (COD=17.6 mg L⁻¹) y ácido fórmico, 33.8 mg L⁻¹ (COD=8.8 mg L⁻¹) esterilizados mediante filtración con filtros de jeringa de 0.20 µm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore) formando un agua residual sintética con un COD inicial aportado por los intermedios de 150 mg L⁻¹.

5 mL de un stock de bacteria se centrifugan (J. P. Selecta) a 1370 g durante 15 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante, se resuspende en 5 mL del agua sintética en la que después se lleva a cabo la biodegradación con *P. putida* y a continuación, se repite nuevamente la operación. De este modo, se retira el medio criogénico que protege el stock bacteriano evitándose la adición de otra fuente de carbono.

Durante la biodegradación, las muestras son recogidas por un muestreador automático Sigma 900 y se filtran con filtros de jeringa de 0.20 µm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore) para retirar la biomasa bacteriana.

Para todos los experimentos se realizaron cultivos control a 30°C con 20 µL del mismo inóculo y 20 mL de medio líquido (extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹ y NaCl, 5 g L⁻¹ a pH 7.2) en matraces Erlenmeyer de 100 mL.

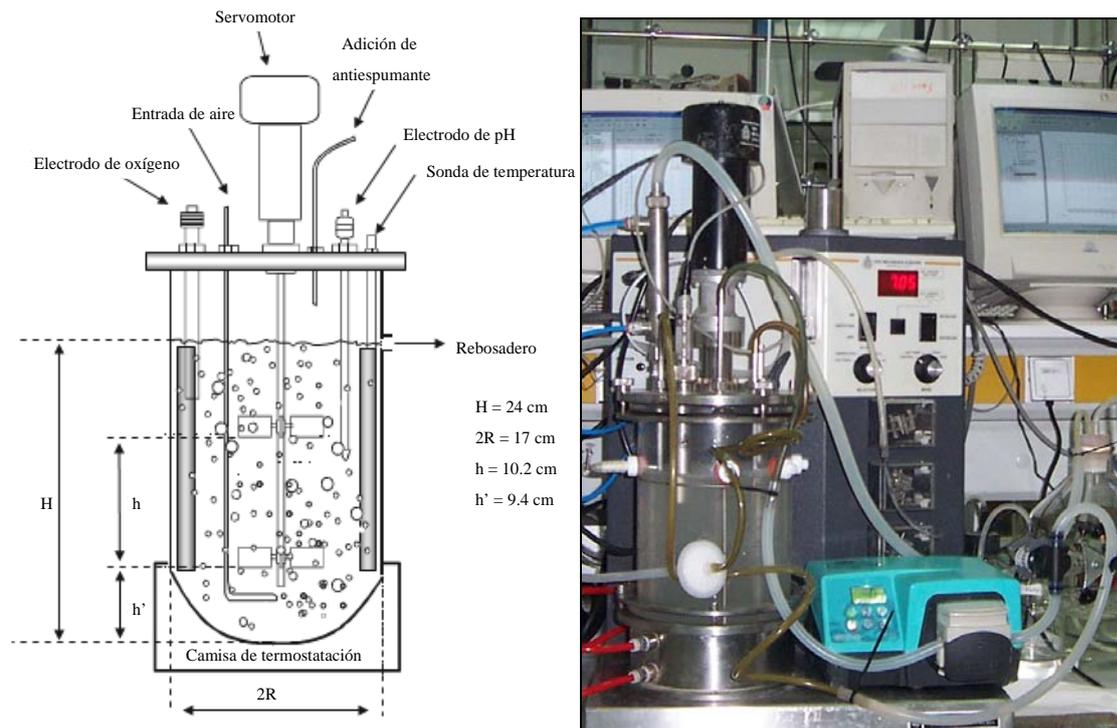


Figura 3.1. Esquema (izqda.) y fotografía (dcha.) del biorreactor New Brunswick Scientific Bioflo III.

El biorreactor (Figura 3.1) de 5 litros de capacidad, consiste en un cuerpo cilíndrico de vidrio de 17 cm de diámetro interno y 24 cm de profundidad, encamisado en su parte inferior con acero inoxidable donde se aloja el circuito de termostatación por el que circula agua de temperatura controlada. La pared de vidrio dispone en su parte superior de cuatro conexiones esterilizables de polipropileno, para permitir la adición de antiespumante o nutrientes, o bien como rebosadero. El cuerpo cilíndrico está cerrado en su parte superior por un disco de acero inoxidable en el que se encuentran los orificios necesarios para la inoculación, suministro de antiespumante, adición de ácido o base para control del pH, vaina metálica para colocar la sonda de temperatura, distribuidor de gas, dispositivo para la toma de muestra, condensador de humedad para el aire efluente, electrodos de oxígeno disuelto y de pH.

Sobre el eje están fijadas dos turbinas Rushton de 6 paletas, colocadas, la inferior a una distancia equivalente a un diámetro de turbina desde el fondo del recipiente, y la superior a un diámetro y medio sobre la turbina inferior. El diámetro de las turbinas es de 6.5 cm, y las paletas tienen 1.7 cm de largo y 1.2 cm de alto. El reactor está provisto de cuatro tabiques deflectores de 20.3 x 1.6 cm separados 0.3 cm de la superficie interna. La agitación se mantuvo a 300 rpm.

El oxígeno disuelto se midió utilizando un electrodo polarográfico Mettler Toledo InPro® 6000 Series O2 conectado a un transmisor de oxígeno disuelto Crison Mettler Toledo O2 4100e, siendo la medida facilitada porcentajes de saturación respecto al equilibrio agua-aire a la temperatura de trabajo. Antes de cada experimento se comprueba el estado de la membrana del electrodo, reemplazándose si se observa cualquier signo de deterioro, y se cambia el electrolito. A continuación se procede a la calibración. En estos ensayos, la aireación se lleva a cabo con aire comprimido que proviene de la red del laboratorio. Antes de entrar en el reactor, pasa por un humidificador con el fin de saturarlo de agua y que no produzca evaporación del agua a tratar, también pasa por un filtro Millipore Millex FG50 de 0.22 micras que lo esteriliza evitando contaminaciones. El burbujeador consiste en un tubo abierto de 5 mm de diámetro con una curvatura en su parte final quedando la salida de aire justo debajo de la turbina inferior. La medida del caudal de aire se realiza mediante un rotámetro OMEGA. El caudal de gas utilizado ha sido de 5 L min^{-1} (equivalente a 1 vvm).

El sistema de adquisición de datos está compuesto por una tarjeta de adquisición LabJack U12 (LabJack Corporation, Lakewood, Colorado, USA) conectada a través del puerto USB a un ordenador que está instalado el software DAQFactory Lite (AzeoTech, Inc., Ashland, Oregon, USA), que permite registrar las lecturas. La tarjeta dispone de ocho canales de entrada analógicos (lectura entre -5 y +5 voltios), 16 canales de entrada digital y dos canales de salida analógica.

Medida y control de temperatura

La temperatura puede seleccionarse en el intervalo de 4 a 80°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), medida en el seno del fermentador con una sonda de resistencia (Pt-100), y es controlada por un controlador PID que actúa sobre el caudal y la temperatura del agua contenida en la camisa de termostatación. El fermentador dispone de una resistencia interna que es capaz de calentar el agua que baña la camisa termostatizadora cuando la temperatura fijada para el sistema es mayor que la del cultivo. En el caso contrario, el sistema necesita de un aporte de agua de refrigeración.

Debido al calor generado en el crecimiento bacteriano y a que el agua de refrigeración es la misma que circula por el condensador de humedad de la corriente gaseosa de salida, ha sido necesario complementar el fermentador con un equipo de termostatación compuesto por un baño y una unidad de refrigeración con control de temperatura Frigor-Reg (J. P. Selecta) con el fin de proporcionar agua de refrigeración a

la temperatura adecuada para el correcto funcionamiento del controlador del equipo Bioflo III y del condensador. La temperatura del baño se mantiene a un máximo de 14°C con el fin de facilitar el funcionamiento del controlador que debe estar constantemente extrayendo el calor generado. La presión de entrada de agua al circuito de refrigeración del fermentador se mantiene constante mediante una bomba centrífuga provista de un circuito de derivación con válvula regulable para aliviar el exceso de carga.

Medida y control de pH

La medida del pH se realiza mediante un electrodo combinado Ingold esterilizable mediante autoclave. El control, en el intervalo de 2.00 a 12.00 (± 0.01) unidades de pH, se ejerce mediante un controlador PID que opera sobre dos bombas peristálticas conectadas a los orificios de adición de ácido ó base. La calibración de la sonda se realiza antes de empezar cada ensayo utilizando dos soluciones tampón de pH 7 y 4.

El controlador actúa manteniendo la bomba peristáltica correspondiente funcionando una fracción del ciclo de tiempo, que es proporcional a la desviación del punto de consigna (proporcional), a su velocidad de variación en el tiempo (derivada) y a la persistencia de la desviación en el tiempo (integral). Así, la proporcionalidad del control no se ejerce variando el caudal de inyección, lo que requiere un equipo complejo, sino el porcentaje de tiempo de actuación de la bomba, con lo que se hace posible el control con elementos de respuesta todo/nada como lo son las bombas peristálticas instaladas en el fermentador.

3.3.2. Columna de burbujeo

Para estudiar la cinética de biodegradación mediante *P. putida* de los intermedios que se generan en la reacción de foto-Fenton se emplea una columna de burbujeo. Dicha columna ha sido diseñada en el Departamento de Ingeniería Química y construida durante el desarrollo de esta tesis.

La esterilización de este reactor, a diferencia del anterior, se realiza por vía química. Una vez que todos los componentes (conducciones, filtros, etc.) se han esterilizado mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 20 minutos, la columna se llena con agua y se añade 500 mL de peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes, manteniéndose en el interior durante 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo se vacía, procediéndose directamente a su inoculación.

El agua a tratar está compuesta por el plaguicida (o mezclas de plaguicidas) parcialmente degradado mediante foto-Fenton, las sales minerales y los metales traza (10 mL L⁻¹) mostrados en la Tabla 3.1. Se ajusta el pH a 7 añadiendo NaOH 0.1 M y se filtra a través de filtros de 0.80 µm (AAWG, 47 mm, Millipore) para su esterilización. Finalmente, la inoculación se realiza inyectando 48 mL del stock de *P. putida*. El propio stock de bacteria aporta al medio final extracto de buey, 3.2 mg L⁻¹, extracto de levadura, 6.4 mg L⁻¹, peptona, 16 mg L⁻¹, NaCl 16 mg L⁻¹ y glicerina 87% (v/v), 0.8 mL L⁻¹, provenientes del medio criogénico, con lo que suministra un COD adicional de aproximadamente 360 mg L⁻¹.

Para todos los experimentos se realizaron cultivos control a 30°C con 80 µL del mismo inóculo y 20 mL de medio líquido (extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹ y NaCl, 5 g L⁻¹ a pH 7.2) en matraces Erlenmeyer de 100 mL. También se realizan cultivos control a 30°C con 80 µL del mismo inóculo y 20 mL del agua a tratar seleccionada para la columna en cada experimento en matraces Erlenmeyer de 100 mL.

Este reactor, de 12 L de volumen útil de trabajo, está compuesto de dos partes (la cabeza del reactor que se encuentra unida al cuerpo permanentemente y la cámara de expansión) que se unen por medio de una abrazadera y se encuentra montado en una estructura metálica, como se puede observar en la Figura 3.2.

En la parte inferior del reactor se encuentra la cámara de expansión y el burbujeador, que es de tipo plato perforado. El burbujeador es de acero inoxidable, tiene un milímetro de espesor y presenta 150 orificios de un milímetro de diámetro colocados de forma cuadrículada y separados un centímetro.

El cuerpo del reactor tiene 83 cm y dispone de dos salidas en la parte inferior y una en la superior. Los puertos para las sondas de pH y oxígeno disuelto se encuentran en la parte del reactor que une el cuerpo con la cabeza, situados a 78 cm del burbujeador. En esta parte hay, además, dos salidas.

La cabeza del reactor, a la que se le acopla una tapadera por medio de una abrazadera, tiene una altura de 9.5 cm y un diámetro interno de 20 cm. En la tapadera, de PVC, hay dos puertos, uno para el condensador y otro para el septum; y dos tomas, una para el filtro Millipore Millex FG50 de 0.22 micras utilizado para compensar presiones y otra para la medida en continuo de turbidez.

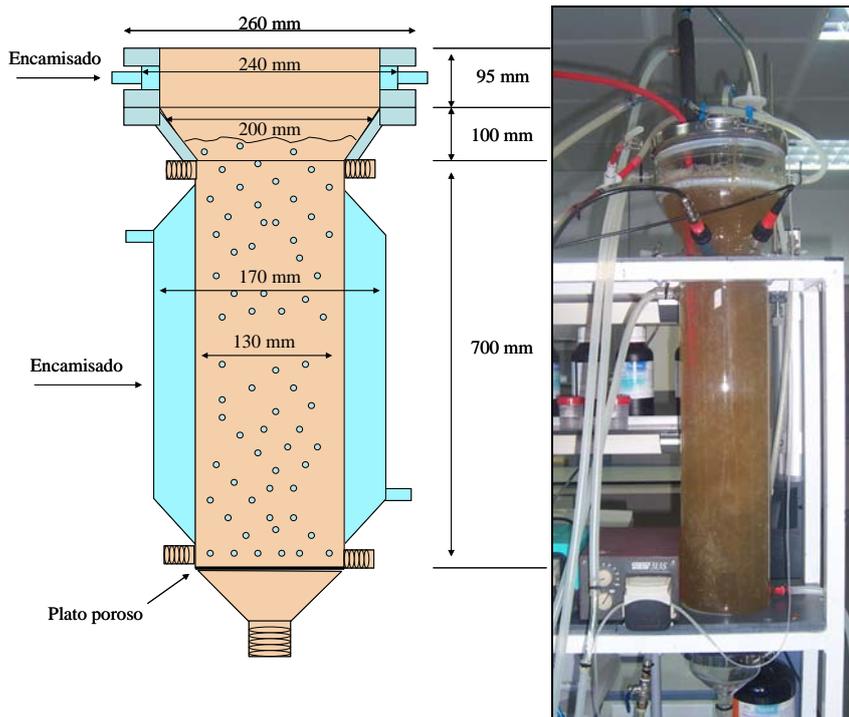


Figura 3.2. Esquema (izqda.) y fotografía (dcha.) de la columna de burbujeo de 12 L.

La aireación, medida de oxígeno (Crison 60 50) y medida del caudal de aire se lleva a cabo igual que en el apartado anterior. En este caso, el caudal de aire utilizado ha sido de 10 L min^{-1} equivalente a 0.83 vvm .

El cuerpo del reactor se mantiene a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$. El sistema de termostatación empleado consiste en un baño de agua con una bomba centrífuga que impulsa el agua a través de la camisa del reactor. El baño está equipado con una unidad de refrigeración con control de temperatura Frigor-Reg (J. P. Selecta) que actúa cuando la temperatura sube por encima del valor deseado y con una resistencia de 200 W con control de temperatura que funciona cuando la temperatura se encuentra por debajo de este valor.

La temperatura de la cabeza del reactor y del condensador se mantiene alrededor de 8°C para evitar el crecimiento bacteriano en la pared del reactor en la zona libre de cultivo y la pérdida de agua, respectivamente. El sistema para el control de la temperatura consta de un baño equipado con una unidad de refrigeración con control de temperatura Frigor-Reg (J. P. Selecta) y una bomba centrífuga que impulsa el agua hacia el interior de la camisa y del condensador.

La medida del pH se realiza con un electrodo de pH (Crison 55 33). El pH se mide continuamente y se transmite la señal por medio de una salida $4\text{-}20 \text{ mA}$ a la tarjeta de adquisición de datos que permite el registro continuo de la señal. En este caso, también se

realiza la calibración de la sonda antes de empezar cada ensayo utilizando dos soluciones tampón de pH 7 y 4. El pH fue controlado mediante el empleo de un relé y una bomba peristáltica de modo que se mantuvo constante (7.0 ± 0.1) por adición de NaOH. El sistema de toma de muestra y adquisición de datos se llevó a cabo del mismo modo que en el apartado anterior.

3.4. Ensayos con fangos activos

Los reactores tanque agitado de 6 L que a continuación se presentan han sido diseñados en el Departamento de Ingeniería Química y construidos durante el desarrollo de esta tesis.

Como se puede observar en la Figura 3.3 el reactor consiste en un cuerpo cilíndrico de PVC de 20 cm de diámetro interno y 25 cm de profundidad. Está cerrado superiormente por un disco de PVC en el que se encuentran los orificios necesarios para las sondas de pH (Crison 55 33), temperatura (Pt-100) y oxígeno disuelto (Crison 60 50). Además dispone de un acceso para la toma de muestra.

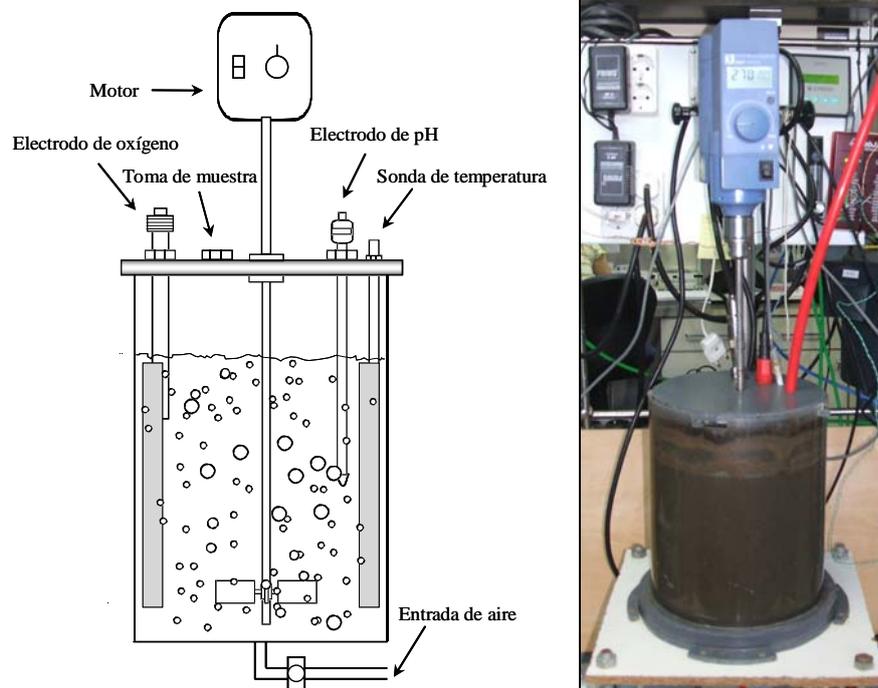


Figura 3.3. Esquema (izqda.) y fotografía (dcha.) del reactor tanque agitado de 6 L empleado para los ensayos con fangos activos.

En la parte inferior del reactor se introduce el aire mediante un burbujeador. Sobre el eje está fijada una turbina de 4 paletas de 4 cm de largo y 2 cm de alto. El reactor está provisto de cuatro tabiques deflectores de 24 x 1.5 cm. La agitación se mantuvo a 150 rpm. Los reactores no disponen de sistemas de control de pH ni temperatura.

Las muestras son recogidas por un muestreador automático Sigma 900, se centrifugan a 1789 g (Mixtasel, J.P. Selecta) durante 2 min y posteriormente se filtran con filtros de jeringa de 0.20 μm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore) para retirar la biomasa.

En estos experimentos, la aireación (medida con rotámetro OMEGA) se lleva a cabo con aire comprimido que proviene de la red del laboratorio previamente humidificado. El caudal de gas utilizado ha sido de 4 L min^{-1} (equivalente a 0.67 vvm).

Al igual que en los reactores anteriores, se tiene especial atención a las sondas porque en los ensayos con fangos activos se deterioran en gran medida. Así, antes de cada ciclo, se calibra la sonda de pH, se comprueba el estado de la membrana del electrodo de oxígeno, sustituyéndola si fuera necesario, se repone electrolito y se procede la calibración de la sonda de oxígeno. Para todos los experimentos se realizaron ensayos control con un reactor gemelo y con el mismo fango. El sistema de adquisición de datos es igual que el mencionado en el apartado anterior.

Para el ensayo con fangos activos no es necesaria la esterilización por lo que únicamente entre experimentos se lava el reactor con jabón y lejía y se aclara con agua. Una vez limpio, el reactor se llena con 6 L de los fangos activos procedentes de la EDAR y antes de comenzar la biodegradación se mantienen 24 h con aireación y agitación. Transcurrido este tiempo, se dejan decantar y se retira el sobrenadante con una bomba peristáltica añadiendo el mismo volumen de la disolución a tratar que sobrenadante retirado hasta completar los 6 L de volumen de trabajo. Para el modo SBR, una vez finalizado el experimento se deja de nuevo decantar, se vuelve a extraer el sobrenadante y se añade nuevamente la disolución problema hasta completar los 6 L.

Cuando la biodegradación con fangos activos se realiza sobre el efluente del tratamiento mediante foto-Fenton, se adicionan los compuestos inorgánicos presentados en la Tabla 3.2. Sin embargo, en los experimentos en los que se añade una fuente de carbono adicional (agua residual simulada), el medio mineral seleccionado es el mostrado en la Tabla 3.1 por analogía al ensayo blanco con *P. putida*.

Tabla 3.2. Medio mineral empleado en los ensayos con fangos activos.

| Compuesto inorgánico | Concentración (g L ⁻¹) | Cantidad |
|--------------------------------------|--|----------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 43.8 | C/P=100/5 |
| CaCl ₂ | 27.5 | 1 mL L ⁻¹ |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 22.5 | 1 mL L ⁻¹ |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 50.0 (+0.5 mL L ⁻¹ H ₂ SO ₄) | C/Fe=100/2 |
| NaHCO ₃ | 48.0 | 2 mL L ⁻¹ |
| NH ₄ Cl | 38.5 | C/N=100/20 |

El agua a tratar en los experimentos consta del efluente del tratamiento mediante foto-Fenton y el medio mineral. Además previamente al tratamiento biológico se ajusta el pH a 7 con NaOH 1N. Antes de realizar la adición de sales, se lleva a cabo la medida del nitrógeno en forma de amonio del efluente del tratamiento con foto-Fenton para no añadir un exceso de amonio y mantener la relación C/N=100/20.

Para los experimentos en los que el efluente del tratamiento mediante foto-Fenton se mezcla con una fuente de carbono adicional al comienzo del ciclo, se adicionan las sales inorgánicas y el medio mineral de la Tabla 3.1. Igualmente, antes del tratamiento biológico se ajusta el pH a 7 con NaOH 1N.

El experimento con agua residual simulada se lleva a cabo empleando extracto de buey, 3.2 mg L⁻¹, extracto de levadura, 6.4 mg L⁻¹, peptona, 16 mg L⁻¹, NaCl 16 mg L⁻¹ y glicerina 87% (v/v), 0.8 mL L⁻¹ y los compuestos inorgánicos y metales traza de la Tabla 3.1. Para este ensayo se retira el sobrenadante (5 L) y se adiciona el mismo volumen del agua residual simulada de modo que el COD inicial sea similar al cultivo blanco de *P. putida* (aproximadamente de unos 360 mg L⁻¹).

3.5. Determinación simultánea del K_La y del consumo de oxígeno

La determinación del K_La se realiza utilizando una modificación del método dinámico, descrito en Casas López y cols., (2006).

Este método consiste en la modelización de la transición entre dos estados estacionarios. Esta transición se provoca con un cambio en la composición de la fase gaseosa, produciéndose una absorción seguida de una desorción de oxígeno en la fase líquida. Así, por ejemplo, en un experimento llevado a cabo con aire, se puede cambiar la fase gaseosa de aire a oxígeno puro, y, una vez que se alcanza el estado estacionario se vuelve a utilizar aire. El perfil de oxígeno disuelto en la fase líquida en este caso quedaría como se observa en la Figura 3.4:

El balance al oxígeno en la fase líquida viene dado por la Ecuación 3.1, tanto para la absorción como para la desorción.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - q \quad \text{Ec. 3.1}$$

Se puede considerar que el consumo es constante, puesto que la velocidad de consumo de oxígeno sigue una cinética tipo Michaelis-Menten dependiente de la concentración de oxígeno disuelto, existiendo un valor de concentración de oxígeno, denominado concentración crítica (de saturación del consumo), a partir del cual el consumo permanece constante al aumentar la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Stanbury y cols., 1995). Así, en las condiciones en las que se han llevado a cabo los experimentos, puesto que la concentración de oxígeno disuelto siempre se ha mantenido por encima de este valor crítico, es correcto considerar el consumo constante.

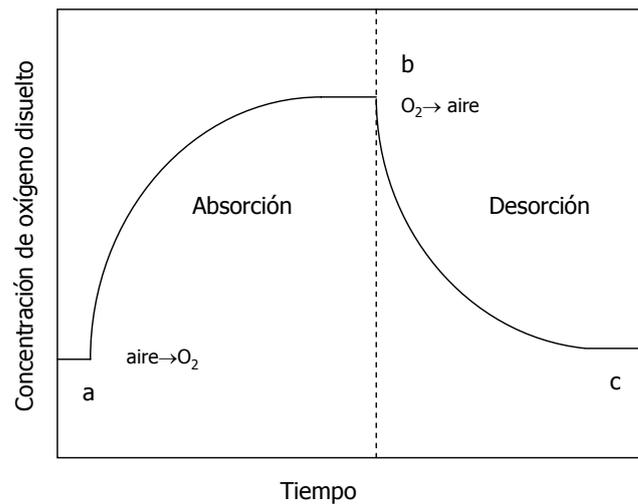


Figura 3.4. Perfil de la concentración de oxígeno disuelto durante la aplicación de la variación del método dinámico.

Asimismo, la concentración de equilibrio también se puede considerar constante porque la presión parcial de oxígeno permanece constante en cada tramo del experimento.

De este modo, considerando que el consumo y la concentración de equilibrio son constantes se obtiene la Ecuación 3.2:

$$C_L = \left(C^* - \frac{q}{K_L a} \right) + \left(C_{L0} - C^* + \frac{q}{K_L a} \right) e^{-K_L a t} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Para realizar la medida se cambia la composición de la fase gaseosa y se espera a que se alcance el estado estacionario, a continuación se vuelve a cambiar la composición, de modo que tenemos una absorción y una desorción de oxígeno. Se registran los valores de concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo con ayuda de una tarjeta de adquisición de datos LabJack U12 (LabJack Corporation, Lakewood, Colorado, USA). A continuación se representa la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo, y del ajuste se obtienen los valores del K_{La} , de C_{L0} y de q .

3.6. Plantas piloto para foto-Fenton

3.6.1. Planta piloto CADOX (Plataforma Solar de Almería)

Este prototipo ha sido especialmente diseñado y construido para aplicaciones de tratamiento de aguas residuales mediante foto-Fenton, dentro del proyecto europeo CADOX (<http://www.psa.es/webeng/projects/cadox/>) coordinado por la Plataforma Solar de Almería. El circuito hidráulico del reactor está formado por un tanque de recirculación esférico de vidrio borosilicatado, una bomba centrífuga, cuatro módulos de captadores cilindro-parabólicos (CPC) con una superficie total irradiada de 4.16 m², tubos de vidrio borosilicatado, tubería opaca de conexión y válvulas de polipropileno inerte.

En la tubería de conexión del tanque con los captadores se han insertado los sensores en línea de pH (Sensolyt[®] IQ 700, WTW), potencial redox (Sensolyt[®] IQ 700, WTW) y oxígeno disuelto (Trioximatic[®] 700, WTW), un sistema de calefacción formado por cuatro grupos de resistencias, y un sistema de refrigeración externo. El sistema se completa con un cuadro eléctrico que contiene toda la instrumentación de la planta, y un ordenador que adquiere los datos en línea generados por los sensores y transmite las decisiones de control al cuadro (Figura 3.5).

La planta piloto opera en modo discontinuo y tiene un volumen total máximo de 82 L. Los cuatro módulos de captadores CPC están montados sobre una estructura metálica inclinados 37° (latitud de la Plataforma Solar de Almería) y orientados hacia el sur. Cada módulo consta de 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 consta de 20 tubos conectados en serie, con una longitud total de 3 m más la aportada por las conexiones de polipropileno (protegidas de la radiación UV con láminas de aluminio). El reflector empleado en esta planta piloto tiene un factor de concentración 1, un ángulo de aceptación de la radiación de 90° y ha sido fabricado con aluminio altamente anodizado.

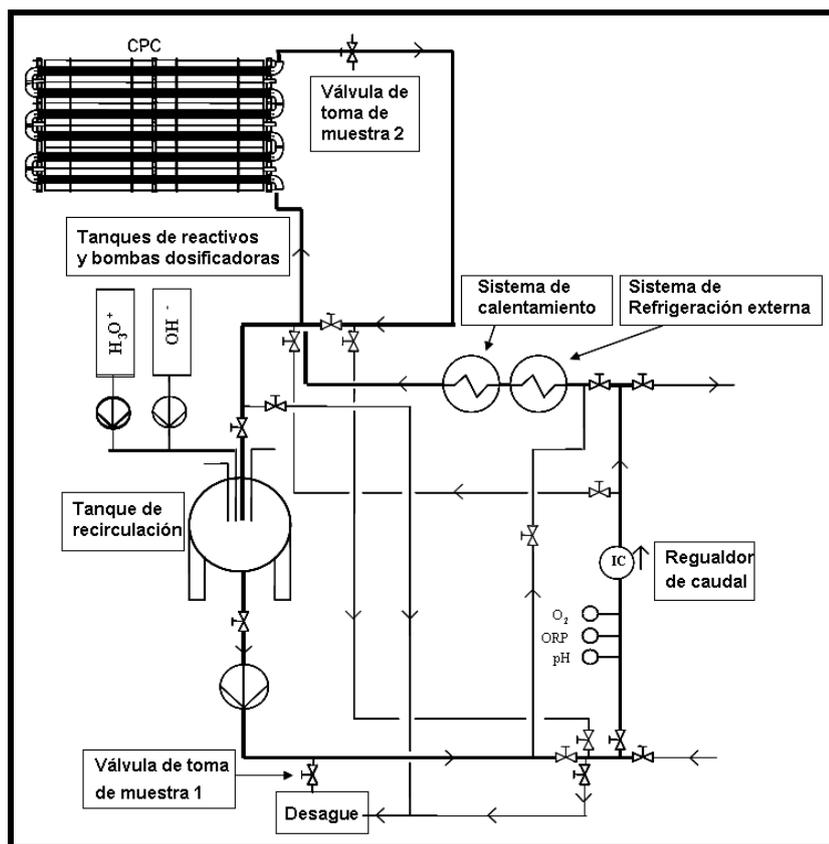


Figura 3.5. Diagrama de flujo del foto-reactor prototipo construido en la Plataforma Solar de Almería para realizar el tratamiento mediante foto-Fenton.

El fluido de trabajo circula en este prototipo de un CPC a otro y al final hasta el tanque de recirculación que tiene una capacidad máxima de 20 L (Figura 3.6). La bomba centrífuga impulsa el fluido a través del sistema a un caudal que puede ser regulado gracias a un caudalímetro insertado en la tubería. Sin embargo todos los experimentos se han llevado a cabo a un caudal constante de 25 L min^{-1} , proporcionando flujo turbulento dentro del circuito.

Los instrumentos de adquisición de datos en línea transmiten la señal que les llega de las sondas WTW de forma analógica a sus respectivos módulos controladores ("FieldPoint I/O, Advantech ADAM[®]4000 series"). Estos módulos transmiten los datos conforme al protocolo RS485, y se conectan a una interfaz desarrollada en un ordenador mediante la aplicación de un convertidor intermedio de señal RS485/RS232. El software SCADA ("Supervisory Control And Data Acquisition") ha sido programado en LabVIEW[®]7.0 ("National Instruments") en el ordenador que recibe las señales del campo, para llevar a cabo tanto la adquisición de los datos como las acciones de control necesarias en cada experimento.



Figura 3.6. Fotografía de los cuatro módulos de captadores CPC durante un ensayo de foto-Fenton (izda.) e interior de la caseta que protege al tanque de recirculación, los sensores, el sistema de calefacción y refrigeración y el cuadro eléctrico (dcha.).

3.6.2. Planta piloto FOTOBIOX (Centro de Investigación en Energía Solar, Universidad de Almería)

El sistema está formado por dos plantas piloto gemelas (Figura 3.7) de 2.25 m² cada una. Cada planta consta de un tanque de polipropileno, una bomba centrífuga para recirculación, tuberías conectoras de polipropileno y válvulas para la apertura y cierre de las tuberías. El diseño de la valvulería y conducciones permite la operatividad de ambas plantas individualmente, cruzadas o combinadas.

En las tuberías se incorporan los sensores en línea de pH (Sensolyt[®] IQ 700, WTW), potencial redox (Sensolyt[®] IQ 700, WTW) y oxígeno disuelto (Trioximatic[®] 700, WTW), además de un caudalímetro y el sistema de calentamiento de 3600 W.

El volumen total de cada reactor es de 91.7 L (volumen iluminado: 21.9 L, volumen del tanque: 50 L y volumen de las conducciones: 19.8 L). Además, cada planta incorpora un módulo de CPC soportados sobre un armazón de aluminio inclinado 37° (latitud local) en el que también se halla el sensor de medición de radiación ultravioleta solar global. A su vez, cada módulo CPC tiene 10 tubos vidrio Pyrex de 50 mm de diámetro y 2.8 mm de espesor conectados con uniones de PVC y codos de polipropileno en los extremos (Figura 3.8). Al mismo tiempo, cada CPC se protege con una plancha de metacrilato. Estos módulos están fijados sobre una estructura metálica elevada a unos 5 m de altura.

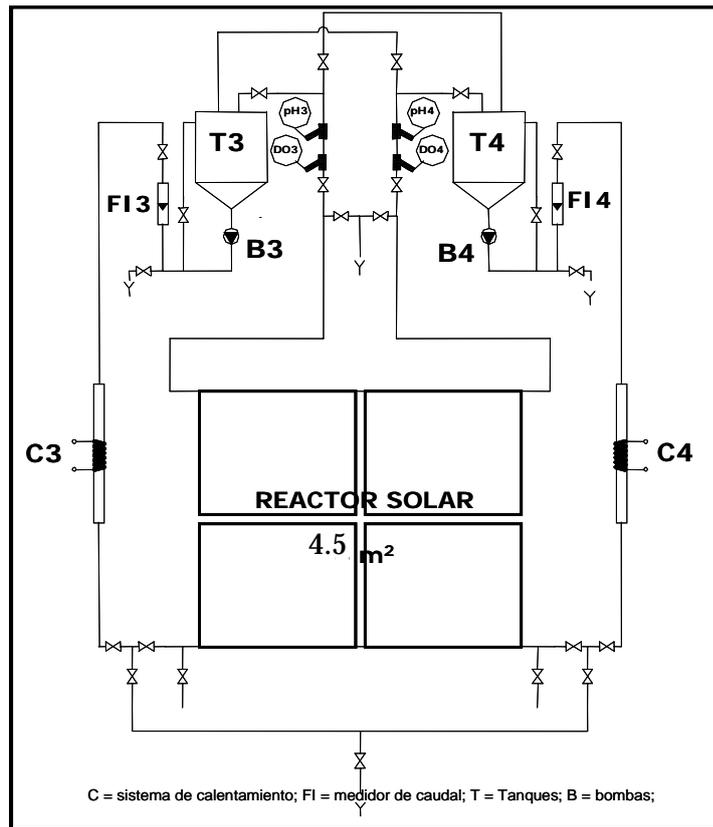


Figura 3.7. Esquema de las dos plantas piloto FOTOBIOX.



Figura 3.8. Fotografía de los dos CPC soportados sobre un armazón de aluminio inclinado 37°.

En este caso el fluido de trabajo circula también desde el CPC hasta el tanque de recirculación, con la ayuda de una bomba centrífuga, regulándose el caudal mediante un caudalímetro insertado en la tubería. Todos los experimentos se han llevado a cabo a un caudal constante de 25 L min^{-1} , proporcionando flujo turbulento dentro del circuito.



Figura 3.9. Fotografía de los tanques, sensores, bombas y panel de instrumentación.

El sistema se completa con un panel instrumental que contiene las instalaciones eléctricas y electrónicas y un ordenador para la adquisición en línea de los datos. Los instrumentos de adquisición de datos en línea transmiten la señal que les llega de las sondas WTW de forma analógica a sus respectivos módulos controladores (MAC-3580, Design Instruments) configurados con el programa LoopWin 1.0. Estos módulos transmiten los datos y se conectan a una interfaz desarrollada en un ordenador mediante la aplicación de un convertidor intermedio de señal RS485/RS232. El software Proasis DAS-Win 3.55 recibe las señales y realiza la adquisición de los datos. La Figura 3.9 muestra una fotografía de la planta FOTOBIOX.

3.7. Medidas analíticas

3.7.1. Medida del Carbono Orgánico Disuelto (COD) y nitrógeno total (NT)

Descripción y fundamento teórico

El COD se mide para evaluar el grado de mineralización de los compuestos orgánicos durante el POA y la degradación biológica con *P. putida* y fangos activos. Es la cantidad de carbono en forma de CO₂ emitida cuando una sustancia orgánica es oxidada

completamente. Corresponde a la fracción de COT (carbono orgánico total) que pasa a través de un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm (APHA-AWWA-WEF, 1992).

El analizador empleado para realizar las medidas de COD es un Shimadzu-V_{CPH}. Este analizador mide carbono total (CT) y carbono inorgánico total (CIT). El COT es la diferencia entre el CT y el CIT de las muestras acuosas. Asimismo, se incorpora un módulo para la medida de nitrógeno total (NT) Shimadzu-TNM-1.

La medida de CT está basada en la combustión (a 680°C) de la muestra acuosa en un catalizador de platino soportado en esferas de óxido de aluminio con lo que todo el carbono se convierte en CO₂. El gas de la combustión es transportado por un gas portador (aire libre de CO₂ a un caudal de 150 mL min⁻¹) hasta un detector no dispersivo infrarrojo (NDIR) para el análisis de CO₂. El detector infrarrojo genera una señal cuya forma es similar a un pico con distribución Gaussiana normal y el procesador de datos calcula su área. El área del pico es proporcional a la concentración de CT o CIT de la muestra.

Sin embargo, cuando se realiza simultáneamente la medida de COD y NT, después de la acidificación para eliminar el CIT, la muestra es inyectada en el tubo de combustión, donde el NT se descompone y el COT se oxida simultáneamente hasta CO₂. Este dióxido de carbono es detectado por el NDIR conectado en serie con un detector de quimioluminiscencia. La conexión en serie entre el NDIR y el detector de quimioluminiscencia permite que el monóxido de nitrógeno y el dióxido de carbono generados sean simultáneamente detectados en una única inyección de muestra.

Para las medidas de CIT la muestra es inyectada en una disolución al 25% p/v de ácido fosfórico. Por tanto, el carbonato y bicarbonato son liberados como CO₂ y arrastrados del reactor con aire libre de CO₂ (150 mL min⁻¹) como gas portador detectándose la señal igual que en el caso del CT.

Para la cuantificación de la relación entre el área del pico y la concentración de carbono (para CT y CIT) y NT existente en la muestra, se realiza previamente una calibración con disoluciones estándar preparadas en agua ultra pura (Mili-Q). Las medidas de CT se calibran usando hidrógeno ftalato potásico, carbonato sódico y bicarbonato sódico para las de CIT y nitrato potásico en el caso del NT.

Procedimiento

Debido a que los tubos capilares del equipo son estrechos solo se puede utilizar el sistema para medir Carbono Orgánico Disuelto (COD). Sólidos en suspensión o biomasa deben ser retirados antes de la inyección de la muestra en el sistema. Para ello, en este trabajo, se hace pasar la muestra a través de filtros de jeringa con un tamaño de poro de $0.20\ \mu\text{m}$ (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore). Cada medida se realiza al menos tres veces, hasta un máximo de cinco (de modo que la varianza sea menor que el 2%). Para los ensayos con foto-Fenton la medida del COD debe ser lo más rápida posible porque las muestras contienen hierro y peróxido de hidrógeno (reactivo Fenton) y puede disminuir el COD.

Control y calidad de la medida

Se inyectan periódicamente disoluciones estándar de COT (TOC standard 1000 ppm, Reagecon) y CIT (TIC standard 1000 ppm, Reagecon) para evaluar la medida ofrecida por el equipo. Además se verifica que los valores de COD al inicio de los experimentos mediante foto-Fenton sean congruentes con la concentración inicial de contaminante medida por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Igualmente, los datos de NT se comparan periódicamente con una disolución estándar de nitrato potásico y deben ser muy similares a la suma del $\text{NH}_4\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$ medido en las muestras.

3.7.2. Medida de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Descripción y fundamento teórico

La DQO es la medida indirecta del oxígeno necesario para la completa oxidación de todos los compuestos presentes en disolución (orgánicos e inorgánicos). Es una medida indirecta porque la oxidación es llevada a cabo por un agente oxidante fuerte, en este caso dicromato potásico. Normalmente, se toma como una estimación de la materia orgánica contenida en la disolución, a pesar de las posibles especies no orgánicas reducidas contenidas en la muestra (Fe^{2+} , NO_2^- , S^{2-} , etc.). Por esta razón, el COD es un parámetro más preciso que la DQO para la determinación de materia orgánica en agua.

Las sustancias oxidables reaccionan con una disolución de ácido sulfúrico y dicromato de potasio en presencia de sulfato de plata como catalizador (APHA-AWWA-WEF, 1992). El cloruro se enmascara con sulfato de mercurio formando HgCl_2 y se valora la disminución de la coloración amarilla del Cr^{6+} (Ecuación 3.3).



Ec. 3.3

Procedimiento

Se agita la cubeta LCK 314 (rango de medida 15-150 mg L⁻¹ de DQO) para que el sedimento quede en suspensión. Esta cubeta contiene K₂Cr₂O₇, H₂SO₄, Ag₂SO₄ y HgSO₄ como reactivos. Una vez disueltos se pipetea 2 mL de muestra con cuidado. Se cierra la cubeta, se limpia el exterior y se invierte varias veces. Se introduce en un termostato Lange LT 200 a 148°C durante 2 h. Se saca la cubeta caliente, se invierte cuidadosamente dos veces y se deja enfriar a temperatura ambiente en una gradilla de enfriamiento. Se limpia bien el exterior de la cubeta y se introduce en el espectrofotómetro Hach Lange DR 5000 que lee el código de barras, selecciona automáticamente la longitud de onda de medida para el ensayo (448 nm) y ofrece el dato de DQO, en mg L⁻¹.

Control y calidad de la medida

El método puede emplearse para muestras (diluidas o no) con concentraciones de cloruro hasta 1500 mg L⁻¹. Un gran exceso de DQO puede llevar a la indicación de resultados dentro de la gama de medición. En este caso se recomienda realizar un control de verosimilitud de los resultados de medición mediante dilución. Todas las medidas se realizan por duplicado y periódicamente se realiza la medida de una disolución estándar (Addista, LCA 704).

3.7.3. Medida de la concentración del contaminante por HPLC

Descripción y fundamento teórico

Para evaluar la concentración de plaguicidas se ha empleado un cromatógrafo Shimadzu Lc10 con sistema de detección de diodos en línea UV/Vis Shimadzu MX-10Av. Está equipado con una unidad de desgasificación Shimadzu DGU-2A, con un módulo para el suministro de la fase móvil, una bomba analítica de alta presión de pistón y medio Shimadzu LC-10AT, un inyector automático Shimadzu SIL-10AD *VP* y un módulo Shimadzu CBM que permite realizar el control de todo el sistema y la adquisición de datos por medio del software LC-Class SPD MXA (Shimadzu Corporation).

En cromatografía líquida de alta resolución la fase móvil se bombea a alta presión por una columna pequeña que contiene partículas de fase estacionaria con un diámetro de entre 3 y 10 μm . A menor tamaño de partícula, más eficiente es la columna, pero mayor la resistencia que opone al flujo. Las partículas microporosas esféricas e irregulares con una superficie adsorbtiva o una fase líquida ligada son las más comunes. En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, los solutos menos polares eluyen primero y la retención del soluto se incrementa disminuyendo la polaridad de la fase móvil. En la cromatografía en fase reversa, con la que se trabaja en esta Memoria, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, los solutos más polares eluyen primero y la retención del soluto se incrementa aumentando la polaridad de la fase móvil. La elección del procedimiento de separación se basa en el tamaño, la polaridad y la naturaleza iónica del soluto. Puede emplearse elución isocrática (sin cambio de composición de la fase móvil durante el análisis) o en gradiente (con cambios de composición de la fase móvil durante el análisis) cuando el sistema es más complicado, por ejemplo, si se deben analizar varios contaminantes simultáneamente.

Después de pasar por la columna cromatográfica, el contaminante genera una señal en el detector UV/Vis en relación con su absorptividad y su concentración. La señal con forma Gaussiana es digitalizada mediante un software. Para la cuantificación existe una relación lineal entre el área de dicho pico y la concentración de la muestra, que se obtienen mediante calibración con disoluciones estándar del analito. Gracias al detector de red de diodos se puede visualizar el espectro completo en cada uno de los picos cromatográficos. Esta es una herramienta muy útil para la verificación de la identificación del compuesto mediante comparación con el espectro del patrón.

Procedimiento

Se diluye la muestra, con el disolvente orgánico utilizado en la fase móvil de modo que se guarde la proporción, normalmente, 1:1 y se filtra la mezcla a través de filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.20 μm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore). De esta manera las muestras se asemejan a la fase móvil y no desestabilizan el sistema al inyectarlas. También, al añadir el disolvente se para la reacción por desnaturalización del medio en la reacción de foto-Fenton.

Se enciende el equipo (controlador, bomba, desgasificador, inyector automático y detector) y, se purgan los canales de disolvente que se vayan a emplear. Una vez purgado el sistema, se cierra la válvula de purga, se seleccionan las longitudes de onda más

adecuadas para la cuantificación y se deja pasar la fase móvil a emplear hasta que la señal del detector sea estable. Se programa en el software del equipo la secuencia de inyección de modo que se realizan tres inyecciones por muestra con 20 μL de volumen de inyección y se especifica el método analítico a emplear. La selección de la fase móvil apropiada y las longitudes de onda características dependen del analito. En la Tabla 3.3 se muestran estas condiciones en función del contaminante a analizar.

Tabla 3.3. Condiciones del método de HPLC para los contaminantes estudiados.

| Contaminante | Fase móvil | flujo, mL min^{-1} | λ , nm | Columna | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--------------------------------|--------------------------|---|----|----|-----|----|----|----|----|------------------|----|----|----|----|-----|-------------------|---|
| fenol vanilina | MeOH/H ₂ SO ₄ 0.01 M 60/40 | 1 | 208 | XTerra MS C ₁₈ (150 4.6 mm, 5 μm) | | | | | | | | | | | | | | | |
| ácido oxálico ácido fórmico | KH ₂ PO ₄ 20 mM pH 2.9 | 1 | 220 | Synnergi Hidro-RP C ₁₈ (250 4.6 mm, 4 μm) | | | | | | | | | | | | | | | |
| alaclor | H ₂ O/Acetonitrilo 40/60 | 0.5 | 225 | XTerra MS C ₁₈ (150 4.6 mm, 5 μm) | | | | | | | | | | | | | | | |
| pirimetanil | H ₂ O/Acetonitrilo 50/50 | 0.5 | 270 | XTerra MS C ₁₈ (150 4.6 mm, 5 μm) | | | | | | | | | | | | | | | |
| metiloxidemeton metidation carbaril dimetoato | Acetonitrilo/H ₂ O 70/30 | 0.5 | 210 215 220 210 | LiChrosphere 100 RP- 18 (250 4 mm, 5 μm) | | | | | | | | | | | | | | | |
| oxamilo metomilo | | | 234 234 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| imidacloprid dimetoato pirimetanil | <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <thead> <tr> <th>t_r, min</th> <th>0</th> <th>7</th> <th>12</th> <th>18</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AcN</td> <td>15</td> <td>15</td> <td>80</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>85</td> <td>85</td> <td>20</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> | t_r , min | 0 | 7 | 12 | 18 | AcN | 15 | 15 | 80 | 80 | H ₂ O | 85 | 85 | 20 | 20 | 0.5 | 270 210 210 | Sunfire™ Waters C ₁₈ (150 3 mm, 5 μm) |
| t_r , min | 0 | 7 | 12 | 18 | | | | | | | | | | | | | | | |
| AcN | 15 | 15 | 80 | 80 | | | | | | | | | | | | | | | |
| H ₂ O | 85 | 85 | 20 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

Control y calidad de la medida

Antes de realizar las medidas se inyecta un patrón con una concentración dada y se comprueba que el área obtenida es coherente con el calibrado realizado. Además se verifica que los valores obtenidos por HPLC al inicio de los experimentos de foto-Fenton sean congruentes con la medida de COD. Por otro lado, debe ser coherente la masa de compuesto añadida con la concentración medida, conocido el volumen del reactor.

3.7.4. Medida de la concentración de hierro

Fundamento teórico

Los iones ferrosos forman un compuesto con tres moléculas de 1,10-fenantrolina (Ecuación 3.4) que tiene un color rojo-anaranjado. La disolución coloreada sigue la ley de Beer y su absorbancia no cambia en el rango desde pH 3 a 9. De este modo, la absorción

del compuesto medido a 510 nm es proporcional a la concentración de ión ferroso (APHA-AWWA-WEF, 1992).



Un pH en torno a 3-3.5 asegura un rápido y cuantitativo desarrollo del color. Por tanto, las medidas deben hacerse en disolución tampón. Agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, interfieren en el test porque oxidan el ión ferroso a ión férrico, que no forma complejos con el reactivo. Otros agentes complejantes, como cianuros, nitritos y polifosfatos, compiten con la fenantrolina por el ión ferroso y además otros metales pueden formar complejos con la fenantrolina o precipitarla. El color de las muestras también interfiere.

Procedimiento

La muestra se filtra previamente con filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.20 μm (Millex[®]-GN, 25 mm, Millipore). Entonces, si es necesario la muestra es diluida con agua destilada. 4 mL de la muestra filtrada y/o diluida son mezclados con 1 mL de una disolución de 1,10-fenantrolina (0.1% p/v en agua destilada) y 1 mL de disolución tampón (250 g L⁻¹ de acetato amónico y 700 mL L⁻¹ de ácido acético en agua destilada). Después de un minuto la absorbancia se mide a 510 nm en un espectrofotómetro (Hach Lange DR 5000) en el que se realiza un blanco preparado de la misma forma pero con agua destilada. Así se elimina la interferencia debido al color. Para la presente Memoria se realizó el calibrado: $[\text{Fe}] = 7.5733\text{Abs} + 0.0169$ $r^2 = 0.9999$ para un rango de concentración de ión ferroso de 0.5 a 7 mg L⁻¹.

Control y calidad de la medida

Periódicamente se realizan medidas de una disolución patrón de concentración de ión ferroso conocida. Además al comienzo de la reacción foto-Fenton la concentración de ión ferroso medida debe ser la misma que la requerida teóricamente (20 mg L⁻¹).

3.7.5. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno

3.7.5.1. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno mediante yodometría.

Fundamento teórico

En el presente trabajo el peróxido de hidrógeno se mide mediante yodometría (Kormann y cols., 1988). El principio es que un exceso de yoduro es añadido a la muestra en disolución ácida. Entonces, el agente oxidante reacciona cuantitativamente con el yoduro para formar una cantidad estequiométricamente equivalente de anión triyoduro (Ecuación 3.5). Mediante valoración la cantidad de anión triyoduro formado es determinada por adición de tiosulfato, que reacciona cuantitativamente hasta formar tetratiónato (Ecuación 3.6). El almidón forma un complejo coloreado con el ión triyoduro. Consecuentemente, en presencia del almidón como indicador la completa desaparición del ión triyoduro puede ser observada visualmente porque el color de la mezcla cambia hasta volverse transparente.



Procedimiento

Se añaden 20 mL de H_2SO_4 1 M y 25 mL de disolución de KI 0.2 M a un volumen de entre 1 a 50 mL de la muestra a medir. Si la muestra contiene peróxido de hidrógeno la disolución se torna color amarillo oscuro. La disolución se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente en una botella cerrada y protegida de la luz. Entonces se añaden 5-10 cucharadas de almidón (disolución comercial de almidón con yoduro de zinc) como indicador y la disolución se oscurece. Posteriormente, se realiza la valoración con una disolución 0.05 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La concentración de peróxido de hidrógeno se puede calcular con la Ecuación 3.7 asumiendo que todo el yoduro se oxida a triyoduro.

$$C_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{V_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} \cdot C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} \cdot PM_{\text{H}_2\text{O}_2}}{V_{\text{muestra}}} 1000, \text{ mg L}^{-1} \quad \text{Ec. 3.7}$$

donde $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ es el volumen de tiosulfato consumido en la valoración en mL, $C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}$ es la concentración de tiosulfato (mol L^{-1}), V_{muestra} es el volumen de la muestra problema en mL y $\text{PM}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ es el peso molecular del peróxido de hidrógeno.

Control y calidad de la medida

Periódicamente se realizan medidas de una disolución patrón de concentración de peróxido de hidrógeno conocida. Además al comienzo de la reacción foto-Fenton la concentración de peróxido de hidrógeno medida debe ser congruente con la cantidad de peróxido añadida.

3.7.5.2. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno mediante reacción con metavanadato.

Fundamento teórico

El peróxido de hidrógeno reacciona con el anión metavanadato dando lugar al catión VO_2^{3+} de color rojo-anaranjado (Ecuación 3.8).



La disolución sigue la ley de Beer y se puede medir la absorbancia a 450 nm siendo entonces la absorción proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno (Nogueira y cols., 2005).

El catión formado en la reacción es muy estable a temperatura ambiente (durante 180 h) para concentraciones de peróxido de hidrógeno menores de 3 mmol L^{-1} . Para mayores concentraciones, las muestras deben ser refrigeradas o diluidas. Además el método no muestra interferencias con Cl^- ($0.2\text{--}1.3 \text{ mmol L}^{-1}$), NO_3^- ($0.3\text{--}1.0 \text{ mmol L}^{-1}$) ni Fe^{3+} ($0.2\text{--}1.2 \text{ mmol L}^{-1}$). Comparado con el método yodométrico, el método con vanadato muestra una buena concordancia, sin embargo al tratarse de un método espectrofotométrico la medida de peróxido es inmediata frente a los 30 min necesarios para la yodometría. Por ello, se decide cambiar a este método en los últimos resultados presentados en esta Memoria (apartado 4.3.2.1).

Procedimiento

En un matraz aforado de 10 mL se añaden 5 u 8 mL de muestra (dependiendo si se espera una mayor o menor concentración de peróxido de hidrógeno, respectivamente). Se adicionan 1030 μL de metavanadato amónico (0.06 mol L^{-1} en 0.36 mol L^{-1} de ácido sulfúrico) y se enrasa con agua destilada hasta 10 mL. La absorbancia se mide a 450 nm en un espectrofotómetro (Hach Lange DR 5000) en el que se realiza un blanco preparado de la misma forma pero con agua destilada. Así se elimina la interferencia debido al color.

La concentración de peróxido de hidrógeno se puede calcular con la Ecuación 3.9 asumiendo que todo el metavanadato se oxida.

$$C_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}}} \frac{\text{Abs}_{450}}{283} \text{PM}_{\text{H}_2\text{O}_2} 1000, \text{ mg L}^{-1} \quad \text{Ec. 3.9}$$

donde V_{final} es el volumen del matraz aforado (10 mL), V_{muestra} es el volumen de muestra problema (5 u 8 mL), Abs_{450} corresponde al valor de la absorbancia medida a 450 nm, 283 es el valor del coeficiente de extinción molar (Nogueira y cols., 2005) y $\text{PM}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ es el peso molecular del peróxido de hidrógeno.

Control y calidad de la medida

Periódicamente se realizan medidas de una disolución patrón de concentración de peróxido de hidrógeno conocida. Además al comienzo de la reacción foto-Fenton la concentración de peróxido de hidrógeno medida debe ser congruente con la cantidad de peróxido añadida.

3.7.6. Medida de la concentración de $\text{NH}_4\text{-N}$

Fundamento teórico

Los iones amonio reaccionan, a un pH de 12.6, con iones hipoclorito e iones salicilato, en presencia de nitroprusiato sódico como catalizador, formando azul de indofenol. Este compuesto puede medirse espectrofotométricamente a 694 nm.

Procedimiento

Se retira el precinto de papel de aluminio de la cubeta LCK 303 (rango de medida 2-47 mg L⁻¹ NH₄-N; 2.5-60 mg L⁻¹ NH₄) y se desenrosca el tapón. Se pipetea 0.2 mL de muestra, se introducen en la cubeta y se rosca inmediatamente el tapón con la estría hacia arriba. Una vez que se agita enérgicamente se esperan 15 min (la medida se puede realizar solo entre estos 15 minutos y un máximo de 30 min; durante los cuales la absorbancia es constante) y se limpia bien el exterior de la cubeta. Se introduce en el espectrofotómetro Hach Lange DR 5000 que lee el código de barras, selecciona automáticamente la longitud de onda de medida para el ensayo (694 nm) y ofrece el dato de nitrógeno en forma de amonio, en mg L⁻¹.

Control y calidad de la medida

Un exceso de amonio puede llevar a la indicación de resultados dentro de la gama de medición. En este caso se realiza un control de verosimilitud mediante dilución de la muestra. Asimismo, periódicamente se realiza la medida de una disolución estándar (Addista, LCA 700).

3.7.7. Medida de la concentración de NO₃-N

Fundamento teórico

Los iones nitrato de la muestra reaccionan con el 2,6-dimetilfenol presente en una disolución de 2,6-dimetilfenol, ácido sulfúrico y fosfórico, formando 4-nitro-2,6-dimetilfenol que puede medirse espectrofotométricamente a 370 nm.

Procedimiento

Se pipetea lentamente sobre la cubeta LCK 339 (rango de medida 0.23-13.5 mg L⁻¹ NO₃-N; 1-60 mg L⁻¹ NO₃) 1 mL de muestra. A continuación, se pipetea igualmente despacio 0.2 mL de solución LCK 339 A y se cierra la cubeta invirtiéndola varias veces hasta completa disolución. Transcurridos 15 min se limpia bien el exterior de la cubeta. Se introduce en el espectrofotómetro Hach Lange DR 5000 que lee el código de barras, selecciona automáticamente la longitud de onda de medida para el ensayo (370 nm) y ofrece el dato de nitrógeno en forma de nitrato, en mg L⁻¹.

Control y calidad de la medida

Al igual que en el ensayo de amonio, periódicamente, se realiza un control de verosimilitud de los resultados de medición mediante dilución de la muestra. Asimismo, periódicamente se realiza la medida de una disolución estándar (Addista, LCA 703).

3.7.8. Medida de la concentración de biomasa de *P. putida*

Fundamento teórico

La turbidimetría mide la cantidad relativa de sólidos suspendidos en agua o líquidos similares siendo una medida del efecto de absorción/dispersión que estos sólidos tienen sobre la luz. La cantidad de luz dispersada por cualquier partícula depende del tamaño de la partícula, la forma, composición e índice de refracción.

Es un método rápido para estimar el número de bacterias en disolución usando un espectrofotómetro, ya que la bacteria absorbe la luz en proporción a su concentración celular (tamaño o número). Así, cuando un microorganismo crece en tamaño o número provoca un aumento en la turbidez del cultivo. Dicha turbidez puede ser medida como densidad óptica (absorción de luz, normalmente medida a una longitud de onda entre 520 y 700 nm). De este modo, para cualquier microorganismo se puede construir una curva estándar de crecimiento en la que se relacione concentración de microorganismos (determinados por peso seco) y la medida de densidad óptica (determinada mediante espectrofotometría).

Las medidas en continuo de biomasa (en reactor) se realizan con un turbidímetro. Este equipo proporciona la señal en unidades nefelométricas de turbidez (NTU) que también pueden relacionarse igualmente con la biomasa bacteriana (determinada mediante peso seco). El turbidímetro contiene una lámpara de infrarrojo y dos detectores, uno colocado a 180° para medir la luz transmitida y otro perpendicular al anterior para medir la luz dispersada. Así, proporciona dos señales (luz transmitida y dispersada) y la relación que existe entre estas que es el ratio (R). Los datos de ratio se pueden convertir en unidades nefelométricas de turbidez (NTU) ya que valores de 0 a 10 de ratio corresponden a 0 y 4000 NTUs. Utilizando el ratio como medida de turbidez el intervalo de trabajo y la sensibilidad aumentan y disminuye el ruido.

El turbidímetro Lange Ultraturb *plus SC* (Figura 3.10) consiste en una célula de flujo en la que se introduce medio de forma continua con una bomba peristáltica. Además posee sistema de autolimpieza. La adquisición de datos se lleva a cabo a través del puerto serie y se registra en un ordenador.



Figura 3.10. Turbidímetro Lange Ultraturb *plus SC* para medida de la turbidez del medio.

Procedimiento

Se inoculan 800 μL de un stock de *P. putida* en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 200 mL de medio de cultivo (extracto de buey, 1 g L^{-1} , extracto de levadura, 2 g L^{-1} , peptona, 5 g L^{-1} , NaCl, 5 g L^{-1} y agar, 15 g L^{-1} a pH 7.2.) y se mantiene en agitación (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Se realizan 5 diluciones de modo que la disolución más concentrada tenga una absorbancia en torno a 0.7 medida a 600 nm (Wang y Loh, 1999) en un espectrofotómetro Hach Lange DR 5000. Cada disolución se filtra a vacío con un equipo de filtración a vacío Millipore a través de un filtro de 47 mm de diámetro (previamente pesado) de 0.22 μm de tamaño de poro. Una vez filtrada la muestra, la biomasa se congela y posteriormente se liofiliza, en un liofilizador Edwards (Modulo-4K) con lo que se deshidrata la biomasa congelada (por sublimación a vacío). La biomasa debe permanecer en el sistema por un periodo de, al menos 24 horas, transcurrido el cual la biomasa resulta deshidratada. Se pesa el filtro con la biomasa liofilizada, se resta el valor del filtro y de este modo se obtienen los gramos de biomasa seca por volumen de disolución filtrada. Cada muestra se realiza por triplicado. El calibrado así obtenido sigue la Ecuación 3.10, que relaciona la biomasa X con la densidad óptica (DO) medida a 600 nm:

$$X, \text{ g L}^{-1} = 0.4033\text{DO}_{600} - 0.0057, r^2 = 0.988 \quad \text{Ec. 3.10}$$

Mediante la utilización de un turbidímetro se sigue la biomasa en continuo de los ensayos en biorreactor. Para ello se inocula un biorreactor NBS Bioflo III con 5 L del mismo

medio de cultivo anterior con 5 mL de un stock bacteriano. El pH se ajusta a 7 y se lleva a cabo el cultivo con una aireación de 3 L min^{-1} y con una agitación de 400 rpm. Se realizan 5 diluciones del mismo modo que en el calibrado con matraces y se mide el ratio R para cada disolución. De este modo se relaciona la biomasa bacteriana X (obtenida al igual que con matraces mediante liofilización) con la señal que proporciona el turbidímetro mediante la Ecuación 3.11.:

$$X, \text{ g L}^{-1} = -0.6617R^2 + 1.7867R - 0.0997, r^2 = 0.999 \quad \text{Ec. 3.11}$$

Control y calidad de la medida

De forma regular se mide la absorbancia a 600 nm y R de una disolución estándar de 100 NTU (StablCal® Standard, Hach Lange).

3.7.9. Medida de los sólidos totales y volátiles en suspensión

La biomasa del fango activo se determina gravimétricamente (APHA-AWWA-WEF, 1992) midiendo los sólidos totales en suspensión (STS) y los sólidos volátiles en suspensión (SVS).

Un volumen determinado de muestra se mezcla bien y se filtra a través de filtros (previamente secados y pesados) de micro-fibra de vidrio (150 mm, Whatman®) que no dejan cenizas en su ignición. Después, el residuo retenido en el filtro se seca a 100°C hasta peso constante. El incremento de masa corresponde a los STS, que incluyen todas las partículas suspendidas retenidas en el filtro (Ecuación 3.12).

$$STS = \frac{(A - B) \cdot 1000}{V_{\text{muestra}}} \quad \text{Ec. 3.12}$$

donde A es el peso del filtro más el residuo seco y B es el peso del filtro, ambos en g. El volumen de muestra se expresa en L por lo que las unidades de STS son g L^{-1} .

El filtro y residuo se introducen en un horno-mufla (Nannetti FM 75) a 550°C hasta peso constante. El peso perdido durante la combustión equivale a los SVS (Ecuación 3.13) e incluye el contenido orgánico disuelto de la muestra.

$$SVS = \frac{(A - C) \cdot 1000}{V_{muestra}} \quad \text{Ec. 3.13}$$

donde A es el peso del filtro más el residuo antes de la ignición y C es el peso del filtro más el residuo después de la ignición, ambos en g. El volumen de muestra se expresa en L y unidades de STS se expresan g L⁻¹. La ceniza sólida que permanece, de naturaleza inorgánica, son los Sólidos Totales Fijos (STF).

3.7.10. Medida de la radiación UV

Descripción y fundamento teórico

En esta Memoria la medida de la irradiancia UV global inclinada a 37° (latitud local) y orientada hacia el Ecuador (al igual que las plantas piloto solares) se considera la más apropiada para describir la irradiancia que llega al captador solar. La medida de la radiación global es más adecuada que la medida de la radiación directa por la naturaleza de los captadores CPC, que son capaces de utilizar la radiación global.

El radiómetro empleado es un radiómetro UV Zipp & Zonen CUV3 de banda ancha. El instrumento tiene sensibilidad en el rango UV de 285 a 400 nm. El diseño está basado en una combinación de difusor, filtro y fotodiodo, cuyo difusor asegura la respuesta angular correcta. El fotodiodo genera un voltaje de salida proporcional al número de fotones incidentes, pero cada longitud de onda tiene su propio factor de atenuación causado por el filtro.

Control y calidad de la medida

Una vez instalado, el radiómetro no requiere prácticamente mantenimiento. Únicamente se limpia semanalmente y se comparan los valores obtenidos con los obtenidos en la misma época de años anteriores. Debido a las dificultades de la medida su error es de alrededor del 5%. Se recomienda su calibración cada 3 años o cuando se detecten errores en la medida mediante comparación de datos tomados en las mismas condiciones ambientales en años sucesivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Biodegradación de intermedios modelo generados en los PPOA mediante *Pseudomonas putida* CECT 324

El tratamiento parcial de un agua que contiene compuestos tóxicos mediante un POA suele generar intermedios más biodegradables. Sin embargo, se debe tener en cuenta que algunos de estos intermedios pueden no ser biodegradables y ser también tóxicos o inhibitorios del crecimiento de los microorganismos, en ocasiones incluso más que el compuesto original. Por tanto, es necesario evaluar la biodegradabilidad y toxicidad de la mezcla de intermedios. De esta forma, se puede determinar si es posible acoplar posteriormente un tratamiento biológico para conseguir la completa depuración del agua residual sin que los microorganismos empleados se vean afectados.

La mayoría de trabajos publicados a este respecto evalúan variables globales como DBO₅, DQO, COD, EC₅₀, etc. para estimar la biodegradabilidad o toxicidad de los intermedios generados en los PPOA (Sarria y cols., 2002; Oller y cols., 2007c). Sin embargo, son muy escasas las publicaciones que tienen en cuenta la cinética de biodegradación. Asimismo, debido a la complejidad del proceso, la mayoría de estudios cinéticos realizados deben asumir en el modelo cinético que el sustrato es el COD o la DQO (debido a la gran cantidad de intermedios existentes en el agua parcialmente tratada) y la biomasa se cuantifica como los SVS dado que se realizan con fangos activos (Eckenfelder y Musterman, 1995; Beltrán y cols., 1999a; Ledakowicz y cols., 2001), por lo que no se puede tener en cuenta cómo la biodegradación de algunos intermedios puede afectar al consumo de otros.

Por consiguiente, el objetivo de esta parte de la investigación es estudiar los efectos cinéticos sobre el proceso biológico a los que da lugar la degradación de una mezcla de intermedios modelo generados en una oxidación parcial con un POA. Para realizar el tratamiento biológico se emplea *Pseudomonas putida* CECT 324 como microorganismo modelo, debido a que es una de las bacterias mayoritarias en los fangos activos.

Para llevar a cabo la biodegradación se parte de una disolución donde la única fuente de carbono viene dada por dos compuestos aromáticos, vanilina y fenol y dos ácidos carboxílicos de cadena corta, ácido fórmico y oxálico (Figura 4.1). Estas sustancias se encuentran frecuentemente en un agua contaminada con plaguicidas que es tratada

parcialmente con un POA (Malato y cols., 2001; Konstantinou y Albanis, 2003; Herrmann, 2005; Pérez-Estrada y cols., 2005b; Pérez-Estrada y cols., 2007). Por tanto, esta disolución acuosa forma un agua residual sintética que simula el efluente de un tratamiento previo con un POA.

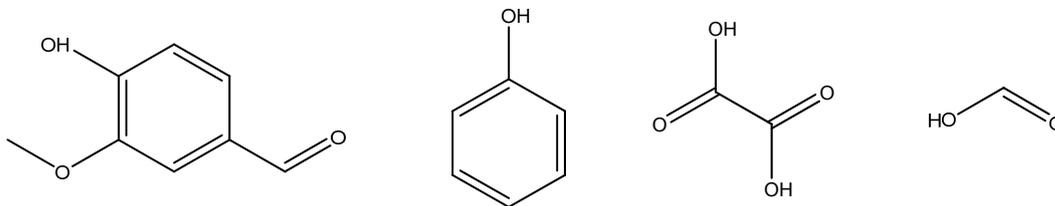


Figura 4.1. Estructura química de vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico.

Inicialmente se determina qué concentración de los intermedios modelo puede inhibir el crecimiento del microorganismo cultivando *P. putida* en matraces con diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados. Posteriormente, a la concentración seleccionada (en la que el crecimiento bacteriano es máximo) se lleva a cabo un estudio del efecto del pH y la temperatura en el consumo de los intermedios modelo.

Debido a las condiciones ácidas con las que se trabaja normalmente en el pretratamiento con el POA seleccionado en este trabajo (foto-Fenton), el efluente se genera con un pH en torno a 3 (Nogueira y Cuimaraes, 2000; Pérez-Estrada y cols., 2005a; Pignatello y cols., 2006) y es necesario realizar un ajuste del pH antes de pasar al postratamiento biológico. Es pues crucial el estudio de la influencia del pH en el desarrollo del tratamiento biológico para el diseño del biorreactor. Para ello, se realizaron dos ensayos (a pH 5 y pH 7) y un tercer experimento se llevó a cabo sin control de pH comenzando a pH 6.

La temperatura seleccionada para el estudio de la influencia del pH fue 30°C, referenciada como la óptima para la degradación de fenol por *P. putida* (Hill y Robinson, 1975; Yang y Humphrey, 1975). En las mejores condiciones de pH, el efecto de la temperatura se estudió a 25°C y 35°C, cubriendo un intervalo de 10°C alrededor del óptimo.

Finalmente, para cada valor de pH y temperatura ensayado se plantea el consumo cinético de cada intermedio. Con el modelo cinético propuesto se tiene en cuenta la interacción entre especies químicas y la cinética individual de cada sustrato.

4.1.1. Estudio de la concentración mínima de intermedios modelo inhibitoria del crecimiento bacteriano

Para caracterizar un proceso biológico es necesario determinar previamente qué concentración de sustrato puede ser degradada por el microorganismo, ya que elevadas concentraciones pueden tener un efecto inhibitorio para este.

Las aguas provenientes del tratamiento mediante PPOA pueden contener un amplio intervalo de concentración de intermedios; entre 40 y 300 mg L⁻¹ de COD (García-Montaño y cols., 2006a; Farré y cols., 2007; Oller y cols., 2007c; Malato y cols., 2007a). Los PPOA suelen aplicarse a aguas que poseen un bajo contenido orgánico, siendo la concentración máxima admisible de unos 500 mg L⁻¹ de COD (Ollis, 2001; Sarria y cols., 2002; Malato y cols., 2007b). Consecuentemente, para evaluar si ésta u otras concentraciones inhiben el crecimiento de *P. putida* es necesario realizar un ensayo previo, cultivando dicha bacteria con diferentes cantidades de los intermedios modelo seleccionados.

Para realizar este estudio se cubre un intervalo amplio de concentración desde 25 a 500 mg L⁻¹ de COD. Así, se ensayan las siguientes concentraciones: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹ de COD del conjunto de intermedios modelo (fenol, vanilina, ácido fórmico y ácido oxálico) en 33 matraces Erlenmeyer de 100 mL (tres réplicas para cada concentración), conteniendo el medio mineral indicado en apartado 3.2. Los cuatro intermedios se adicionan de modo que guardan una relación molar 1:1:1:1 y esta relación se sigue en el resto de experimentos en los que se trabaja con los cuatro intermedios. El inóculo proviene de un stock mantenido a -70°C (preparado según se describe en los apartados 3.1 y 3.2) y se utiliza un volumen en cada matraz de 30 µL. Para seguir la concentración de biomasa se mide la absorbancia a las 24 h.

Para este experimento, se obtiene una gráfica (Figura 4.2) en la que la concentración de biomasa bacteriana asciende al aumentar la concentración de intermedios desde 25 hasta 150 mg L⁻¹ con un rendimiento en biomasa en este punto de 0.93 ± 0.08 g g⁻¹, debido a que la concentración inicial de biomasa es de 35.4 mg L⁻¹. A partir de un COD de 175 mg L⁻¹ se aprecia una caída brusca en la concentración de biomasa y en el rendimiento de biomasa en sustrato que se mantienen prácticamente constantes a mayores concentraciones. Se puede deducir, por tanto, que ésta es la concentración mínima de intermedios modelo inhibitoria del crecimiento de la bacteria. Así, en los experimentos posteriores en biorreactor tipo tanque agitado se trabaja como máximo con concentraciones de 150 mg L⁻¹.

La absorbancia se mide también a las 48 y 72 h obteniéndose a los dos tiempos la misma tendencia en la concentración de biomasa y la caída brusca en la biomasa a partir de los 175 mg L⁻¹ de COD, por consiguiente, la concentración mínima inhibitoria no se ve afectada por el tiempo de biodegradación.

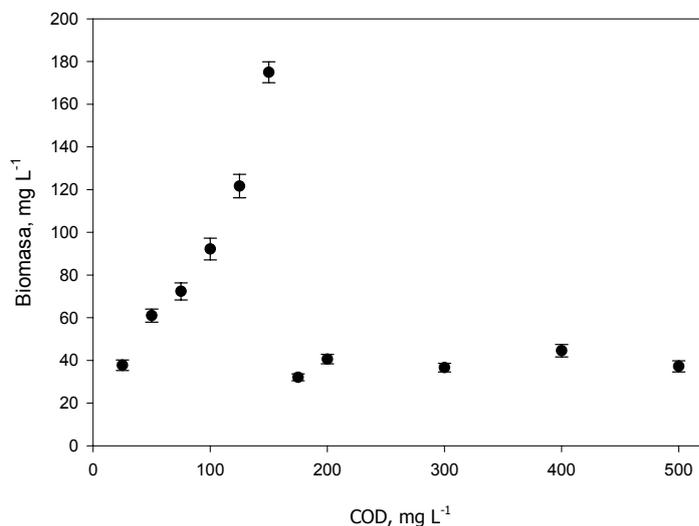


Figura 4.2. Efecto de la concentración de la mezcla de vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico en el crecimiento de *P. putida* CECT 324 después de 24 h de biodegradación a 30°C. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las muestras realizadas por triplicado.

4.1.2. Efecto del pH en la degradación de los intermediarios modelo mediante *P. putida*

La neutralización es un paso imprescindible cuando se pretende acoplar un proceso foto-Fenton, que se realiza a pH en torno a 2.8-2.9, con un tratamiento biológico. Para el caso de un tratamiento biológico con la bacteria *P. putida* cabría esperar que el pH al que se debe ajustar el efluente tratado fotoquímicamente sería en torno a 7 puesto que se considera un microorganismo neutrófilo (apartado 1.5.1.1). Sin embargo resulta muy interesante la posibilidad de abaratar los costes del proceso realizando un control de pH a valores más bajos (con el consecuente ahorro de disolución básica) o incluso realizar el ajuste de pH sólo al comienzo del proceso biológico y proseguir la biodegradación sin realizar un control del pH (evitando complementar el reactor con un sistema de control de pH). Para ello se realizaron dos ensayos controlando el pH mediante adición de ácido o base a pH 7 y pH 5 y un tercer experimento se llevó a cabo sin control de pH comenzando a pH 6.

El estudio se realizó en un reactor tanque agitado New Brunswick Scientific Bioflo III manteniendo una temperatura de 30°C. En todos los ensayos los intermedios modelo son la única fuente de carbono; vanilina, 111.8 mg L⁻¹ (COD=70.6 mg L⁻¹), fenol, 69.2 mg L⁻¹ (COD=52.9 mg L⁻¹), ácido oxálico, 66.2 mg L⁻¹ (COD=17.6 mg L⁻¹) y ácido fórmico, 33.8 mg L⁻¹ (COD=8.8 mg L⁻¹). De este modo el COD aportado por los intermedios es de 150 mg L⁻¹.

En la Tabla 4.1 se muestra la secuenciación en los tiempos de consumo. Vanilina y ácido fórmico son consumidos de forma simultánea durante un periodo de tiempo muy corto, entre 13 y 18 h a pH 5, siendo la media de los tiempos de consumo de ambos 15.8 ± 1.9 h para los tres ensayos. Estos tiempos están en el intervalo de los observados para la biodegradación de 40 mg L⁻¹ de tolueno y benceno mediante *P. putida* F1 a 30°C y pH 6.7-6.9 (Reardon y cols., 2000).

Tabla 4.1. Efecto del pH en la degradación de los sustratos ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico mediante *P. putida* CECT 324 a 30°C.

| pH | Ácido fórmico | Vanilina | Fenol | Ácido oxálico |
|-------------------|---------------|----------|-------|---------------|
| | | | | |
| 5 | 13 | 18 | 32 | 46 |
| 7 | 17 | 17 | 28 | 22 |
| 6 (no controlado) | 14 | 16 | 46 | 53 |

Para el consumo de fenol y ácido oxálico la variación en los tiempos de consumo es mucho más amplia. Así, a pH 7 únicamente se necesitan 28 h para degradar completamente el fenol (siendo éste incluso el último intermedio en consumirse a este pH). A pH 5 únicamente son necesarias cuatro horas más, sin embargo, el ácido oxálico se degrada 24 h después respecto al experimento a pH 7. Los tiempos de consumo de fenol encontrados en bibliografía varían mucho dependiendo del pH, temperatura, concentración inicial, adaptación previa, etc. Así, *P. putida* degrada 25 mg L⁻¹ de fenol en 15 h a 26°C (Monteiro y cols., 2000), o concentraciones mayores (500 mg L⁻¹) en un mayor tiempo (35 h) a 25°C (García Sánchez y cols., 1998). Si *P. putida* se adapta previamente puede degradar 1000 mg L⁻¹ en tan sólo 24 h a 28°C (Pazarlioğlu y Telefoncu, 2005) o 500 mg L⁻¹ si se inmoviliza en alginato cálcico en menos de 20 h, a pH 7 y 30°C (Bandhyopadhyay y cols., 2001).

En el experimento sin control de pH se observa un crecimiento significativamente diferente a las de pH controlado, ya que cada variación de pH sustancial en el transcurso de la biodegradación viene acompañada de un cambio en la concentración de biomasa.

Cuando el ácido fórmico y vanilina están siendo degradados, el pH comienza a bajar descendiendo hasta 4.7 desde el valor inicial de 6. Posteriormente, el pH nuevamente disminuye, siendo en este caso, el descenso más lento que el anterior hasta pH 4; cuando el fenol se ha degradado por completo a las 46 h. En último lugar, el pH recupera su valor inicial al final del proceso, cuando concluye la biodegradación del ácido oxálico (53 h). El cambio en dos unidades de pH no afecta a la molécula de vanilina ($pK_a=7.38$ a 298 K), al fenol ($pK_a=9.98$ a 298 K) ni al ácido fórmico ($pK_a=3.77$ a 298 K) ya que las dos sustancias aromáticas permanecen en su forma alcalina hasta su consumo y el ácido fórmico se encontraría disociado. Sólo el ácido oxálico se afecta en su segunda disociación cuando el pH baja hasta 4 ya que se encuentra por debajo de su pK_{a2} ($pK_{a1}=1.30$, $pK_{a2}=4.30$ a 298 K). Esta podría ser la causa del consumo más lento del ácido oxálico que se produce en estas condiciones de pH respecto a los otros experimentos.

Un estudio cualitativo de los resultados presentados provee un patrón de consumo para un modelo matemático aproximado. De este modo, a todos los valores de pH ensayados, vanilina y ácido fórmico son degradados en las primeras horas, dando lugar a un crecimiento exponencial en la biomasa bacteriana. Una vez que ambos sustratos son consumidos, se observa una fase de adaptación a los nuevos sustratos, y finalmente, las células son capaces de degradar el fenol y el ácido oxálico.

Vanilina y ácido fórmico se consideran sustratos no inhibitorios del crecimiento, puesto que se consumen rápidamente en los primeros estadios de la biodegradación. Además, como simplificación, se considera que el crecimiento debido al consumo de estos sustratos representa una cinética de Monod (Ecuación 4.1):

$$\mu_i = \frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{S,i} + S_i} \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde la constante $K_{S,i}$ indica la habilidad del microorganismo para crecer a bajos niveles de sustrato i .

Por el contrario, son numerosas las referencias que ponen de manifiesto la cinética inhibitoria que conlleva el consumo de fenol por *P. putida* (Hill y Robinson, 1975; Reardon y cols., 2000; Kumar y cols., 2005). Este mismo comportamiento es observado en los experimentos realizados, y, puesto que el ácido oxálico sigue unas pautas de degradación similares a las del fenol, se puede considerar también como inhibitorio del crecimiento. Para obtener las velocidades de crecimiento específicas debido al consumo de dichos

sustratos se emplea, por tanto, el modelo de Andrews (Andrews, 1968). Este modelo se escogió por su simplicidad matemática y su amplia aceptación para representar la cinética del crecimiento con sustratos inhibitorios (Ecuación 4.2):

$$\mu_i = \frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{S,i} + S_i + \frac{S_i^2}{K_{I,i}}} \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde K_i es la constante de inhibición, que indica el grado de inhibición que produce un sustrato al crecimiento del microorganismo.

Además, para tener en cuenta la posibilidad de interacciones entre sustratos que son estructuralmente similares, se incluye una nueva constante (I_{ij}) que indica el grado en que el sustrato j afecta a la biodegradación del sustrato i (valores grandes indican una fuerte interacción). Esta constante se incluye en la ecuación que caracteriza el crecimiento de las dos sustancias cuyo consumo pueda verse afectado, fenol y ácido oxálico, por la presencia de vanilina y ácido fórmico, respectivamente. De este modo la ecuación de Andrews se modifica como se presenta en la Ecuación 4.3:

$$\mu_i = \frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{S,i} + S_i + \frac{S_i^2}{K_{I,i}} + I_{i,j} S_j} \quad \text{Ec. 4.3}$$

La Ecuación 4.3 se emplea cuando existe inhibición cruzada competitiva (Wang y cols., 1996; Juang y Tsai, 2006), sin embargo, los datos experimentales se ajustan mejor a un caso de inhibición cruzada anticompetitiva por lo que la ecuación que define la velocidad de crecimiento es la Ecuación 4.4. También es inhibición cruzada anticompetitiva el consumo de fenol en presencia de glucosa y otras fuentes de energía (Baltzis y cols., 1996; Ajbar, 2001). En esta ecuación, al incluir S_i en el término multiplicativo no sólo se tiene en cuenta cómo afecta el consumo del sustrato que interacciona (S_j) sino también el propio consumo del sustrato en cuestión (S_i).

$$\mu_i = \frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{S,i} + S_i + \frac{S_i^2}{K_{I,i}} + I_{i,j} S_i S_j} \quad \text{Ec. 4.4}$$

Finalmente, para tener en cuenta el consumo de todos los sustratos podría ser razonable el uso de una cinética sumatoria con interacciones entre sustratos. El modelo que agrupa estas premisas es el modelo suma de cinéticas con parámetros de interacción (SKIP, siglas en inglés de sum kinetics with interaction parameters) que fue propuesto por Yoon (Yoon y cols., 1977) y ha sido empleado recientemente por otros autores (Reardon y cols., 2000; Abuhamed y cols., 2004) para describir la cinética de biodegradación de benceno, tolueno y fenol como una mezcla de sustratos para *P. putida*. Dicho modelo tiene en cuenta cómo el consumo de un sustrato por parte del microorganismo afecta a la degradación de otro y refleja la cinética global como una suma de cinéticas, por lo que la velocidad específica de crecimiento debido al consumo de la mezcla de los cuatro sustratos se expresaría mediante la Ecuación 4.5:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,fo} S_{fo}}{K_{S,fo} + S_{fo}} + \frac{\mu_{\max,va} S_{va}}{K_{S,va} + S_{va}} + \frac{\mu_{\max,fe} S_p}{K_{S,fe} + S_{fe} + (S_{fe}^2 / K_{I,fe}) + I_{fe,va} S_{fe} S_{va}} + \frac{\mu_{\max,ox} S_{ox}}{K_{S,ox} + S_{ox} + (S_{ox}^2 / K_{I,ox}) + I_{ox,fo} S_{ox} S_{fo}} \quad \text{Ec.4.5}$$

donde fo, va, fe y ox representan al ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico.

Para calcular los parámetros del modelo se utilizaron las Ecuaciones 4.6 y 4.7 que representan la variación de concentración de biomasa y sustrato con el tiempo:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X \quad \text{Ec. 4.6}$$

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{\mu_i X}{Y_{X/S_i}} \quad \text{Ec.4.7}$$

El efecto del pH en la capacidad de biodegradación de *P. putida* y el ajuste del modelo propuesto para cada valor de pH se muestran en las Figuras 4.3-4.5. En estas se observan diferentes patrones de consumo y se evidencia un consumo secuencial para cada uno de los cuatro sustratos.

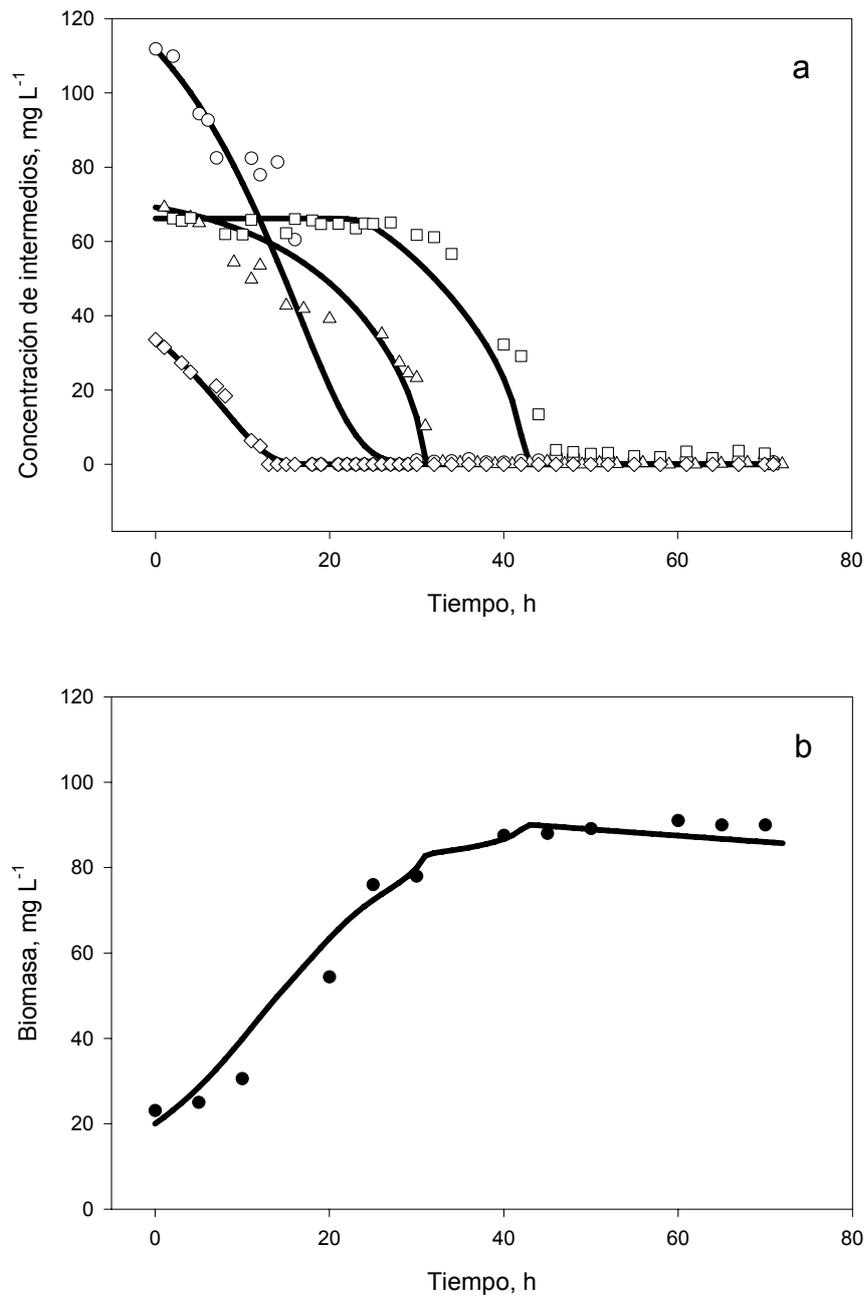


Figura 4.3. Biodegradación en discontinuo de la mezcla de ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico a 30°C y pH 5 mediante *P. putida* CECT 324. a) (◇) Ácido fórmico, (○) vanilina, (△) fenol y (□) ácido oxálico. b) (●) Concentración de biomasa. Las líneas representan las estimaciones del modelo.

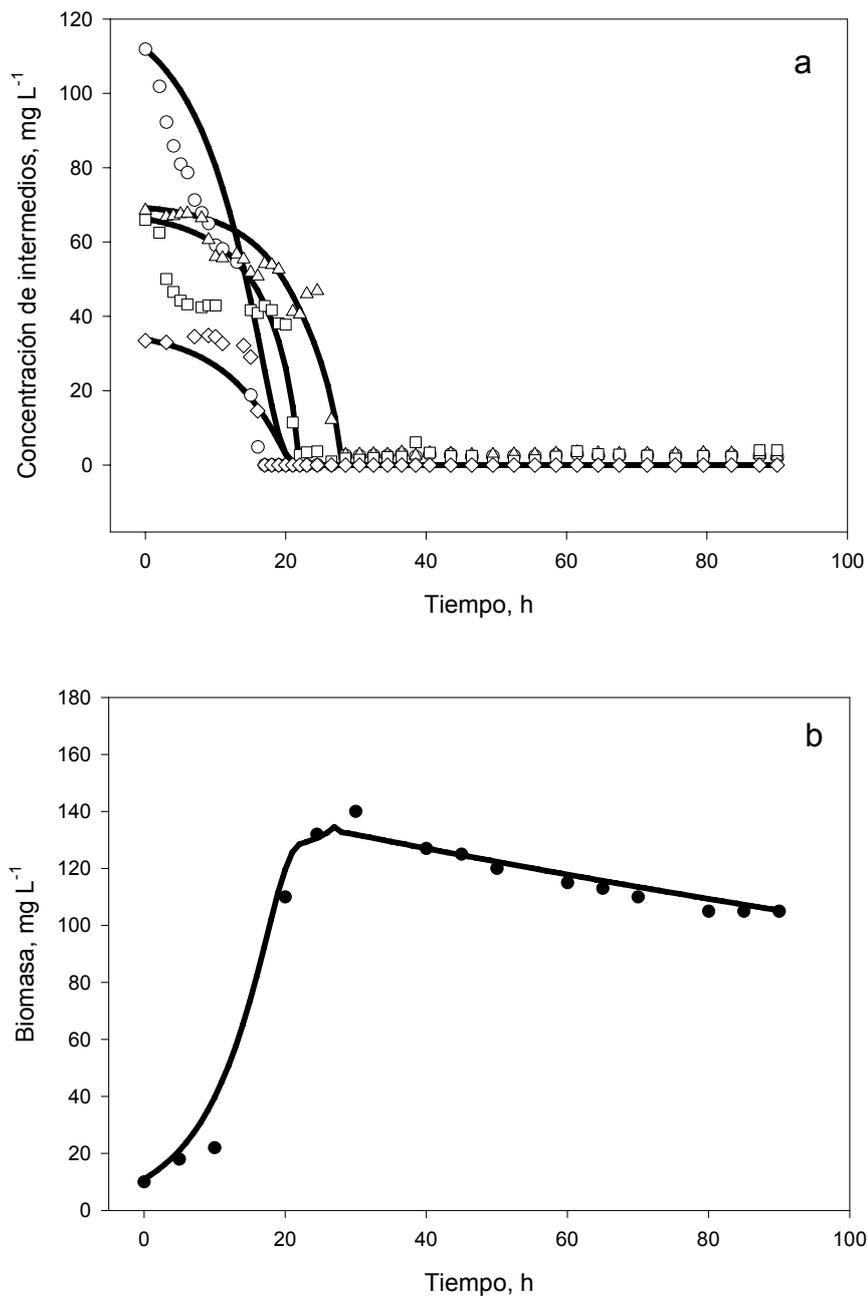


Figura 4.4. Biodegradación en discontinuo de la mezcla de ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico a 30°C y pH 7 mediante *P. putida* CECT 324. a) (◇) Ácido fórmico, (○) vanilina, (△) fenol y (□) ácido oxálico. b) (●) Concentración de biomasa. Las líneas representan las estimaciones del modelo.

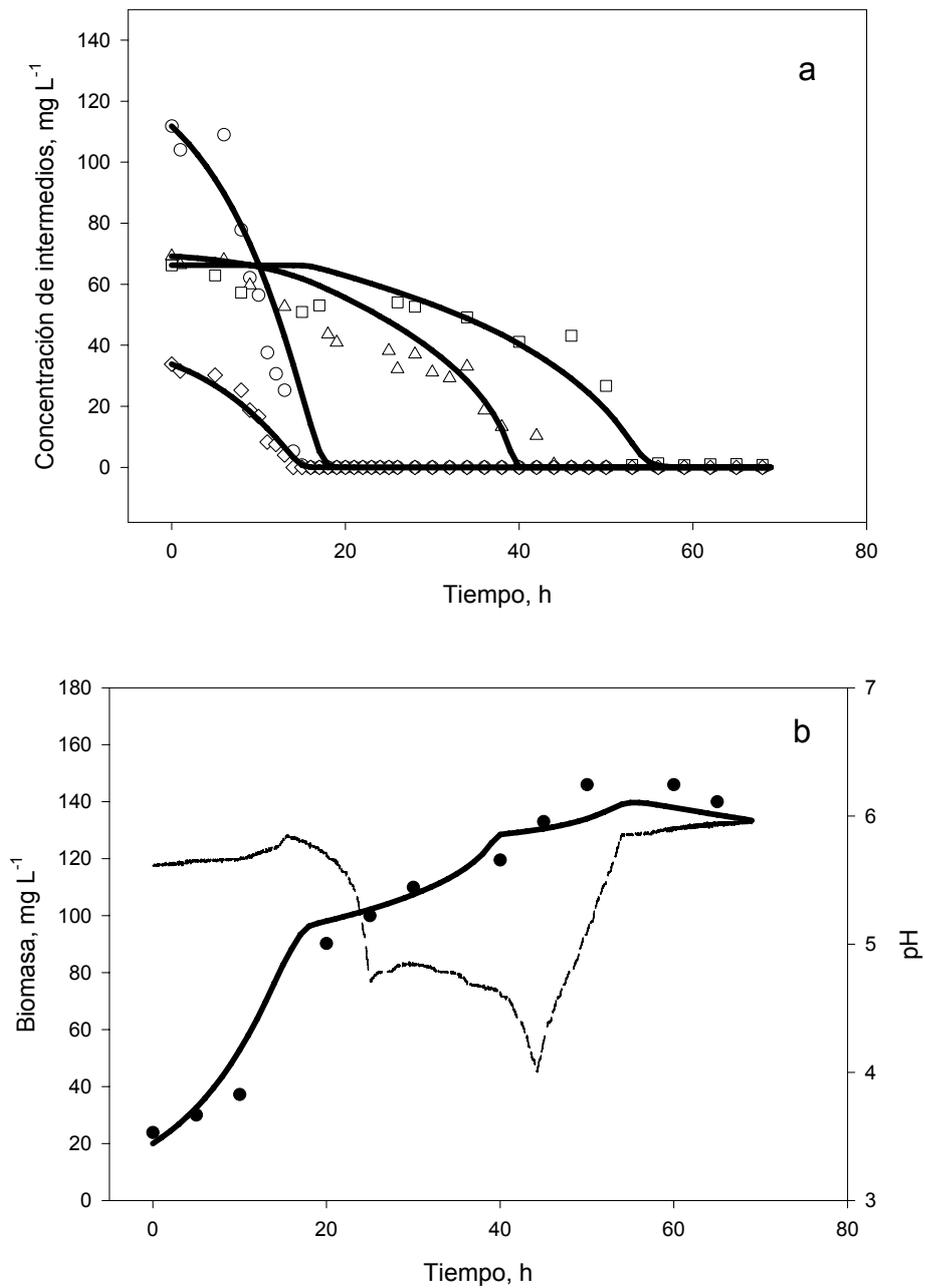


Figura 4.5. Biodegradación en discontinuo de la mezcla de ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico a 30°C mediante *P. putida* CECT 324. El pH inicial fue 6 y se mantuvo el cultivo sin control de pH. a) (◇) Ácido fórmico, (○) vanilina, (△) fenol y (□) ácido oxálico. b) (●) Concentración de biomasa y pH (línea punteada). Las líneas representan las estimaciones del modelo.

Los parámetros del modelo se determinaron aplicando el criterio de mínimos cuadrados, ajustando las Ecuaciones 4.6 y 4.7 a los datos experimentales, mediante el empleo del programa Matlab™ (ver. 6.5) con las funciones incluidas en su librería de optimización. Para acotar los valores inferiores y superiores de los parámetros del modelo se escogieron los más representativos encontrados en bibliografía. La función objetivo (Ecuación 4.8) minimizada se definió empleando una función del espacio de estados, X_{exp} , que es un vector que se construye con la secuencia de las concentraciones de cada sustrato y biomasa medidos experimentalmente (pudiendo tener un número de puntos diferentes). Igualmente, los resultados de la simulación se obtuvieron para los intervalos de tiempo de los datos experimentales, formando el espacio de estado vectorizado con los datos simulados, X_{mod} . La función objetivo, J (Ecuación 4.8), se define entonces como las diferencias cuadradas promedio entre los valores experimentales y los obtenidos del modelo y está normalizada por los valores experimentales:

$$J = \sum_{i=1}^N \left(\frac{X_{exp} - X_{mod}}{X_{exp}} \right)^2 \quad \text{Ec.4.8}$$

La Tabla 4.2 muestra los valores de los parámetros del modelo para los experimentos a distintos valores de pH. Con estos valores, un análisis general muestra que las velocidades específicas máximas de crecimiento para cada sustrato son bajas, siendo el mayor valor en todos los casos para el ácido oxálico. A pH controlado (5 y 7) los coeficientes de rendimiento de biomasa en sustrato son mayores para el ácido fórmico y la vanilina y decrecen para el fenol y el ácido oxálico siendo particularmente mejores cuando el pH es el óptimo referenciado. En el experimento sin control de pH $Y_{X/S}$ está en torno a 0.5 independientemente del sustrato consumido. Además, los valores encontrados para K_S se encuentran en el rango de los encontrados en bibliografía (Hill y Robinson, 1975; Dikshitulu y cols., 1993; Seker y cols., 1997; Reardon y cols., 2000; Abuhamed y cols., 2004) sin observarse tendencia general para ningún sustrato. A modo comparativo, la constante de saturación a 30°C para el fenol es menor a 1 mg L⁻¹ con *P. putida* ATCC 17484 (Hill y Robinson, 1975) en un cultivo en el que el fenol es la única fuente de carbono, y 32 mg L⁻¹ con *P. putida* F1 (Reardon y cols., 2000) en una mezcla de tolueno, fenol y benceno. Con la misma cepa Abuhamed y cols. (2004) obtuvieron un valor de K_S de 18 mg L⁻¹ para el fenol. Las velocidades específicas de crecimiento máximas encontradas en bibliografía también varían mucho; desde 0.051 h⁻¹ (Abuhamed y cols., 2004) hasta 0.534 h⁻¹ (Hill y Robinson, 1975). Las constantes de muerte son pequeñas, en torno a 0.003 h⁻¹ y similares en los tres ensayos.

Tabla 4.2. Valores de los parámetros del modelo cinético SKIP para el estudio del efecto del pH en la degradación de los sustratos ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico mediante *P. putida* CECT 324 a 30°C.

| | Velocidad específica de crecimiento máxima (h ⁻¹) | Rendimiento de biomasa en sustrato (g g ⁻¹) | Constante de saturación (mg L ⁻¹) | Constante de inhibición (mg L ⁻¹) | Constante de interacción (L mg ⁻¹) | Constante de muerte (h ⁻¹) | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|--|--|-----------------|-----------------------------|-------------|
| pH = 5 | $\mu_{\max,fo}$ | 0.03 | $Y_{x/fo}$ | 0.26 | $K_{S,fo}$ | 6.43 | | | |
| | $\mu_{\max,va}$ | 0.05 | $Y_{x/va}$ | 0.34 | $K_{S,va}$ | 16.63 | | | |
| | $\mu_{\max,fe}$ | 0.09 | $Y_{x/fe}$ | 0.24 | $K_{S,fe}$ | 1.67 | $K_{I,fe}$ 4.96 | $I_{fe,va}$ 0.03 | $k_d=0.002$ |
| | $\mu_{\max,ox}$ | 0.14 | $Y_{x/ox}$ | 0.16 | $K_{S,ox}$ | 2.52 | $K_{I,ox}$ 1.61 | $I_{ox,fo}$ 10 ⁵ | |
| pH = 7 | $\mu_{\max,fo}$ | 0.03 | $Y_{x/fo}$ | 0.98 | $K_{S,fo}$ | 4.38 | | | |
| | $\mu_{\max,va}$ | 0.10 | $Y_{x/va}$ | 0.65 | $K_{S,va}$ | 13.70 | | | |
| | $\mu_{\max,fe}$ | 0.09 | $Y_{x/fe}$ | 0.29 | $K_{S,fe}$ | 4.44 | $K_{I,fe}$ 4.43 | $I_{fe,va}$ 0.03 | $k_d=0.003$ |
| | $\mu_{\max,ox}$ | 0.21 | $Y_{x/ox}$ | 0.11 | $K_{S,ox}$ | 19.75 | $K_{I,ox}$ 1.00 | $I_{ox,fo}$ 0.01 | |
| pH = 6 no controlado | $\mu_{\max,fo}$ | 0.03 | $Y_{x/fo}$ | 0.53 | $K_{S,fo}$ | 1.29 | | | |
| | $\mu_{\max,va}$ | 0.07 | $Y_{x/va}$ | 0.50 | $K_{S,va}$ | 4.10 | | | |
| | $\mu_{\max,fe}$ | 0.09 | $Y_{x/fe}$ | 0.50 | $K_{S,fe}$ | 2.05 | $K_{I,fe}$ 4.85 | $I_{fe,va}$ 0.03 | $k_d=0.004$ |
| | $\mu_{\max,ox}$ | 0.15 | $Y_{x/ox}$ | 0.48 | $K_{S,ox}$ | 41.17 | $K_{I,ox}$ 1.80 | $I_{ox,fo}$ 518 | |

Los principales parámetros del modelo son la constante de inhibición y el parámetro de interacción. Así, a pH 7, los dos parámetros de interacción son muy bajos ($I_{fe,va} = 0.03$ y $I_{ox,fo} = 0.01$ L mg⁻¹) por lo que la interacción entre sustratos es despreciable (Figura 4.3a) de modo que *P. putida* puede comenzar a degradar fenol y ácido oxálico sin necesidad de consumir previamente vanilina y ácido fórmico, respectivamente. En general, a cualquiera de los diferentes valores de pH ensayados, $I_{fe,va} = 0.03$ L mg⁻¹ por lo que se puede concluir que en el intervalo de pH ensayado el consumo de fenol no se ve afectado por la degradación previa de vanilina.

Aunque vanilina y fenol son similares estructuralmente, cabe esperar (como así se observa experimentalmente) que sean consumidos a diferentes tiempos y que el parámetro de interacción sea despreciable, puesto que la degradación de ambos sigue rutas metabólicas distintas, y consecuentemente en su biodegradación se ven involucradas enzimas diferentes. La enzima responsable del paso inicial en el metabolismo del fenol (Spain y Gibson, 1988; Spain y cols., 1989) por *P. putida* es la tolueno dioxigenasa (TDO), que cataliza la monohidroxilación del fenol al catecol (Figura 4.6). La transformación de vanilina (Figura 4.6) en protocatecuato es llevada a cabo por una aldehído deshidrogenasa y una demetilasa (Jiménez y cols., 2002).

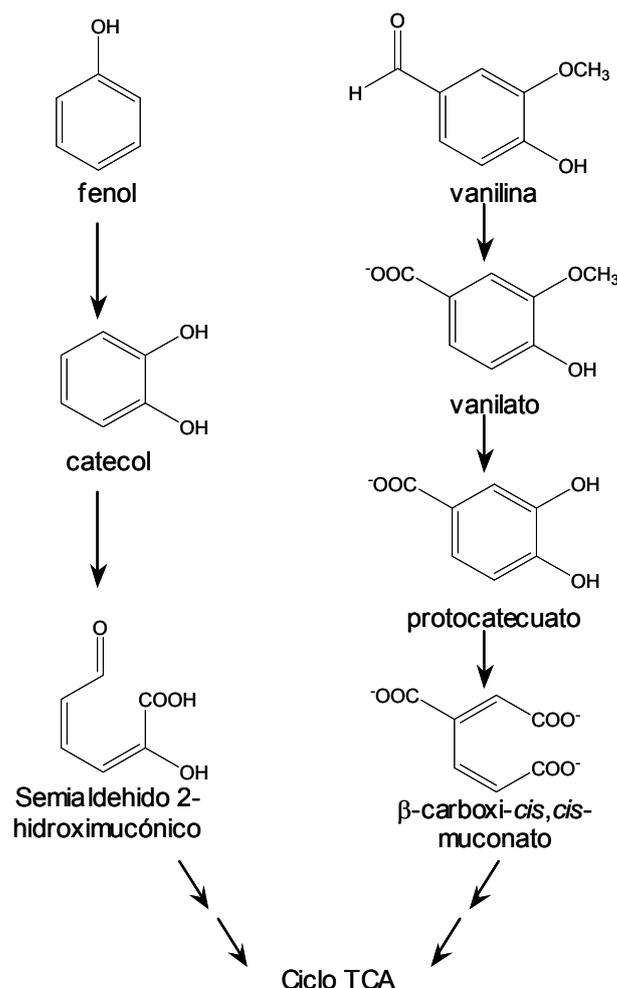


Figura 4.6. Ruta catabólica para vanilina y fenol en *P. putida*.

Sin embargo, a pH 5 y 6 (no controlado) $I_{ox,fo}$ posee un valor muy elevado (muy superior a pH 5) provocando un retraso en el consumo de ácido oxálico mientras permanecen presentes concentraciones altas de ácido fórmico. Por tanto, se puede deducir que al alejarnos del valor óptimo de pH la interacción ácido oxálico-ácido fórmico se ve incrementada considerablemente.

Por otra parte se confirma la hipótesis inicial, el fenol y el ácido oxálico causan inhibición ya que K_i es relativamente baja ($K_{i,fe} < 5 \text{ mg L}^{-1}$ y $K_{i,ox} = 1-1.8 \text{ mg L}^{-1}$) en comparación con las concentraciones de sustrato presentes. Un alto valor de K_i indica que la inhibición sólo puede ser observada en un intervalo alto de concentraciones. En este sentido, el ácido oxálico inhibe el crecimiento de *P. putida* a menores concentraciones que el fenol.

Las velocidades de consumo máximas se calculan mediante la Ecuación 4.7 para fenol y ácido oxálico, 12.3 y $15.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, siendo $9.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para

vanilina y $3.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para ácido fórmico a pH 7. Estos valores decrecen a pH 5 a 11.0, 9.2, 5.8 y $2.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y a pH 6 (sin control de pH) hasta 6.1, 6.0, 4.1 y $3.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para fenol, ácido oxálico, vanilina y ácido fórmico, respectivamente. Para fenol se encuentran velocidades de consumo en bibliografía, sin embargo, no se han publicado para el resto de sustratos. Así, las velocidades de degradación de fenol con *P. putida* CCRC14365 a 30°C fueron 28.1 y $19.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para células libres e inmovilizadas, respectivamente en un reactor en discontinuo (Chung y cols., 2003). En cultivos en matraz, la bacteria *P. pseudomallei* degrada fenol a $13.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que se obtiene una velocidad de degradación de $26.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con *P. aeruginosa*. Además, el empleo de otras sales hace que la velocidad de degradación del fenol se incremente 1.53 veces con *P. aeruginosa* (Afzal y cols., 2007).

4.1.3. Efecto de la temperatura en la degradación de los intermedios modelo mediante *P. putida*

Para estudiar si variaciones en la temperatura pueden afectar al consumo de sustratos, se modificó la temperatura hasta 25°C y 35°C, cubriendo un intervalo de 10°C alrededor del óptimo. Ambos ensayos se realizaron en las mejores condiciones de pH (pH=7) determinadas anteriormente. Los experimentos se realizaron en el mismo reactor y siendo el medio igual que en el estudio del efecto del pH.

En la Tabla 4.3 se muestran los tiempos de consumo para cada sustrato a las dos temperaturas ensayadas. Aunque no se aprecian fuertes variaciones en los tiempos de consumo para el ácido fórmico y la vanilina, sí se produce un marcado retraso en la degradación de fenol y ácido oxálico, incluso siendo el pH óptimo en ambos ensayos. Este efecto es mayor a 35°C en el que los tiempos de biodegradación para el fenol y el ácido oxálico son 66 y 70 h, respectivamente.

Tabla 4.3. Efecto de la temperatura en la degradación de los sustratos ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico mediante *P. putida* CECT 324 a pH 7.

| Temperatura (°C) | Ácido fórmico | Vanilina | Tiempo de consumo experimental (h) | |
|------------------|---------------|----------|------------------------------------|---------------|
| | | | Fenol | Ácido oxálico |
| 25 | 15 | 14 | 54 | 46 |
| 35 | 14 | 18 | 66 | 70 |

Los valores de los parámetros del modelo cinético SKIP para el estudio del efecto de la temperatura se presentan en la Tabla 4.4. La velocidad específica máxima de crecimiento, los coeficientes de rendimiento de biomasa en sustrato y las constantes de saturación son consistentes con las encontradas a 30°C. Sin embargo, a 25°C y 35°C se

produce un incremento en $I_{ox,fo}$ que es muy superior a 35°C como se discutió a pH 5. Este incremento en el parámetro de interacción justifica el marcado retraso en el consumo de ácido oxálico (70 h) que se produce a 35°C (Tabla 4.3). Al igual que en el apartado anterior, el ácido oxálico también causa a 25°C una mayor inhibición que el fenol, excepto a 35°C, donde K_I es similar para ambos sustratos inhibitorios. Además, análogamente a los ensayos a diferentes pH, el valor de la constante de muerte está en torno a 0.003 h^{-1} aumentando, sin embargo, hasta 0.015 h^{-1} a 35°C debido al carácter mesófilo de *P. putida* (Margesin y cols., 2004).

Tabla 4.4. Valores de los parámetros del modelo cinético SKIP para el estudio del efecto de la temperatura en la degradación de los sustratos ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico mediante *P. putida* CECT 324 a pH 7.

| | Velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}) | Rendimiento de biomasa en sustrato (g g^{-1}) | Constante de saturación (mg L^{-1}) | Constante de inhibición (mg L^{-1}) | Constante de interacción (L mg^{-1}) | Constante de muerte (h^{-1}) | | | | | |
|------|--|--|--|--|---|---|-------------|------------|------|-------------|--------|
| 25°C | $\mu_{\text{max,fo}}$ | 0.05 | $Y_{x/fo}$ | 0.99 | $K_{S,fo}$ | 18.18 | $k_d=0.003$ | | | | |
| | $\mu_{\text{max,va}}$ | 0.09 | $Y_{x/va}$ | 0.98 | $K_{S,va}$ | 15.29 | | | | | |
| | $\mu_{\text{max,fe}}$ | 0.05 | $Y_{x/fe}$ | 0.49 | $K_{S,fe}$ | 3.90 | | $K_{I,fe}$ | 4.14 | $I_{fe,va}$ | 0.03 |
| | $\mu_{\text{max,ox}}$ | 0.15 | $Y_{x/ox}$ | 0.24 | $K_{S,ox}$ | 19.91 | | $K_{I,ox}$ | 0.88 | $I_{ox,fo}$ | 357 |
| 35°C | $\mu_{\text{max,fo}}$ | 0.05 | $Y_{x/fo}$ | 0.78 | $K_{S,fo}$ | 20.19 | $k_d=0.015$ | | | | |
| | $\mu_{\text{max,va}}$ | 0.09 | $Y_{x/va}$ | 0.92 | $K_{S,va}$ | 10.24 | | | | | |
| | $\mu_{\text{max,fe}}$ | 0.06 | $Y_{x/fe}$ | 0.66 | $K_{S,fe}$ | 3.66 | | $K_{I,fe}$ | 4.38 | $I_{fe,va}$ | 0.03 |
| | $\mu_{\text{max,ox}}$ | 0.17 | $Y_{x/ox}$ | 0.43 | $K_{S,ox}$ | 34.65 | | $K_{I,ox}$ | 4.96 | $I_{ox,fo}$ | 10^5 |

Para los ensayos a diferentes temperaturas (Figuras 4.7 y 4.8) se observa un efecto equivalente en la velocidad de degradación de los sustratos. El hecho de disminuir en 5°C la temperatura respecto a la óptima supone un descenso en la velocidad máxima de consumo de sustratos hasta 6.3, 8.1, 8.4 y 2.3 $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este descenso es incluso más acusado a 35°C con 3.6, 8.0, 7.2 y 2.1 $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para fenol, ácido oxálico, vanilina y ácido fórmico, respectivamente.

De los resultados mostrados en esta parte de la investigación debe destacarse que *P. putida* es capaz de degradar los cuatro sustratos seleccionados en un amplio margen de valores de pH y temperatura, en 28 h en las mejores condiciones (30°C y pH 7) y en 70 h en las peores (35°C). Además, la cinética descrita revela la variedad de patrones de consumo que tienen lugar durante la biodegradación de mezclas complejas de sustratos que simulan un efluente parcialmente oxidado de un POA. Así, cambios en el pH o en unos pocos grados en la temperatura, conllevan a un comportamiento muy diferente en el patrón de consumo de cada sustrato. Por consiguiente, el control de los tiempos de residencia en una planta de oxidación biológica debe considerar el cambio en la cinética de biodegradación con las condiciones ambientales. El tiempo de tratamiento típico en una

depuradora convencional mediante fangos activos (~ 10 h) podría ser insuficiente para la oxidación biológica de efluentes de una planta de tratamiento en la que se empleen PPOA.

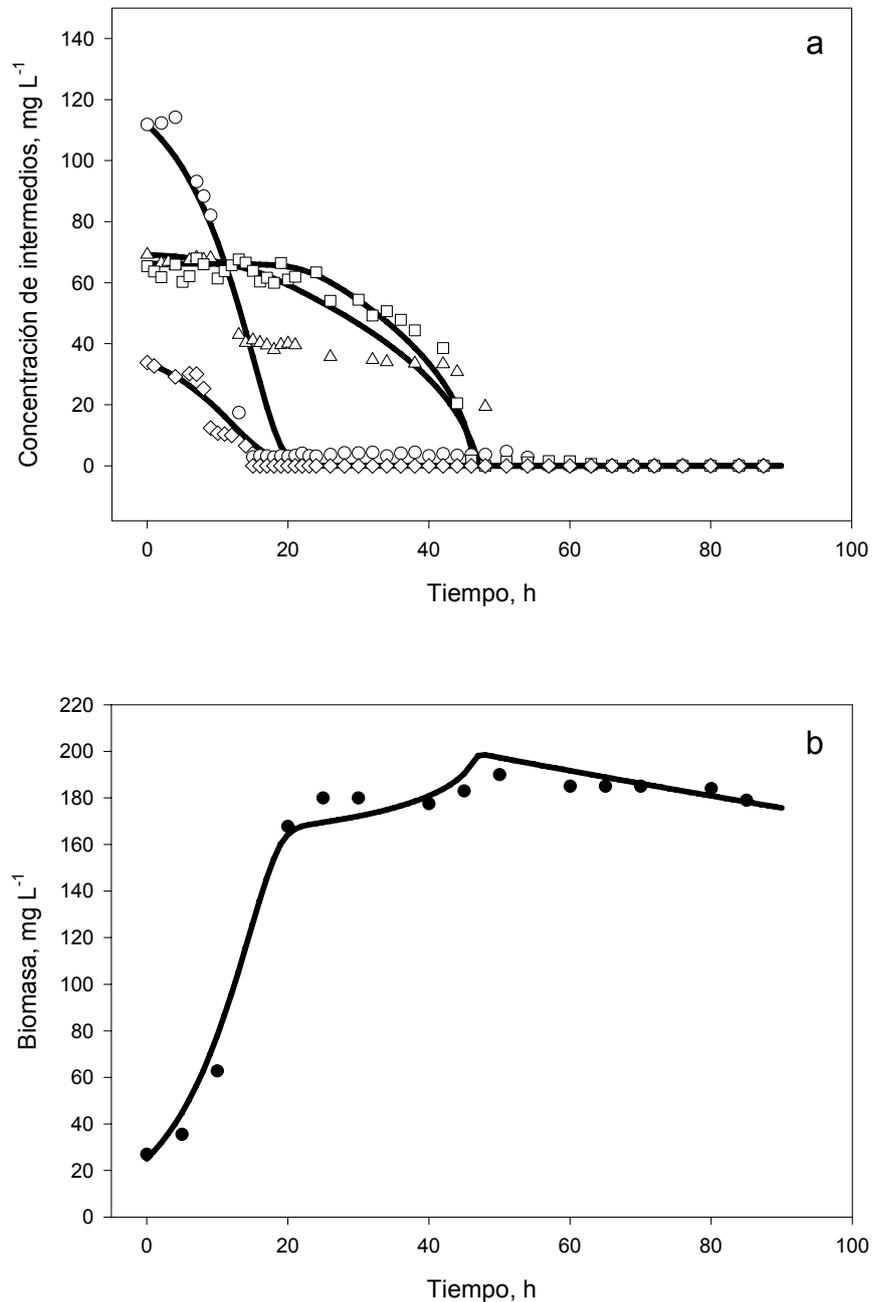


Figura 4.7. Biodegradación en discontinuo de la mezcla de ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico a 25°C y pH 7 mediante *P. putida* CECT 324. a) (◇) Ácido fórmico, (○) vanilina, (△) fenol y (□) ácido oxálico. b) (●) Concentración de biomasa. Las líneas representan las estimaciones del modelo.

Sin embargo, además del pH y la temperatura, lo que determina la cinética de biodegradación es el grado de oxidación al que son sometidos en el POA los contaminantes iniciales.

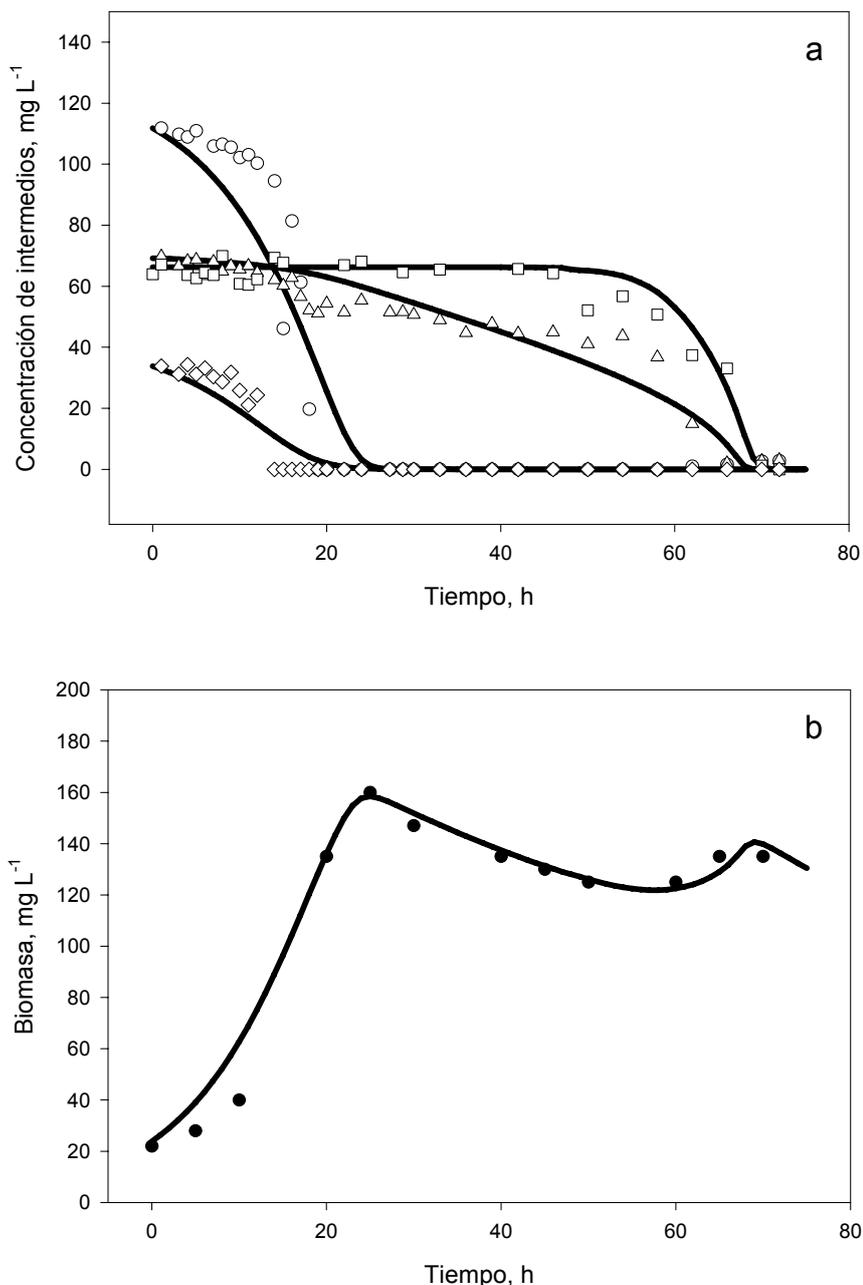


Figura 4.8. Biodegradación en discontinuo de la mezcla de ácido fórmico, vanilina, fenol y ácido oxálico a 35°C y pH 7 mediante *P. putida* CECT 324. a) (◇) Ácido fórmico, (○) vanilina, (△) fenol y (□) ácido oxálico. b) (●) Concentración de biomasa. Las líneas representan las estimaciones del modelo.

Dado que *P. putida* es un microorganismo capaz de biodegradar los potenciales intermediarios modelo que se puedan encontrar en un agua contaminada con plaguicidas tratada mediante un POA en un amplio intervalo de condiciones, se empleará esta bacteria para estudiar el efecto del tiempo de tratamiento en la cinética del proceso biológico posterior. Determinar dicho tiempo de tratamiento es de máxima importancia puesto que establecerá la intensidad a la que se debe someter el agua contaminada mediante el POA para que esta agua tratada sea biodegradable.

4.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con plaguicidas para el acoplamiento con una oxidación biológica posterior

Dentro de los PPOA, la fotocatalisis solar con foto-Fenton y con UV/TiO₂ es una de las técnicas más empleadas para degradar plaguicidas y otros contaminantes persistentes. Sin embargo, se ha demostrado que foto-Fenton es más efectivo (Malato y cols., 2005; Farré y cols., 2005) para tratar este tipo de sustancias ya que la velocidad de reacción es mucho mayor y la separación del hierro no es siempre necesaria si se trabaja a concentraciones bajas (en catálisis heterogénea con UV/TiO₂ el catalizador debe ser separado del agua después del tratamiento). No obstante, el coste de estas técnicas para la oxidación completa de los contaminantes es muy alto (Esplugas y Ollis, 1997; Pulgarín y cols., 1999; da Hora Machado y cols., 2004; Malato y cols., 2007a) si se compara con el de un tratamiento biológico. Por tanto, su uso puede estar justificado si los intermedios resultantes de la reacción son más biodegradables que los contaminantes originales y pueden ser posteriormente degradados por en un tratamiento biológico.

El tiempo de reacción del proceso fotocatalítico es determinante cuando se pretende acoplar posteriormente con una oxidación biológica. Cuando la eliminación del contaminante se lleva a cabo únicamente con el proceso foto-Fenton (y en general con cualquier tipo de oxidación química) tiempos largos producen un mayor grado de oxidación y una mayor eliminación del contaminante. Sin embargo, para un sistema combinado, no es necesario un tiempo de oxidación con foto-Fenton largo. Es más, cuando un proceso biológico recibe un efluente pretratado químicamente, el exceso de oxidación química puede generar productos altamente oxidados con poco valor metabólico para los microorganismos. Precisamente, dosis grandes de oxidantes podrían consumir intermedios de reacción fácilmente biodegradables resultando en una pérdida de eficiencia en el sistema (Scott y Ollis, 1995).

Stowell y cols. (1992) estudiaron la degradación de 2-clorofenol mediante oxidación química con ozono, en la que aparecían dos intermedios mayoritarios, ácido clorosuccínico y ácido oxálico secuencialmente durante la ozonización. Al combinar una oxidación biológica con *P. putida* observaron que el crecimiento era mucho mayor en la disolución que contenía el intermedio menos oxidado (ácido clorosuccínico) y que, por tanto, no eran necesarios mayores tiempos de ozonización.

Por el contrario, tiempos cortos de oxidación química pueden dar lugar a la formación de intermedios tóxicos (Sakkas y cols., 2004; Evgenidou y cols., 2006). Así el metabolito 2,6-dietilnilina proveniente de la degradación fotocatalítica del plaguicida alaclor es más tóxico que el plaguicida original (Osano y cols., 2002). Manilal y cols., 1992, encontraron que un producto intermedio de la oxidación fotocatalítica de pentaclorofenol y 2,4-diclorofenol causaba la inhibición de un cultivo de fango activo. Sin embargo, este efecto se eliminaba con mayores tiempos de oxidación química. Numerosos resultados remarcan que la desaparición de los principios activos de plaguicidas es suficiente para alcanzar una correcta biodegradabilidad (Oller y cols., 2007a; Oller y cols., 2007d; Lapertot y cols., 2007).

La estimación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton se puede llevar a cabo como una medida de cuándo el efluente del tratamiento fotocatalítico comienza a ser biodegradable. Actualmente, la biodegradabilidad se mide principalmente con fangos activos, determinando la relación DBO_5/DQO o empleando el método de Zahn Wellens (Farré y Barceló, 2003; Guhl y Steber, 2006; Lapertot y Pulgarín, 2006; García-Montaño y cols., 2006b; Farré y cols., 2007). Sin embargo estos métodos no tienen en cuenta la cinética del proceso biológico por lo que la información que ofrecen es muy limitada.

En esta parte de la investigación se propone *P. putida* como un microorganismo válido para realizar estudios de biodegradabilidad de efluentes tratados mediante PPOA con el fin de determinar el punto mínimo de tratamiento fotocatalítico. Más aún, se presenta como un método alternativo a los ya existentes que emplean fangos activos, en cuanto a que puede proporcionar mayor información del proceso biológico, disminución del tiempo de análisis y repetibilidad en los resultados.

Para ello, se estudia el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton para un agua contaminada con plaguicidas (alaclor y pirimetanil) de forma individual empleando *P. putida*. Asimismo, se estudia el efecto de los intermedios de la reacción fotocatalítica (generados en el tratamiento de cada plaguicida) en la cinética de consumo de COD y en el crecimiento bacteriano. Conjuntamente, para extender la aplicabilidad de los resultados se lleva a cabo el mismo estudio en una mezcla de plaguicidas comerciales.

4.2.1. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de plaguicidas individuales (alaclor y pirimetanil) con *P. putida*

Los plaguicidas seleccionados para este estudio han sido alaclor y pirimetanil, individualmente. El alaclor (Figura 4.9a), 2-cloro-2',6'-dietil-*N*-metoximetil acetanilida, es un herbicida común en agricultura que se encuentra dentro de las 33 sustancias prioritarias (http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_substances.htm) para la Unión Europea. Causa cáncer a animales de laboratorio y se ha demostrado su mutagenicidad (Horberg, 1990). Además, tiene efectos tóxicos y genotóxicos (Osano y cols., 2002) y puede contribuir a la infertilidad (Grizard y cols., 2007). El pirimetanil, *N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-anilina (Figura 4.9b) es considerado por la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC) como un contaminante orgánico prioritario (POPs, siglas en inglés de Priority Organic Pollutants) siendo de uso restringido como fungicida en agricultura. Asimismo, aunque los estudios existentes no muestran evidencia de mutagenicidad, genotoxicidad o potencial cancerígeno, sí se ha observado un aumento de peso del hígado junto con cambios histopatológicos en hígado y tiroides en estudios de toxicidad a corto plazo en ratas y ratones (EFSA, 2006).

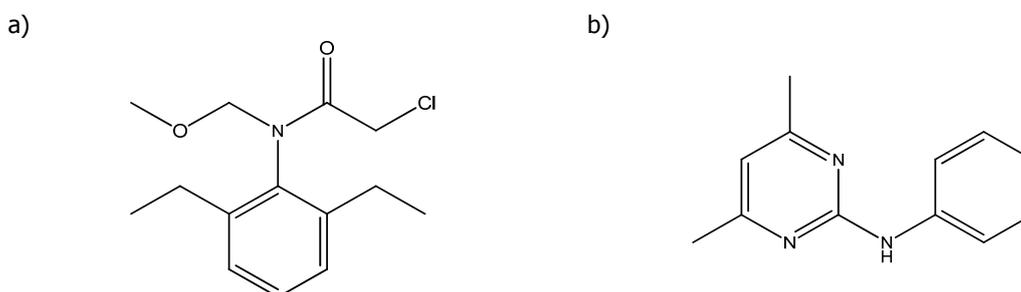


Figura 4.9. Estructura química del alaclor (a) y del pirimetanil (b).

Existe una amplia variedad de técnicas para tratar aguas residuales que contengan alaclor o pirimetanil (Koskinen y cols., 1994; Beltrán y cols., 1999b; Agüera y cols., 2000; Peñuela y Barceló, 1996; Oller y cols., 2006; Maldonado y cols., 2007). Entre ellas, los PPOA son actualmente los más extendidos para estos plaguicidas que no son tratables mediante técnicas convencionales debido a su alta estabilidad química y a su baja biodegradabilidad. Sin embargo, el coste de estas técnicas para la completa eliminación de alaclor y pirimetanil es muy elevado. Una alternativa para abaratar los costes del proceso es realizar la oxidación parcial del plaguicida hasta conseguir intermedios biodegradables que puedan ser eliminados por completo en un tratamiento biológico.

En este trabajo se aplican diferentes intensidades de tratamiento mediante foto-Fenton a un agua contaminada con un plaguicida (alaclor o pirimetanil) y se estudia la biodegradabilidad de los intermedios generados con *P. putida*. De este modo se puede deducir el tiempo mínimo de tratamiento para el acoplamiento foto-Fenton-tratamiento biológico.

Debido a que el cultivo bacteriano es monoespecífico es más sencillo plantear cinéticamente cómo está transcurriendo la biodegradación de los intermedios que con los métodos que emplean fangos activos. Para ello, se escala el proceso a una columna de burbujeo en la que se realiza la biodegradación con *P. putida* en las mejores condiciones anteriormente estudiadas (pH 7 y 30°C). Asimismo, se compara el cambio en la actividad metabólica de las células causada por la presencia de los intermedios, contrastando los parámetros cinéticos y velocidades de consumo de sustrato y oxígeno con un cultivo blanco (sin intermedios).

4.2.1.1. Alaclor

i) Estudio de la biodegradabilidad del plaguicida

Antes de considerar llevar a cabo un tratamiento fotocatalítico es necesario comprobar que el contaminante no es biodegradable mediante *P. putida*. Así, se realizaron ensayos en matraz con diferentes concentraciones de alaclor sin tratar (0, 30, 60, 90 y 120 mg L⁻¹). La inoculación se realizó con 80 µL de un inóculo de *P. putida* que proviene de un stock mantenido a -70°C y por lo que el propio stock bacteriano aporta una fuente de carbono adicional al medio (COD=360 mg L⁻¹ aproximadamente).

Se mide el COD y la concentración de alaclor mediante HPLC cada 24 h y, después de 96 h, se cuantifica que el consumo medio para las cinco muestras es de 330 ± 20.9 mg L⁻¹ de COD y se observa que la concentración de alaclor se mantiene constante en todos los ensayos. Con estos datos se puede concluir que el crecimiento de *P. putida* no está influenciado por la concentración de alaclor presente en el medio (en el intervalo estudiado) pero tampoco es capaz de biodegradarlo.

Ensayos realizados con otros microorganismos más sensibles muestran que el alaclor afecta escasamente a su metabolismo; así por ejemplo, los test de toxicidad realizados con *Vibrio fischeri* muestran un EC₅₀ para el alaclor de 105 mg L⁻¹ (Lapertot y cols., 2007) y otros autores de 159 mg L⁻¹ (Osano y cols., 2002). Si se tiene en cuenta las

categorías de toxicidad de la OECD (siglas en inglés de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico; OECD, 2003) en la que se considera muy tóxico para organismos acuáticos un $EC_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$, tóxico ($EC_{50} = 1-10 \text{ mg L}^{-1}$), nocivo ($EC_{50} = 10-100 \text{ mg L}^{-1}$) y poco nocivo ($EC_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$), se puede determinar que el alaclor estaría dentro de esta última categoría.

Por otro lado, estudios previos de biodegradabilidad del plaguicida llevados a cabo con el test de Zahn Wellens demuestran que concentraciones de 30 mg L^{-1} de alaclor no pueden ser degradadas por un fango activo (Lapertot y cols., 2007) lo que está en concordancia con los resultados presentados.

ii) Degradación de alaclor mediante foto-Fenton

Una vez comprobado que el plaguicida no es biodegradable se realiza el pretratamiento mediante foto-Fenton. Este tratamiento se ha llevado a cabo en la Plataforma Solar de Almería en los fotorreactores descritos en el apartado 3.6.1. La concentración inicial de plaguicida seleccionada es de 120 mg L^{-1} , aunque la concentración final medida por HPLC es de 123.4 mg L^{-1} . Para estudiar si la concentración inicial de Fe^{2+} empleada (20 mg L^{-1}) afecta al crecimiento bacteriano se realizaron cultivos de *P. putida* en matraz Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo (apartado 3.1), con una concentración de 20 mg L^{-1} de Fe^{2+} y sin hierro, no observándose diferencias significativas.

El tiempo de reacción en el proceso foto-Fenton (Malato y cols., 2003b) se mide mediante el parámetro t_{30W} (Ecuación 4.9), que es un tiempo de iluminación normalizado referido a una radiación solar de 30 W m^{-2} (radiación solar UV típica en un día perfectamente soleado alrededor del mediodía).

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n \frac{\overline{UV} V_i}{30 V_T}; \Delta t_n = t_n - t_{n-1}; t_0 = 0 \quad (n=1) \quad \text{Ec. 4.9}$$

donde \overline{UV} es la radiación solar ultravioleta promedio medida durante Δt_n , t_n es el tiempo experimental para cada muestra, V_i es el volumen total irradiado y V_T es el volumen total de agua a tratar.

Como se puede observar en la Figura 4.10, la degradación de alaclor se produce en los primeros minutos, quedando 8.6 mg L^{-1} cuando $t_{30W} = 61 \text{ min}$ y desapareciendo por

completo cuando el COD mineralizado es del 65% (Tabla 4.5). La concentración de plaguicida disminuye más rápido que la de COD, como es habitual en los PPOA, debido a la rápida oxidación del compuesto original. Sin embargo, los intermedios generados en el proceso con el tiempo de reacción se oxidan parcialmente y generan otros intermedios más degradados, dando lugar a una progresiva disminución del COD.

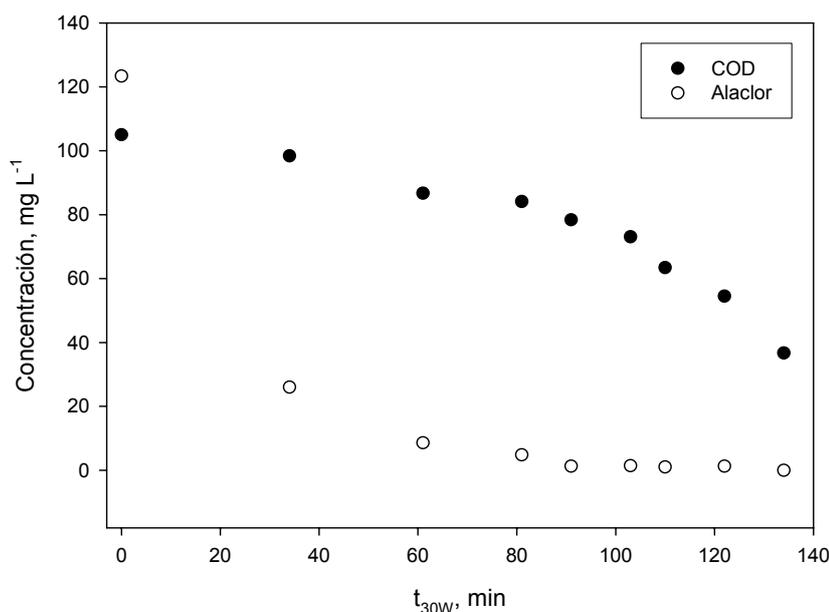


Figura 4.10. Degradación y mineralización de alaclor mediante foto-Fenton.

Tabla 4.5. Variación de la concentración de alaclor y COD con el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton. Se incluye también el H₂O₂ consumido.

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| t _{30w} , min | 0 | 34 | 61 | 81 | 91 | 103 | 110 | 122 | 134 |
| COD, mg L ⁻¹ | 105.0 | 98.4 | 86.7 | 84.1 | 78.4 | 73.1 | 63.4 | 54.5 | 36.7 |
| Alaclor, mg L ⁻¹ | 123.4 | 26.0 | 8.6 | 4.8 | 1.3 | 1.4 | 1.0 | 1.3 | 0 |
| Mineralización, % | 0 | 6 | 17 | 20 | 25 | 30 | 40 | 48 | 65 |
| H ₂ O ₂ consumido, mg L ⁻¹ | 1.1 | 3.1 | 23.1 | 50.0 | 91.8 | 126.9 | 162.0 | 207.0 | 287.0 |

La degradación de este herbicida mediante foto-Fenton ya ha sido descrita previamente (Gernjak y cols., 2006; Maldonado y cols., 2007) con una concentración menor de plaguicida (50 mg L⁻¹) y con 2, 10, 20 y 55 mg L⁻¹ de Fe²⁺. En todos los casos, la eliminación de cloro fue mucho más rápida que la disminución del COD. Así, para una concentración de catalizador de 20 mg L⁻¹, los 50 mg L⁻¹ de alaclor eran completamente eliminados durante la reacción Fenton (sin luz solar), pero sin lograr ningún tipo de mineralización. De hecho, más del 90% de la mineralización se logró sólo después de la

iluminación con un consumo de 1190 mg L⁻¹ de peróxido de hidrógeno, lo que indica que con el empleo de bajas concentraciones de hierro la etapa Fenton no es muy relevante. Además, el consumo de peróxido de hidrógeno al comienzo de la reacción de foto-Fenton no es significativo (Tabla 4.5).

iii) Análisis de la biodegradabilidad de los intermedios generados en la degradación de alaclor a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton

El tratamiento fotocatalítico realizado previamente da lugar a modificaciones en la estructura química del alaclor transformándolo en diversos intermedios que presumiblemente serán más biodegradables que el plaguicida. Para evaluar la biodegradabilidad de los intermedios y determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton, se realiza la biodegradación por duplicado empleando *P. putida* en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de la disolución acuosa a tratar. Dicha disolución está compuesta por cada muestra obtenida del tratamiento del plaguicida mediante foto-Fenton a diversos tiempos llevado a cabo en el apartado anterior y la inoculación se realiza con 200 µL de un stock de *P. putida* mantenido a -70°C. Para cada matraz se mide el consumo de COD (aportado por la disolución criogénica, alaclor e intermedios) y la concentración de plaguicida mediante HPLC cada 24 h (Figura 4.11).

En la Figura 4.11 se observa que hasta las 72 h no se produce un marcado descenso en el COD. Dicho descenso se incrementa cuanto mayor es el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton, con el consecuente aumento en la concentración de biomasa. Esto indica que la facilidad de biodegradación por parte de *P. putida* aumenta al incrementarse la intensidad de tratamiento fotocatalítico. De hecho, a las 96 h del bioensayo el COD remanente desciende ligeramente a t_{30W} mayores y sólo permanece por encima de 80 mg L⁻¹ con menores porcentajes de mineralización (0 y 6%) a $t_{30W}=0$ y 34 min, cuando aun están presentes elevadas concentraciones de alaclor.

Después de 96 h, cuando el consumo de COD se mantiene constante, la eficiencia de biodegradación (E_f) se calculó con la Ecuación 4.10:

$$E_f = \frac{COD_i - (COD_f - COD_m)}{COD_i} \times 100 \quad \text{Ec. 4.10}$$

donde COD_i es el COD inicial aportado por los intermedios de reacción, COD_f es el COD medido al final del proceso biológico y COD_m es la concentración remanente de carbono orgánico disuelto procedente del medio criogénico que no puede ser degradada por *P. putida*, y que se encuentra en torno a 30 mg L^{-1} .

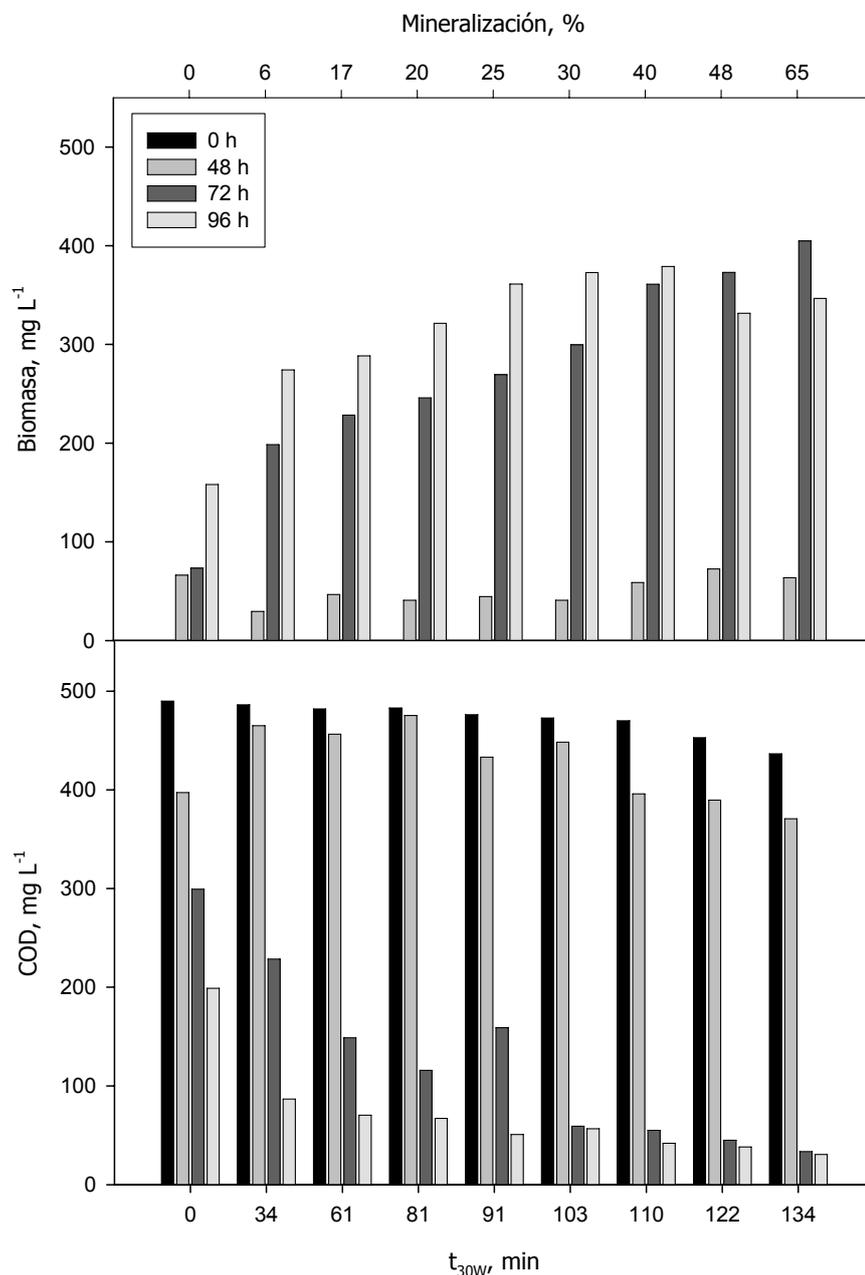


Figura 4.11. Evolución de la concentración de *P. putida* y COD en muestras de alaclor fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Los tiempos que aparecen en la leyenda corresponden al ensayo biológico.

La biodegradabilidad de un agua contaminada con sustancias persistentes normalmente se incrementa al aumentar el tiempo de tratamiento fotocatalítico. La Figura 4.12 muestra este incremento previsto en la eficiencia del tratamiento biológico desde un 34 a un 78% cuando la mineralización alcanzada con foto-Fenton está entre el 6 y 25%

(Tabla 4.5). Sin embargo, la biodegradación del COD decae ligeramente a los 103 min de tratamiento fotocatalítico, lo que conlleva a pensar que se genere a este tiempo algún intermedio más tóxico.

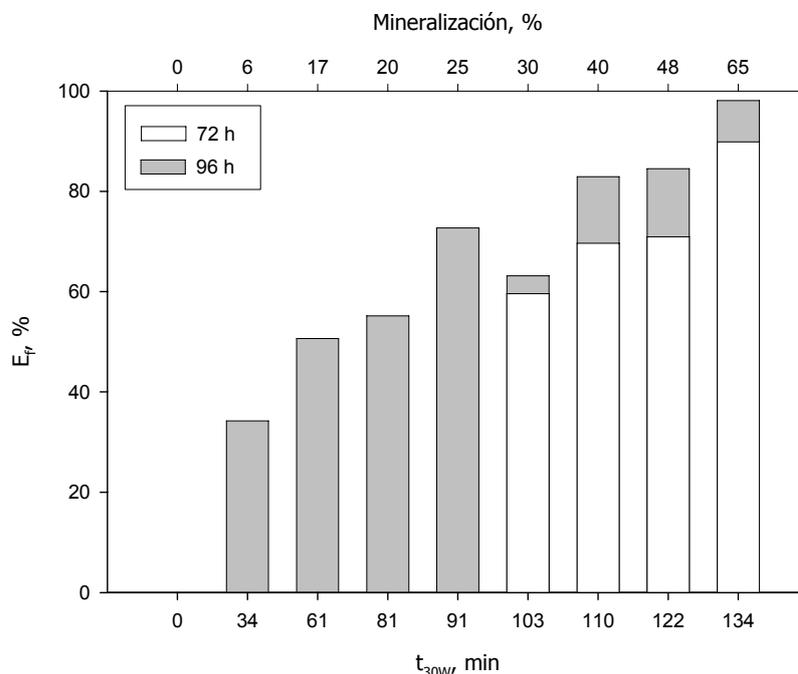


Figura 4.12. Evolución de la eficiencia de biodegradación (E_f) en muestras de alaclor fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton.

Durante el tratamiento mediante foto-Fenton del alaclor, se forman muchos intermedios debido a la incorporación de grupos hidroxilo en la estructura de alaclor, eliminación de grupos alquilo, apertura del anillo aromático, etc. (Katsumata y cols., 2006). Muchos de estos intermedios son principalmente derivados anilínicos (Farré y cols., 2005), como es el caso del intermedio 2,6-dietilanilina (Osano y cols., 2002), que es incluso más tóxico que el alaclor. Consecuentemente, es de suponer que este u otro intermedio tóxico de estructura similar se genere en pequeñas concentraciones en este punto de la reacción y esta sea la causa de la disminución de la eficiencia de biodegradación a $t_{30w} = 103$ min.

Después de este tiempo, la eficiencia de biodegradación se incrementa desde 63 a un 98% cuando se ha mineralizado un 65% del COD inicial mediante la reacción foto-Fenton ($t_{30w} = 134$ min). En ese momento de la reacción fotocatalítica prácticamente todos los intermedios son capaces de ser biodegradados. Estudios previos realizados con fangos activos (test de Zahn Wellens) demostraron una alta biodegradabilidad (aproximadamente un 80%) para los intermedios generados al mineralizar mediante foto-Fenton una disolución acuosa de unos 50 mg L^{-1} de alaclor (Lapertot y cols., 2006).

Al comienzo del fototratamiento ($t_{30W} = 0$) la eficiencia de biodegradación es nula, lo que está de acuerdo con el estudio de biodegradabilidad del compuesto realizado anteriormente. Por otra parte, *P. putida* es capaz de degradar los intermedios generados incluso cuando el alaclor está presente, a los 34, 61 y 81 min (Figura 4.12), aunque el alaclor no se consume, como confirman medidas realizadas por HPLC cada 24 h de tratamiento biológico (Figura 4.13). En algunos casos se detecta un ligero descenso en la concentración de alaclor (por ejemplo a los 61 o a los 81 min) lo que puede atribuirse a un efecto de adsorción en la biomasa.

Con los resultados mostrados se puede deducir que, para tiempos de tratamiento muy bajos (cuando la mineralización no supera el 20%) el acoplamiento no podría llevarse a cabo debido a que aún queda plaguicida sin tratar en el medio. No obstante, una vez que se ha mineralizado el 25% del COD inicial, el plaguicida desaparece casi por completo y la eficiencia de biodegradación se incrementa con lo que podría considerarse el tiempo mínimo de tratamiento. Sin embargo, cuando la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton se incrementa hasta una mineralización del 30% se deduce la presencia de intermedios menos biodegradables debido al ligero descenso en E_f . Por tanto, si se pretende realizar el acoplamiento evitando la presencia de intermedios menos biodegradables es necesario superar el 40% de mineralización del COD mediante el tratamiento fotocatalítico.

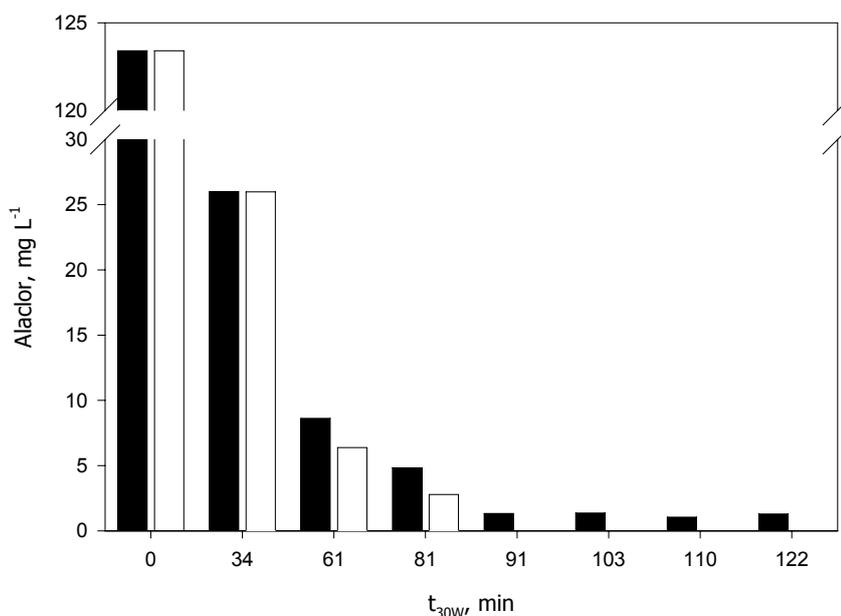


Figura 4.13. Concentración de alaclor. Las columnas en negro representan los valores iniciales de concentración (antes del tratamiento biológico). Las columnas blancas indican las concentraciones de alaclor después de las 96 h de tratamiento biológico.

iv) Cinética de biodegradación de los intermedios generados en la degradación de alaclor mediante foto-Fenton

Para estudiar la cinética de biodegradación de los intermedios que se generan en la reacción de foto-Fenton se escoge escalar el punto en que la mineralización no es muy alta (alrededor del 30%) pero el alaclor ha desaparecido casi por completo. Estas condiciones coinciden con el momento en que se observa un ligero descenso en E_f ; siendo ésta de 60%. Por tanto, se asume que se obtendrían mayores eficiencias si se incrementa el tiempo de tratamiento fotocatalítico.

Para realizar el escalado se realizó un tratamiento mediante foto-Fenton, en primer lugar, hasta conseguir una mineralización del 30% del COD inicial en el que la concentración final de plaguicida fue de 2.4 mg L^{-1} . Posteriormente, el tratamiento biológico se lleva a cabo en una columna de burbujeo de 12 L de capacidad en la que también se realiza un experimento blanco (con la misma fuente de carbono biodegradable y sin intermedios provenientes del tratamiento del plaguicida) para estudiar el efecto de los intermedios en la cinética del proceso biológico.

La Figura 4.14 muestra los cambios en la concentración de biomasa y el COD con el tiempo de tratamiento biológico. Una vez que las células de *P. putida* se han adaptado a la disolución de alaclor tratada, el crecimiento se produce en 8 h, causando un marcado descenso en el COD e incrementándose la velocidad de consumo de oxígeno por parte de éstas. La velocidad de respiración específica máxima fue de 13.74 y $11.53 \text{ mmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a las 16.3 y 27.5 h, en el experimento blanco y con alaclor fototratado, respectivamente.

En el proceso biológico se observa un decrecimiento en la actividad metabólica de las células causada por la presencia de los intermedios (Figura 4.14). Este cambio se pone de manifiesto en el descenso de la velocidad máxima de consumo de COD, que baja desde $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el ensayo blanco hasta $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el experimento con alaclor tratado. La velocidad máxima de consumo de COD se alcanza 12 h antes en el blanco debido a que en el ensayo con alaclor la fase de adaptación es mayor y la velocidad de crecimiento es más lenta, como se discutirá al comparar los datos del modelo cinético. Por tanto, *P. putida* es sensible a los intermedios generados en el tratamiento de alaclor mediante foto-Fenton dando diferentes comportamientos; mayor fase de adaptación y velocidades de respiración y de consumo de carbono más lentas.

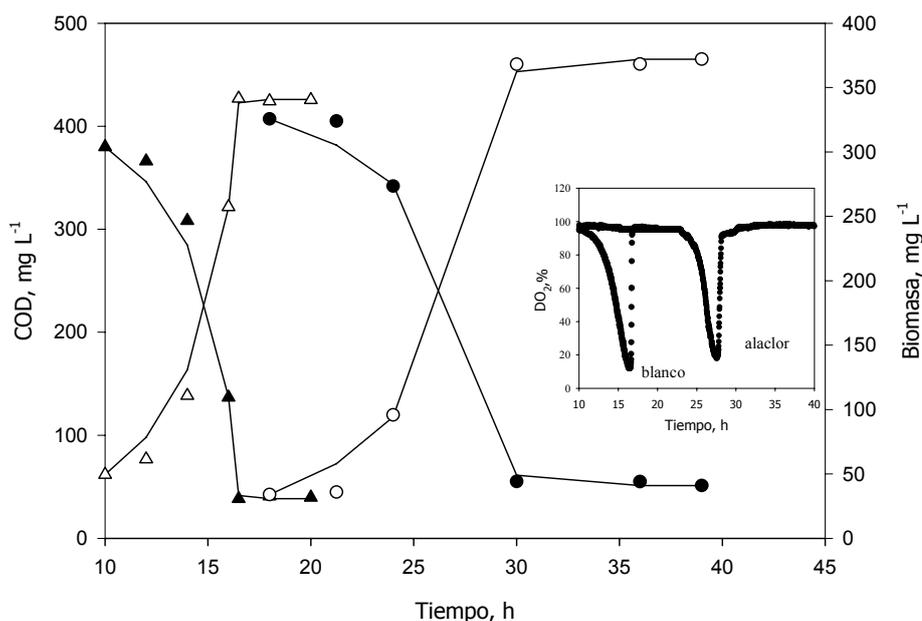


Figura 4.14. Biomasa (○) y COD (●) para el experimento con alaclor tratado y biomasa (Δ) y COD (▲) para el ensayo en blanco en una columna de burbujeo. Las líneas representan las estimaciones del modelo. En la gráfica aneja se representa la evolución del porcentaje de oxígeno disuelto para ambos ensayos.

Partiendo del modelo anterior (apartado 4.1.2), los datos experimentales se ajustaron a un modelo de Andrews (Andrews, 1968) debido a que, por la multitud de intermedios presentes, no se puede tener en cuenta la interacción entre sustratos. Por consiguiente, se definió la concentración de sustrato S , como la cantidad de COD presente (Ecuación 4.11). Al igual que en el apartado anterior, el programa empleado para llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto fue Matlab™ (ver. 6.5) y equivalente la sistemática utilizada. En este caso los datos fueron ajustados una vez que comienza el crecimiento, después de la fase de adaptación.

$$\mu_i = \frac{\mu_{\max,i} COD_i}{K_{S,i} + COD_i + \frac{COD_i^2}{K_{I,i}}} \tag{Ec. 4.11}$$

En la Tabla 4.6 se presentan los valores de los parámetros del modelo. Como se muestra, la velocidad específica de crecimiento depende de la presencia de los productos de degradación de foto-Fenton. Puede observarse que μ_{\max} es menor y K_S aumenta considerablemente, lo que pone de manifiesto que las células tienen una menor afinidad por el medio con alaclor tratado.

Tabla 4.6. Valores de los parámetros del modelo cinético de crecimiento para el ensayo con alaclor. Comparación con el ensayo en blanco.

| | Velocidad de crecimiento específica máxima, μ_{max}, (h^{-1}) | Constante de saturación, K_s, ($mg L^{-1}$) | Constante de inhibición, K_i, ($mg L^{-1}$) |
|---------|--|--|--|
| Blanco | 0.83 | 1.75 | 115 |
| Alaclor | 0.71 | 55.2 | 112 |

El efecto de un compuesto tóxico en un tratamiento se puede cuantificar empleando la constante de inhibición, K_i . Debe destacarse que cuando K_i es muy grande la ecuación de Andrews se simplifica dando lugar a la ecuación de Monod, lo que implica que la bacteria es menos sensible a la inhibición del sustrato (Marrot y cols., 2006). Valores bajos de K_i muestran que el efecto de inhibición debe tenerse en cuenta a bajas concentraciones de sustrato inhibidor. En el presente estudio las constantes de inhibición son menores que la concentración inicial de COD (con valores en torno a $100 mg L^{-1}$ para K_i frente a los aproximadamente $400 mg L^{-1}$ iniciales de sustrato) lo que indica que el fenómeno de inhibición debe tenerse en cuenta incluso para el medio blanco.

Las velocidades específicas de crecimiento calculadas para el blanco y la disolución de alaclor fototratada fueron $0.30 h^{-1}$ y $0.23 h^{-1}$, respectivamente, al tiempo en que las velocidades de consumo de carbono fueron máximas, obteniéndose la Ecuación 4.12.

$$\frac{\mu_{(Blanco)}}{\mu_{(Alaclor)}} = \frac{0.30}{0.23} \approx \frac{r_{COD, max (Blanco)}}{r_{COD, max (Alaclor)}} = \frac{100}{80} \approx \frac{q_{O_2, max (Blanco)}}{q_{O_2, max (Alaclor)}} = \frac{13.74}{11.53} \approx 1.25 \pm 0.06 \quad \text{Ec. 4.12}$$

Cada velocidad de consumo de sustrato y de oxígeno se determina independientemente, midiendo el COD y el porcentaje de oxígeno en línea, respectivamente y μ se obtiene del ajuste del modelo de crecimiento. Pese a ello, la relación que existe entre estos valores para el cultivo blanco y el ensayo con alaclor tratado es 1.25 ± 0.06 (Ecuación 4.12), lo que demuestra que el modelo propuesto ajusta bien los datos experimentales.

La eficiencia de biodegradación expresada según la Ecuación 4.10 fue 57% en los experimentos en Erlenmeyer a 103 min (Figura 4.12) en 96 h. Sin embargo, la principal diferencia en el experimento escalado a 12 L no fue la mayor eficiencia lograda (66%) sino que únicamente se requirieron 30 h para conseguirla. Así, para unos resultados cualitativos como determinar si las disoluciones fototratadas pueden ser compatibles con el crecimiento bacteriano, los experimentos en matraz pueden ser recomendables pero no si se requiere

una adecuada cuantificación del crecimiento, consumo de COD, etc., que son parámetros claves para el propio diseño del biotratamiento.

4.2.1.2. Pirimetanil

i) Estudio de la biodegradabilidad del plaguicida

Al igual que en el apartado 4.2.1.1, para comprobar que el pirimetanil no puede ser biodegradado por *P. putida* se realizaron ensayos en matraz con diferentes concentraciones de plaguicida sin tratar (0, 30, 60, 90 y 120 mg L⁻¹). La inoculación se realizó con 80 µL de un inóculo de *P. putida* que proviene de un stock mantenido a -70°C con lo que el propio stock bacteriano aporta una fuente de carbono adicional al medio (COD=360 mg L⁻¹ aproximadamente). Se mide el COD y la concentración de pirimetanil mediante HPLC cada 24 h y, en este caso, el consumo de carbono fue más lento que para el alaclor, siendo, después de 144 h, el consumo medio para las cinco muestras de 333.6 ± 14.3 mg L⁻¹ de COD y la concentración de pirimetanil constante, e igual a la inicial, en todos los ensayos. De este modo, análogamente al estudio de biodegradabilidad del alaclor, se puede concluir que el crecimiento de *P. putida* no está influenciado por la concentración de pirimetanil presente en el medio (en el intervalo estudiado) pero tampoco es capaz de biodegradarlo.

Sin embargo, el test de toxicidad realizado con *Vibrio fischeri* ofrece un EC₅₀ de 36.1 mg L⁻¹ para el pirimetanil (Oller y cols., 2006) lo que demuestra que este plaguicida puede ser nocivo (OCDE, 2003) para dicho microorganismo. Por tanto, con microorganismos tan sensibles como *Vibrio fischeri* no se puede extrapolar el valor de toxicidad para predecir si un contaminante será tóxico para un fango activo. De hecho, *Vibrio fischeri* se emplea por su alta sensibilidad para realizar medidas de ecotoxicidad. Por otro lado, cabe destacar que el retraso observado en el consumo de COD (144 h frente a 96 h de alaclor) puede ser debido a que el pirimetanil es más tóxico que el alaclor.

Previamente ha sido estudiada la biodegradabilidad de pirimetanil con el test de Zahn-Wellens (Oller, 2008). En este estudio se propone que el pirimetanil puede ser considerado muy lentamente biodegradable ya que se alcanza un 74% de biodegradabilidad en 28 días. Sin embargo, se realiza la evaluación de la adsorción del plaguicida sobre la biomasa, y se obtiene un 68% respecto a la concentración inicial de contaminante. Por lo tanto, al pirimetanil adsorbido coincide prácticamente con la biodegradación supuesta durante el ensayo de Zahn-Wellens. Debido a este fenómeno, el porcentaje de biodegradación obtenido no es real, sino que se corresponde con la

desaparición del compuesto por adsorción sobre la biomasa. De estos resultados se deduce la no biodegradabilidad del pirimetanil, lo que está en concordancia con los resultados presentados para *P. putida*.

ii) Degradación de pirimetanil mediante foto-Fenton

La degradación de pirimetanil mediante foto-Fenton se ha llevado a cabo dentro de la colaboración existente, en la Plataforma Solar de Almería en los fotorreactores descritos en el apartado 3.6.1. Igualmente, la concentración inicial de plaguicida seleccionada es 120 mg L^{-1} (cercana al límite de solubilidad para pirimetanil) aunque en este caso la concentración final medida por HPLC fue de 103 mg L^{-1} . Asimismo, la concentración inicial de Fe^{2+} empleada 20 mg L^{-1} y las adiciones de peróxido se realizan de forma controlada.

En este ensayo se degrada todo el pirimetanil en 108 min, cuando se ha mineralizado más del 30% del carbono orgánico inicial (Figura 4.15).

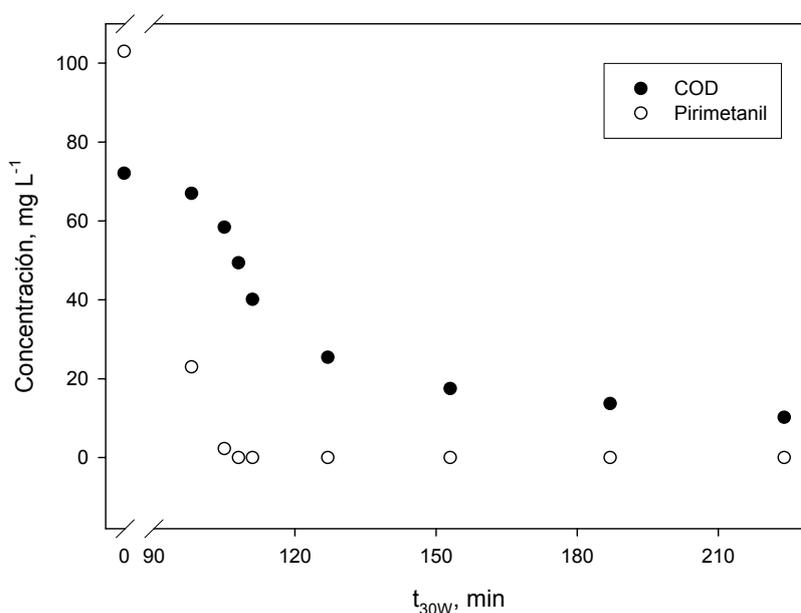


Figura 4.15. Degradación y mineralización del pirimetanil mediante foto-Fenton.

La degradación con foto-Fenton (empleando 20 mg L^{-1} de hierro) de este plaguicida ya ha sido estudiada anteriormente (Oller y cols., 2006). En este estudio se concluye que los 50 mg L^{-1} de plaguicida iniciales son eliminados casi en su totalidad durante la reacción Fenton (sin luz solar) pero un 80% del COD inicial se mineraliza satisfactoriamente sólo si el fotorreactor está iluminado, consumiendo alrededor de 1530 mg L^{-1} de H_2O_2 . En este estudio no se obtenía ninguna mineralización apreciable del COD, lo que indica que, al

igual que para el alaclor, la reacción Fenton no es relevante para la mineralización de pirimetanil. El bajo consumo de peróxido de hidrógeno obtenido en a $t_{30W} = 0$ min en nuestro estudio durante la degradación de 103 mg L^{-1} incluido en la Tabla 4.7 corrobora dicha afirmación.

Tabla 4.7. Variación de la concentración de pirimetanil y COD con el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton. Se incluye también el H_2O_2 consumido.

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| t_{30W} , min | 0 | 98 | 105 | 108 | 111 | 127 | 153 | 187 | 224 |
| COD, mg L^{-1} | 72.1 | 67.0 | 58.4 | 49.4 | 40.1 | 25.4 | 17.5 | 13.7 | 10.2 |
| Pirimetanil, mg L^{-1} | 103 | 23 | 2.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mineralización, % | 0 | 7 | 19 | 32 | 44 | 65 | 76 | 81 | 86 |
| H_2O_2 consumido, mg L^{-1} | 2.1 | 44.9 | 88.0 | 148 | 208 | 263 | 330 | 407 | 480 |

iii) Análisis de la biodegradabilidad de los intermedios generados en la degradación de pirimetanil a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton

Para evaluar la biodegradabilidad de los intermedios y determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton, análogamente al ensayo con alaclor, se realiza la biodegradación con *P. putida* de las aguas obtenidas a diferentes intensidades de tratamiento.

En la Figura 4.16 se ilustra la evolución en la concentración de biomasa y COD con el tiempo de tratamiento biológico. En este experimento, a las 72 h el consumo de COD aumenta conforme se incrementa la intensidad de tratamiento foto-Fenton, excepto a $t_{30W}=108$ min (32% mineralización) donde el descenso en el COD es más acusado por lo que la biomasa alcanzada supera a la del resto de ensayos. 24 h después la tendencia es equivalente (mayor consumo de COD a mayor t_{30W} y mineralización) completándose el consumo de COD a las 144 h.

Los intermedios generados en el tratamiento de pirimetanil mediante foto-Fenton son más biodegradables que el plaguicida (Figura 4.17) de partida. Dicha afirmación está de acuerdo con lo observado por otros autores (Agüera y cols., 2000) que realizaron un estudio de degradación de pirimetanil, empleando óxido de titanio como catalizador, en el que se formaban multitud de intermedios alifáticos (acetilurea, acetamida, formamida, etc.) después de la apertura del anillo de pirimidina que no eran tóxicos para *Vibrio fischeri*, más

aún, el porcentaje de inhibición decrecía continuamente con el tiempo de tratamiento. Oller y cols. (2006) también han estudiado la toxicidad usando *Vibrio fischeri* a diferentes tiempos de tratamiento, demostrando que decrece durante el proceso foto-Fenton.

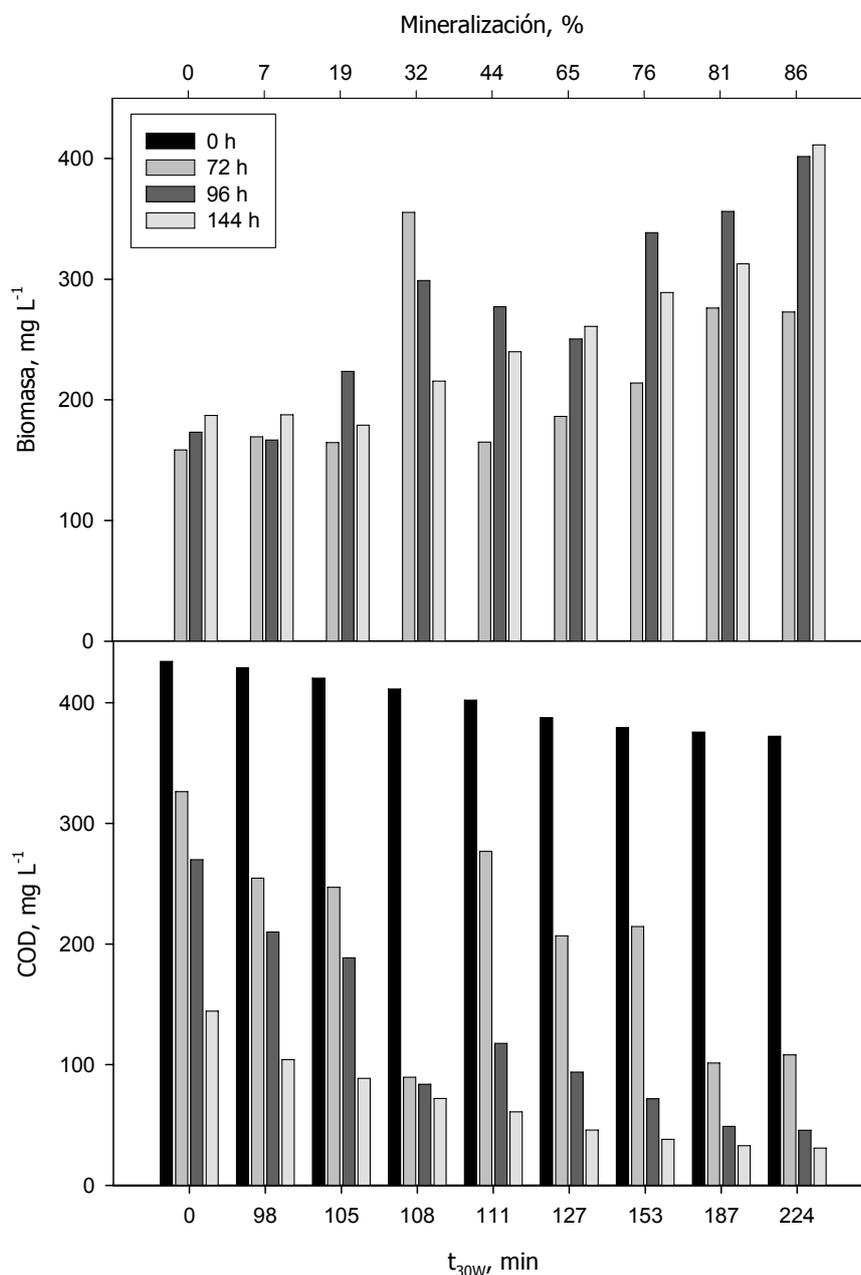


Figura 4.16. Evolución de la concentración de *P. putida* y COD en muestras de pirimetanil fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Los tiempos que aparecen en la leyenda corresponden al ensayo biológico.

Hasta $t_{30w}=105$ min la eficiencia de biodegradación es inapreciable (Figura 4.17) y a los 108 min (32% de mineralización mediante foto-Fenton) la eficiencia es sólo del 15%. Después de esta intensidad de tratamiento, la eficiencia se incrementa hasta un máximo del 91% a $t_{30w} = 224$ min cuando la mineralización es casi completa, al final del proceso fotocatalítico.

Si se comparan estos datos con los obtenidos para el ensayo con alaclor se observa que son necesarios tiempos de tratamiento fotocatalítico mayores para alcanzar eficiencias similares y que es necesario que desaparezca totalmente el pirimetanil para que comience la biodegradación de los intermedios. Asimismo, al igual que ocurre con el alaclor, las medidas de HPLC (Figura 4.18) confirman que el pirimetanil no es degradado en las muestras en que se encuentra como compuesto puro (a $t_{30W} = 0, 98$ y 105 min).

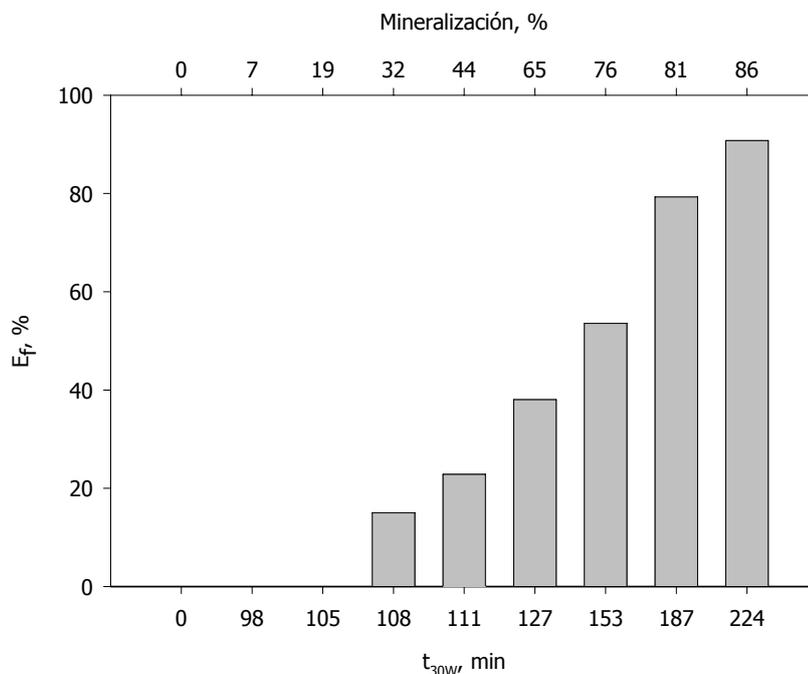


Figura 4.17. Eficiencia de biodegradación (E_f) a las 144 h de tratamiento biológico en muestras de pirimetanil fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton.

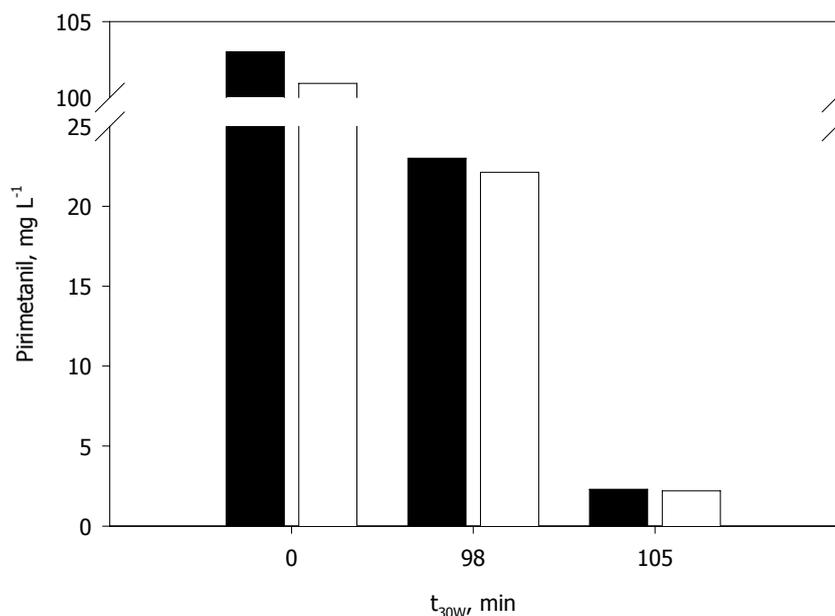


Figura 4.18. Concentración de pirimetanil. Las columnas en negro representan los valores iniciales de concentración (antes del tratamiento biológico). Las columnas blancas indican las concentraciones de pirimetanil después de las 144 h de tratamiento biológico.

Por tanto, se puede deducir que el tiempo mínimo para el acoplamiento es aquel en el que se ha degradado más de un 30% del carbono orgánico inicial (en este caso a $t_{30W} = 108$ min). Para este tiempo la biodegradabilidad del efluente comienza a ser apreciable y ha desaparecido por completo el plaguicida.

iv) Cinética de biodegradación de los intermedios generados en la degradación de pirimetanil mediante foto-Fenton

Para realizar el estudio cinético se lleva a cabo un pretratamiento mediante foto-Fenton hasta un 27% de mineralización, cercano al tiempo mínimo de tratamiento fotocatalítico predicho en el apartado anterior. Como se muestra en la Figura 4.17, las muestras comenzaron a ser biodegradables a partir de un 32% de mineralización. En este caso, no ha sido posible alcanzar exactamente el mismo porcentaje de mineralización pero esta ligera diferencia no influye en los resultados globales, como se demuestra posteriormente.

Como se observa en la Figura 4.19 el crecimiento tiene lugar en 16 h una vez que las células se adaptan a la disolución de pirimetanil tratado.

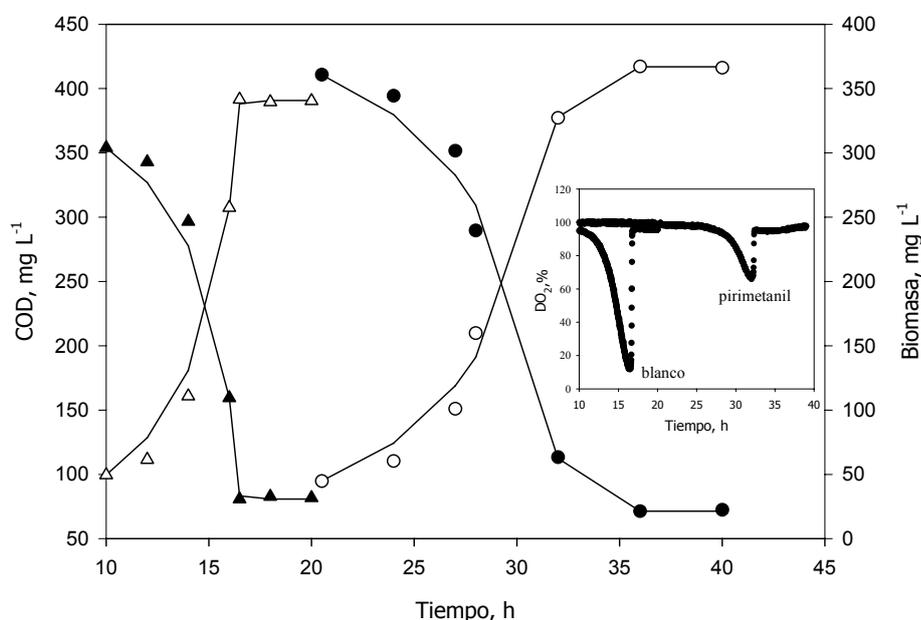


Figura 4.19. Biomasa (○) y COD (●) para el experimento con pirimetanil tratado y biomasa (Δ) y COD (▲) para el ensayo en blanco en una columna de burbujeo. Las líneas representan las estimaciones del modelo. En la gráfica anexa se representa la evolución del porcentaje de oxígeno disuelto para ambos ensayos.

Además, la velocidad de respiración específica máxima alcanzada a las 32 h tras la inoculación ($7.34 \text{ mmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y la velocidad de consumo de COD ($50 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) son mucho menores que para el ensayo con alaclor. Al igual que para dicho ensayo, se observa un decrecimiento en la actividad metabólica de las células causada por la presencia de los intermedios.

Los datos experimentales de biomasa y COD se ajustaron nuevamente a una cinética tipo Andrews como se muestra en la Figura 4.19 obteniéndose los valores de los parámetros biocinéticos (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Valores de los parámetros del modelo cinético de crecimiento para el ensayo con pirimetanil.

| | Velocidad de crecimiento específica máxima, μ_{\max}, (h^{-1}) | Constante de saturación, K_S, (mg L^{-1}) | Constante de inhibición, K_I, (mg L^{-1}) |
|-------------|--|---|---|
| Pirimetanil | 0.59 | 55 | 110 |

El menor valor de μ_{\max} alcanzado es acorde con un mayor tiempo para alcanzar la concentración de biomasa máxima (16 h, el doble que para el alaclor) como se ilustra en la Figura 4.19, mientras que no existen prácticamente diferencias en K_S y K_I respecto al ensayo con alaclor. Para ambos ensayos el coeficiente de rendimiento de biomasa en sustrato ($Y_{X/S}$) fue 0.94 g g^{-1} .

Análogamente a la Ecuación 4.13 las velocidades calculadas para el blanco y el experimento con pirimetanil son:

$$\frac{\mu_{(\text{Blanco})}}{\mu_{(\text{Pirimetanil})}} = \frac{0.30}{0.18} \approx \frac{r_{\text{COD, max (Blanco)}}}{r_{\text{COD, max (Pirimetanil)}}} = \frac{100}{50} \approx \frac{q_{\text{O}_2, \text{ max (Blanco)}}}{q_{\text{O}_2, \text{ max (Pirimetanil)}}} = \frac{13.74}{7.34} \approx 1.85 \pm 0.17 \quad \text{Ec. 4.13}$$

Por otra parte, la eficiencia de biodegradación (E_f) para los intermedios de la reacción con pirimetanil es del 45%, tres veces mayor que la alcanzada en matraces a t_{30W} de 108 min, que fue del 15%, y en un menor tiempo de tratamiento biológico de 32 h. De este modo, las condiciones de biodegradación tienen un fuerte impacto en el proceso de biodegradación, lo que debe tenerse en cuenta al considerar la biodegradabilidad de una muestra ensayada en matraz.

Con los resultados mostrados se puede concluir que ni alaclor ni pirimetanil son tóxicos para *P. putida* en las concentraciones ensayadas, pero tampoco son

biodegradables. Esto pone de evidencia la necesidad de una etapa previa para aumentar la biodegradabilidad de aguas que contienen estos contaminantes.

Asimismo, se ha comprobado que *P. putida* es útil para determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante PPOA para el acoplamiento con una oxidación biológica, pudiendo ser una alternativa rápida y sencilla a otros métodos de evaluación de la biodegradabilidad como DBO y Zahn-Wellens que emplean fangos activos. Dependiendo del plaguicida ensayado el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton puede variar, así como la eficiencia en el proceso biológico. También dependiendo del plaguicida de partida las velocidades de respiración y de consumo de carbono pueden ser muy diferentes, debido a cambios en las cinéticas de crecimiento del microorganismo.

4.2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton de un agua contaminada con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales mediante *P. putida*

Si se pretende llevar a cabo la degradación de plaguicidas en aguas residuales reales es más probable encontrar mezclas de plaguicidas que plaguicidas de forma individual. Asimismo, como se ha comprobado en el apartado anterior, la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton y la cinética del proceso biológico varían considerablemente dependiendo del tipo de plaguicida presente en el agua a tratar. Por tanto, para conseguir una mayor aplicabilidad de los resultados, se realiza el estudio del tiempo mínimo de tratamiento con mezclas de plaguicidas. Además, si se plantea una estrategia de depuración de un agua contaminada de forma más generalizada, se debe tener en cuenta que el modo en que se distribuyen los plaguicidas para su empleo en agricultura es en su forma comercial y no como principio activo. Por consiguiente, se ha escogido estudiar una mezcla de plaguicidas comerciales.

Se trabaja con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales (Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid) con una concentración inicial de COD de 180 mg L^{-1} . Al igual que en el caso de los plaguicidas individuales, se determina el tiempo mínimo de tratamiento con foto-Fenton y se realiza un estudio cinético con *P. putida* con el fin de determinar los cambios producidos en el metabolismo bacteriano por la presencia de los diversos intermedios.

En la Figura 4.20 se presentan los principios activos (dimetoato, metiloxidemeton carbaril y metidation) y su porcentaje en la formulación de los insecticidas Laition,

Metasystox, Sevnol y Ultracid, respectivamente. Como se observa en su estructura, el plaguicida carbaril es un insecticida de la familia de los carbamatos y el resto de compuestos son organofosforados. Los cuatro compuestos son considerados por la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC) como contaminantes orgánicos prioritarios. Además, los límites máximos de residuos en alimentos del dimetoato y metiloxidemeton están también regulados por la legislación europea (Directiva 2002/71/EC) al igual que los de carbaril y metidation (Directiva 2006/59/EC).

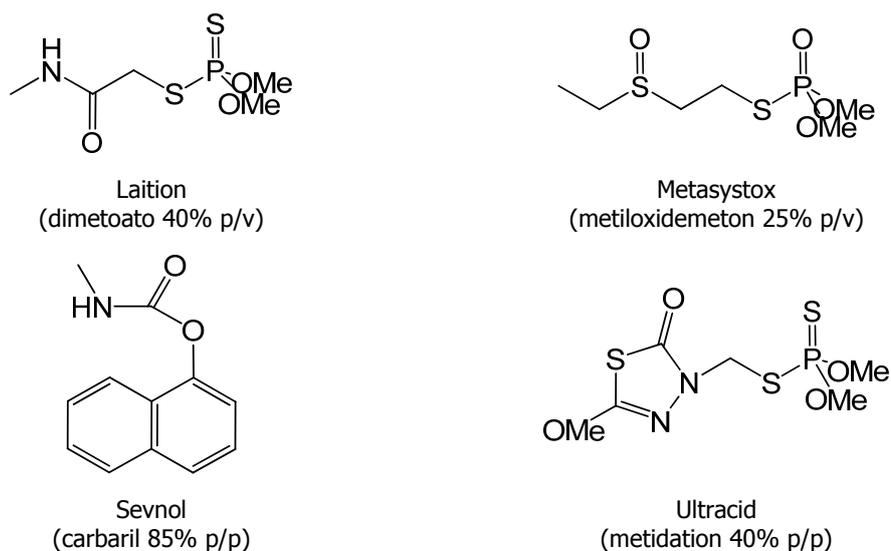


Figura 4.20. Principios activos de los insecticidas Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid.

i) Degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton

Este tratamiento se ha llevado a cabo en la Plataforma Solar de Almería por el Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Universidad Politécnica de Valencia. Se pretende emplear para este ensayo 50 mg L^{-1} de cada principio activo, sin embargo, debido a la formación de espumas (parte del principio activo se retiene en la espuma) al comienzo de la reacción y a una ligera hidrólisis de los plaguicidas durante la homogenización, la concentración inicial de cada plaguicida difiere de este valor. De esta forma la concentración inicial de COD aportada por la mezcla de los cuatro plaguicidas es de 180 mg L^{-1} . Las concentraciones iniciales medidas por HPLC se muestran en la Tabla 4.9.

La degradación de los cuatro plaguicidas se produce a $t_{30W}=78 \text{ min}$ (Figura 4.21), aunque a este tiempo aún quedan 3 mg L^{-1} de carbaril, cuando se ha mineralizado prácticamente el 20% del carbono orgánico inicial. Al igual que para los tratamientos con foto-Fenton de alaclor y pirimetanil, en este caso la reacción se detuvo antes de

consumirse completamente el COD para poder llevar a cabo la posterior degradación biológica con *P. putida* en todas las muestras.

Tabla 4.9. Variación de la concentración de los cuatro principios activos de los plaguicidas y COD con el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton. Se incluye también el H₂O₂ consumido.

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| t _{30w} , min | 0 | 21 | 45 | 78 | 91 | 111 | 135 | 144 | 167 | 199 |
| COD, mg L ⁻¹ | 180 | 163 | 161 | 146 | 128 | 120 | 95.6 | 73.8 | 46.2 | 37.7 |
| Mineralización, % | 0 | 9 | 11 | 19 | 29 | 33 | 47 | 59 | 74 | 79 |
| H ₂ O ₂ consumido, mg L ⁻¹ | 0 | 29.6 | 94.9 | 194 | 285 | 250 | 597 | 659 | 745 | 811 |
| dimetoato, mg L ⁻¹ | 47.4 | 14.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| metiloxidemeton, mg L ⁻¹ | 36.2 | 19.1 | 5.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| carbaril, mg L ⁻¹ | 44.8 | 22.9 | 12.9 | 3.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| metidation, mg L ⁻¹ | 47.1 | 13.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

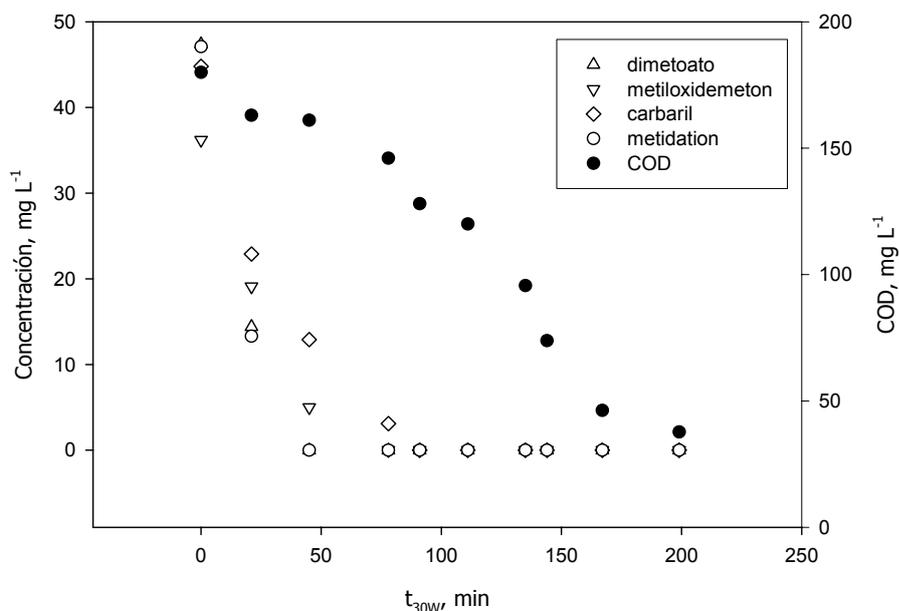


Figura 4.21. Degradación y mineralización de la mezcla de dimetoato, metiloxidemeton, carbaril y metidation mediante foto-Fenton.

La degradación de la mezcla de los cuatro plaguicidas seleccionados ya ha sido realizada previamente (Vicente Candela, 2007) mediante foto-Fenton con 20 mg L⁻¹ de hierro y partiendo de concentraciones de principio activo semejantes. En dicho ensayo son necesarios 81 min para la completa degradación de los cuatro plaguicidas cuando se ha mineralizado el 37% del COD inicial. Igualmente, el último plaguicida en degradarse es el carbaril debido a la ausencia de grupo tiosulfato que es el que más rápido se elimina en el resto de compuestos. Tras 224 min de tiempo de tratamiento aún sigue quedando COD residual (19 mg L⁻¹).

También existen ensayos previos realizados con foto-Fenton (20 mg L^{-1}) para degradar 50 mg L^{-1} del compuesto puro dimetoato (Oller y cols., 2007a) en los que son necesarios 35 min para su completa eliminación o para la degradación de 136 mg L^{-1} de compuesto puro carbaril (García-Ripoll y cols., 2008) que desaparece por completo cuando se ha mineralizado el 25% del COD inicial. Estos ensayos están en concordancia con los realizados en esta Memoria siendo aquí necesarios 45 min para la desaparición del dimetoato y un 29% de la mineralización del COD inicial para degradar por completo el carbaril.

Sin embargo, los estudios de degradación de metiloxidemeton y metidation existentes en bibliografía se han realizado mediante fotocatalisis con TiO_2 . Con esta técnica se consiguen degradar 50 mg L^{-1} del compuesto activo metiloxidemeton en 180 min (Arqués y cols., 2007b) y 50 mg L^{-1} de metidation en aproximadamente 100 min (García-Ripoll y cols., 2007), siendo la degradación mucho más rápida en el caso del compuesto puro que en la formulación comercial.

ii) Análisis de la biodegradabilidad de los intermedios generados en la degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas a diferentes tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton

La Figura 4.22 ilustra los cambios en el crecimiento bacteriano y en la concentración de COD con el tiempo de tratamiento biológico a los diez tiempos de tratamiento con foto-Fenton seleccionados. A bajos tiempos de fototratamiento, cuando todos los plaguicidas están aún presentes en las muestras (ensayos 1 y 2, Tabla 4.9) son necesarias 72 h para que las células se adapten a los nuevos nutrientes, completándose el crecimiento a las 120 h.

Por otra parte, a tiempos largos de fototratamiento ($t_{30W} \geq 111 \text{ min}$) se obtiene la máxima concentración de biomasa a las 48 h, causando un descenso acentuado de la concentración de COD (Figura 4.22). Para $t_{30W} = 91 \text{ min}$ el crecimiento comienza a las 48 h completándose a las 72 h. De este modo, en todos los casos, las células fueron capaces de adaptarse a la mezcla de intermedios y crecer sobre las fuentes de carbono biodegradables disponibles.

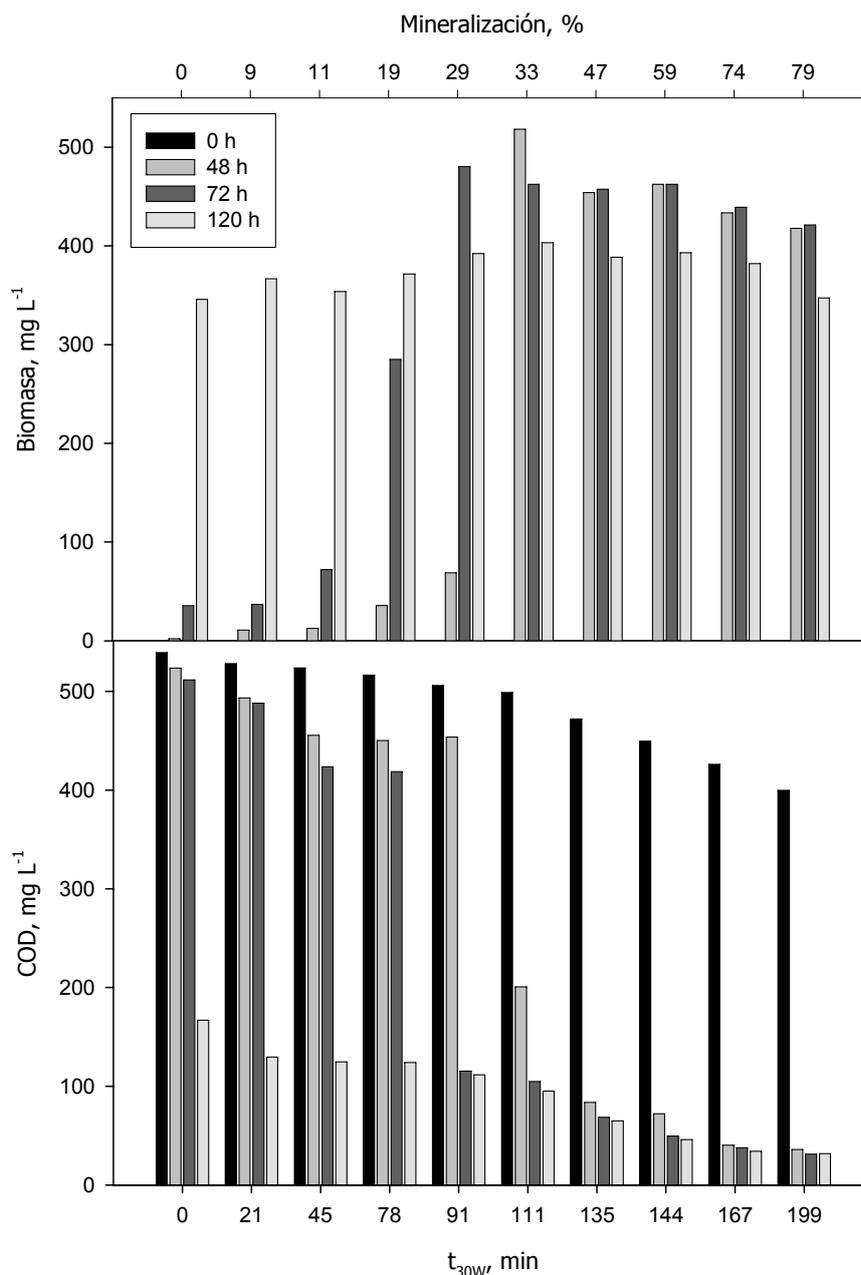


Figura 4.22. Evolución de la concentración de *P. putida* y COD en muestras de la mezcla de cuatro plaguicidas fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Los tiempos que aparecen en la leyenda corresponden al ensayo biológico.

Teniendo en cuenta el alto contenido en COD proveniente de la disolución criogénica en la que está contenida *P. putida*, los resultados de consumo de COD no son concluyentes ya que el COD proveniente del tratamiento mediante foto-Fenton y de la disolución criogénica no pueden ser diferenciados. Sin embargo, comparando los datos de biomasa y COD (Figura 4.22), y eficiencia de biodegradación, E_f (Figura 4.23), se puede concluir que $91 \text{ min} < t_{30w} < 111 \text{ min}$ es el punto crítico para el tratamiento con foto-Fenton. Después de este tiempo el crecimiento bacteriano se completa en 48 h y la mayoría del COD disponible se consume. De hecho, en todos los casos en los que t_{30w} es

mayor de 91 min, las medidas de COD realizadas después de 72 h de tratamiento biológico disminuyen drásticamente.

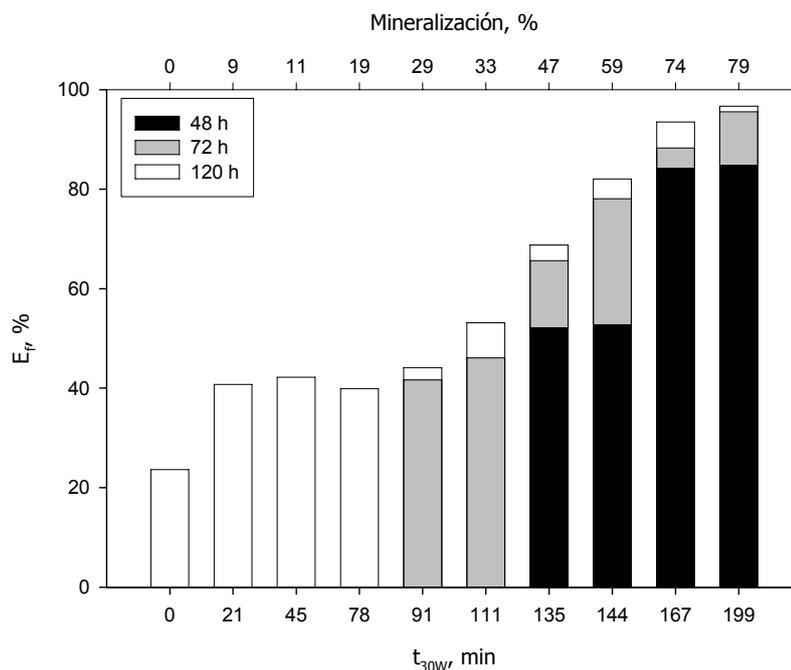


Figura 4.23. Evolución de la eficiencia de biodegradación (E_f) en muestras de una mezcla de cuatro plaguicidas fototratada en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton.

La eficiencia de biodegradación (E_f) de los intermedios de la fotorreacción se calculó, al igual que para los plaguicidas individuales (Ecuación 4.10), cuando el COD consumido se mantiene constante, en este caso a las 120 h. Representando el valor de la eficiencia de biodegradación en función del avance de la reacción (expresado como mineralización o t_{30W}) se diferencian claramente dos regiones (Figura 4.23). Hasta $t_{30W}=90$ min la eficiencia fue constante (alrededor del 40%) y el COD remanente se mantuvo en torno a 120 mg L^{-1} y a tiempos mayores se observa un incremento lineal de la eficiencia de biodegradación, alcanzando un 97% a los 199 min.

Los resultados presentados por Vicente Candela (2007) muestran que para la misma mezcla de cuatro plaguicidas existen también dos regiones claramente diferenciadas dependiendo de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Hasta $t_{30W} = 95$ min (44% de mineralización) la inhibición de la luminiscencia de *Vibrio fischeri* se encuentra por encima del 85% y, a partir de este tiempo la toxicidad disminuye con el tiempo de tratamiento. Además, a partir de $t_{30W} = 95$ min la relación DBO_5/DQO aumenta drásticamente hasta situarse por encima de 0.5, por lo que a partir de este momento las muestras pueden considerarse biodegradables. Para $t_{30W} = 81$ min (37% de mineralización) se observa un 60% de biodegradabilidad mediante el test de Zahn Wellens.

Por tanto, *P. putida* puede emplearse para predecir la biodegradabilidad de las muestras en tiempos mucho menores (en las primeras 48 h puede ya predecirse en las muestras más biodegradables) en comparación con otros métodos como la relación DBO₅/DQO o el test de Zahn Wellens. En el método Zahn Wellens son necesarios hasta 28 días de tratamiento biológico en matraces agitados y para el estudio de la DBO₅ (de cinco días de duración) es necesario realizar un blanco y, al menos tres ensayos con tres diluciones diferentes de la muestra para tener unos resultados fiables, con lo que el tiempo empleado puede incrementarse notablemente dependiendo de la disponibilidad de unidades de medida.

Asimismo, los ensayos con *P. putida* pueden ofrecer una reproducibilidad de los datos más elevada, ya que se trabaja con un cultivo monoespecífico bacteriano empleando un inóculo estándar preparado *a priori* y no con la complejidad de microorganismos que constituyen la biomasa de los fangos activos. En los ensayos de DBO₅/DQO o el test de Zahn Wellens el inóculo proviene de una EDAR con fangos con diferente actividad metabólica dependiendo de las condiciones ambientales, vertidos tóxicos puntuales (estacionalidad de los vertidos), problemas de esponjamiento filamentoso (bulking), formación de espumas (foaming), etc, con lo que pueden arrojar resultados variables. Además, el estudio de la DBO₅ no siempre es representativo del comportamiento en una EDAR, ya que las condiciones del bioensayo son muy restrictivas (Lapertot y Pulgarín, 2006).

La reproducibilidad en los ensayos con *P. putida* puede compararse evaluando las eficiencias de biodegradación en los ensayos para los plaguicidas individuales y la mezcla de cuatro plaguicidas cuando el porcentaje de mineralización alcanzado es el máximo. A elevados tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton, el COD aportado por el efluente de dicho tratamiento es poco significativo y la eficiencia de biodegradación es debida casi exclusivamente al COD aportado por la disolución criogénica. Comparando los tres experimentos, la eficiencia de biodegradación (al final del tratamiento biológico) para los ensayos en los que la mineralización es máxima, fue del $95 \pm 4\%$.

En vista del valor de E_f a $t_{30W} = 0$ (24%, aproximadamente), podría suponerse que los plaguicidas fueran biodegradables sin necesidad de pretratamiento mediante PPOA o estar adsorbidos en la biomasa. Por consiguiente, es interesante analizar la concentración del plaguicida, y no sólo el COD durante el biotratamiento. La concentración de plaguicida residual en los experimentos a menores t_{30W} (muestras 1 y 2 para dimetoato y metidation, muestras 1-3 para metiloxidemeton y muestras 1-4 para carbaril, Tabla 4.9) demuestran

que no se eliminan sustancialmente en ninguno de los ensayos, quedando una concentración apreciable al final de la degradación biológica (Figura 4.24).

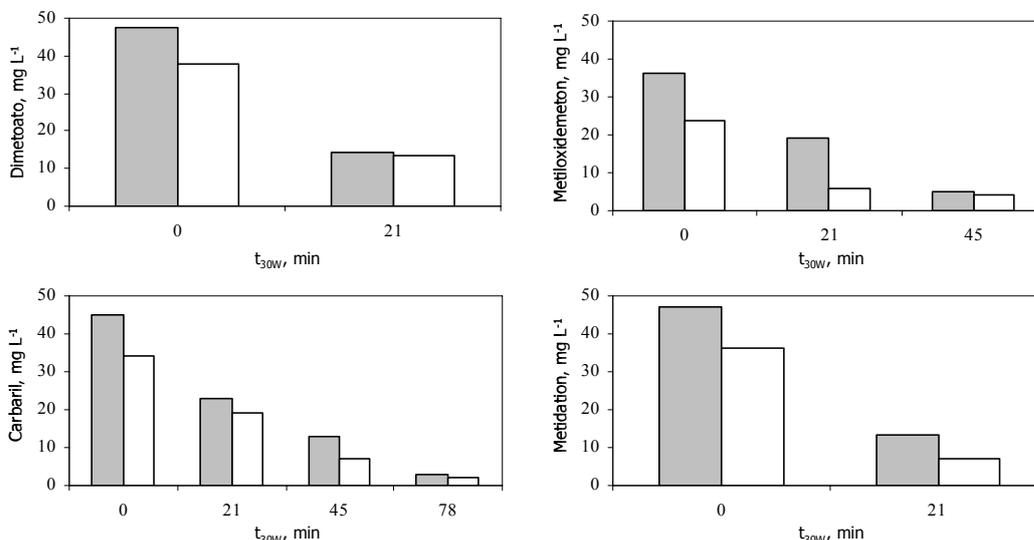


Figura 4.24. Concentraciones de dimetoato, metiloxidemeton, carbaril y metidation. Las columnas en color gris representan los valores iniciales (antes del tratamiento biológico) y las blancas son las concentraciones después de 120 h de tratamiento biológico.

En todos los casos, a $t_{30W} = 0$ se observa una ligera eliminación del principio activo. Dimetoato y carbaril son más difíciles de eliminar (con un 21% de eliminación para dimetoato y un 24% de degradación para carbaril en la muestra 1). No obstante, casi la mitad de concentración de metidation desaparece del medio y un 69% de metiloxidemeton en la muestra 2. Estos resultados son consistentes con una importante adsorción en la biomasa y, por consiguiente, los datos obtenidos explican una $E_f \approx 24\%$ cuando $t_{30W} = 0$ (Figura 4.23).

En cualquier caso, los resultados mostrados en la Figura 4.22, evidencian que la desaparición de los plaguicidas no está acompañada de un crecimiento sustancial en la concentración de biomasa. Por consiguiente, la presencia de los plaguicidas es perjudicial para el metabolismo bacteriano y deben degradarse con el proceso foto-Fenton antes de acoplar el tratamiento biológico. Esta afirmación es coherente con resultados previos encontrados para estos plaguicidas en ensayos con un respirómetro de fangos activos provisto de un reactor biológico y sensor de oxígeno. En estos experimentos se registró una inhibición importante de la respuesta del fango activo en todos los casos en los que la muestra de plaguicidas no estaba tratada ($t_{30W} = 0$ min): 55% para dimetoato (García-Ripoll y cols., 2007), 45% para metidation (Arqués y cols., 2007a), 59% para carbaril (García y cols., 2006) y 79% para metiloxidemeton (Arqués y cols., 2007b).

A tiempos de fototratamiento más largos E_f es mucho mayor, y comienza a crecer significativamente en las muestras en las que se ha fotodegradado por completo el plaguicida. Esto demuestra que a tiempos cortos de tratamiento mediante foto-Fenton aún están presentes intermedios no metabolizables por *P. putida*. Por tanto, un análisis conservativo para realizar un acoplamiento consideraría una intensidad de fototratamiento mínima en la que los plaguicidas son destruidos y E_f comienza a incrementarse, a partir de t_{30w} en torno a 100 min, alcanzándose una mineralización de un 30% del COD inicial aproximadamente.

Otros investigadores obtuvieron resultados similares para la mezcla de plaguicidas alaclor, atrazina, clorfenvinfos, diuron e isoproturon al integrar foto-Fenton y oxidación biológica con fangos activos (Lapertot y cols., 2007). En estos ensayos se determina que el acoplamiento debe realizarse cuando se ha mineralizado el 40% del COD inicial mediante foto-Fenton contribuyendo el tratamiento biológico en más del 50% de la eficiencia global. La diferencia en un 10% en la mineralización mediante foto-Fenton respecto a los resultados mostrados en esta Memoria puede deberse a la mayor complejidad de la muestra de cinco plaguicidas ensayados por Lapertot y cols. (2007) por lo que sea necesario aplicar una mayor intensidad de tratamiento fotocatalítico.

iii) Cinética de biodegradación de los intermedios generados en la degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas mediante foto-Fenton

Para estudiar con más detalle la respuesta de *P. putida* a los intermedios generados en el fototratamiento se repite la biodegradación pero aumentando de escala, de matraz a biorreactor. Por tanto, la biodegradación de la mezcla para un 30% de mineralización de COD se escala en un biorreactor tipo columna de burbujeo de 12 L. Esta intensidad de tratamiento representa un escenario conservativo, en el que puede asumirse que a mayores t_{30w} la eficiencia de biodegradación será mayor.

La Figura 4.25 muestra los cambios en la biomasa y COD con el tiempo de tratamiento biológico para el experimento blanco y con los intermedios del tratamiento mediante foto-Fenton de la mezcla de cuatro plaguicidas. Lo primero que cabe destacar es la mayor extensión de la fase de adaptación debido a la presencia de los productos de fotodegradación. Una vez que las células se han adaptado, el crecimiento tiene lugar en tan sólo 6-7 h, dando lugar a un fuerte descenso en la concentración de COD y a una intensificación en la velocidad de respiración. Además, la fase de adaptación es mucho

menor que en el ensayo realizado en matraz no estando los inóculos previamente adaptados en ninguno de los dos casos.

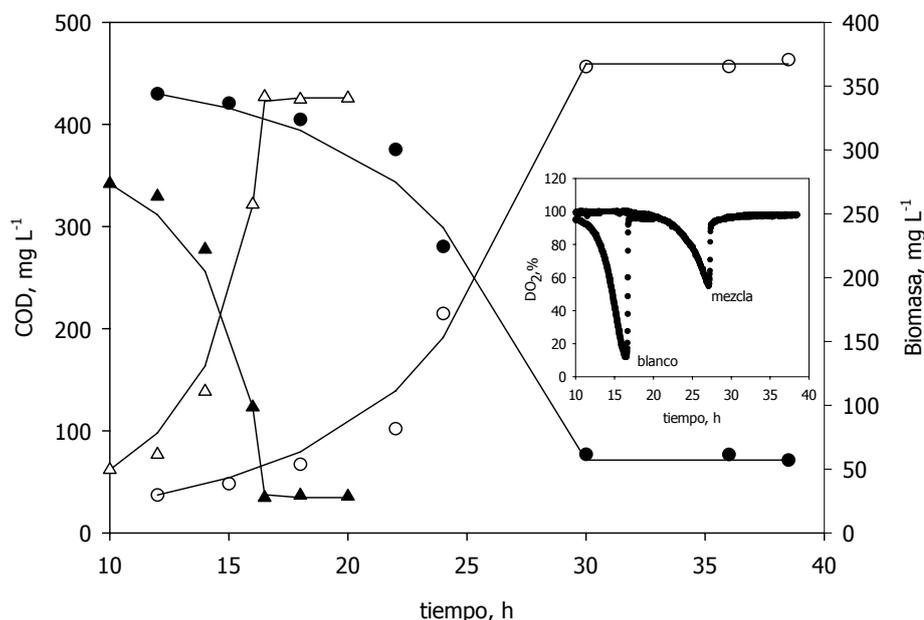


Figura 4.25. Biomasa (\circ) y COD (\bullet) para el experimento con la mezcla de cuatro plaguicidas tratada y biomasa (Δ) y COD (\blacktriangle) para el ensayo en blanco en una columna de burbujeo. Las líneas representan las estimaciones del modelo. En la gráfica anexa se representa la evolución del porcentaje de oxígeno disuelto para ambos ensayos.

La velocidad de respiración específica máxima, un importante parámetro para el escalado es de 13.74 y 6.02 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹ y la velocidad de consumo de oxígeno máxima de 7.5 y 2.7 mM h⁻¹ en el experimento en blanco y en la mezcla tratada, a las 16.3 y 27.1 h, respectivamente. Estos datos son similares a otros encontrados en bibliografía para la hidroxilación de tolueno mediante *P. putida* UV4, donde la velocidad de consumo de oxígeno máxima se usa para controlar el suministro de sustrato tóxico (Keulen y cols., 1998), y en la biotransformación de terpenos por *P. putida* (Carraghera y cols., 2001). En contraste con las medidas respirométricas, un decrecimiento en la velocidad de respiración no está relacionado con la toxicidad de la mezcla, sino con cambios en la respuesta cinética celular. Este detrimento en la actividad metabólica celular causado por los intermedios de la fotorreacción es también acusado cuando se consideran las velocidades máximas de consumo de COD, ya que disminuye de 100 a 55 mg L⁻¹ h⁻¹, en el blanco y en la mezcla fototratada, respectivamente.

Los parámetros cinéticos (Tabla 4.10) se obtuvieron, al igual que en caso de los plaguicidas individuales, ajustando los datos experimentales a una cinética de Andrews. Como se observa, la velocidad específica de crecimiento depende de la presencia de los

productos de degradación. La velocidad de crecimiento específica máxima es menor que en el experimento blanco y además, las células muestran menor afinidad para crecer sobre los intermedios de la mezcla fototratada como se pone de manifiesto por su mayor K_S . En ambos casos las constantes de inhibición son relativamente bajas si se comparan con el COD inicial por lo que la inhibición debe tenerse en cuenta para ambos ensayos, sin embargo, esta inhibición es más acentuada en el experimento con intermedios. Para los dos ensayos el coeficiente de rendimiento de biomasa en sustrato ($Y_{X/S}$) fue 0.94 g g^{-1} .

Tabla 4.10. Valores de los parámetros del modelo cinético de crecimiento para el ensayo con la mezcla fototratada. Comparación con el ensayo en blanco.

| | Velocidad de crecimiento específica máxima, μ_{\max}, (h^{-1}) | Constante de saturación, K_S, (mg L^{-1}) | Constante de inhibición, K_I, (mg L^{-1}) |
|--------|--|---|---|
| Blanco | 0.83 | 1.75 | 115 |
| Mezcla | 0.65 | 23.5 | 84 |

Las velocidades de crecimiento específicas calculadas para el blanco y la mezcla fototratada son 0.30 y 0.17, respectivamente, cuando las velocidades de consumo de COD son máximas, dando:

$$\frac{\mu_{(\text{Blanco})}}{\mu_{(\text{Mezcla})}} = \frac{0.30}{0.17} \approx \frac{r_{\text{COD, max (Blanco)}}}{r_{\text{COD, max (Mezcla)}}} = \frac{100}{55} \approx \frac{q_{\text{O}_2, \text{ max (Blanco)}}}{q_{\text{O}_2, \text{ max (Mezcla)}}} = \frac{13.74}{6.02} \approx 1.96 \pm 0.28 \quad \text{Ec. 4.14}$$

La eficiencia de biodegradación, E_f , para el ensayo en reactor fue del 60%, ligeramente superior a la muestra 6 con un $t_{30W} = 111 \text{ min}$ (Tabla 4.9). De nuevo, si se compara con los resultados obtenidos para los plaguicidas individuales la principal diferencia es que para el ensayo en matraz se necesitan en torno a 48-72 h para conseguir la máxima biodegradación y con el biorreactor la misma biodegradación se alcanza en menos de 30 h. El COD del efluente final tratado mediante foto-Fenton-oxidación biológica fue de 40 mg L^{-1} . Otros autores obtuvieron resultados similares para la biodegradación de aguas residuales industriales fenólicas en un biorreactor de lecho fluidizado por González y cols., (2001) con *P. putida* y con aguas residuales industriales contaminadas con α -metilfenilglicina en un biorreactor con fangos activos inmovilizados (Oller y cols., 2007c), donde el COD final fue de 40 y 30 mg L^{-1} , respectivamente.

Con los resultados mostrados se concluye que el ensayo con *P. putida* para determinar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton tiene una gran aplicabilidad, ya que puede emplearse con una mezcla compleja de cuatro plaguicidas comerciales con una concentración inicial muy elevada de COD.

Desde un punto de vista práctico, estos ensayos realizados en matraz serían muy útiles para establecer el momento en que conviene detener el tratamiento mediante foto-Fenton. Sin embargo, una vez que se ha seleccionado este tiempo, para determinar el comportamiento cinético de la disolución fototratada y conocer parámetros de diseño como velocidad de consumo de oxígeno, velocidad de consumo de COD, etc., el tratamiento biológico debe realizarse en un biorreactor a escala planta piloto.

La presencia de productos de degradación del tratamiento mediante foto-Fenton causa una disminución en la actividad bacteriana ya que las velocidades de crecimiento y de consumo de carbono son más lentas. Por ello, podrían ser necesarios tiempos de tratamiento biológico más largos que los habitualmente empleados en las EDAR para reducir los niveles de COD por debajo de valores medioambientalmente aceptables.

4.3. Acoplamiento de tratamiento mediante foto-Fenton y oxidación biológica para la depuración de efluentes contaminados con plaguicidas

Una vez que se determina el tiempo mínimo al cual el efluente del proceso fotocatalítico es biodegradado por *P. putida*, es necesario comprobar si un proceso biológico con fangos activos de depuradora es capaz de degradarlo de un modo eficaz, para que se corrobore la biodegradabilidad predicha.

Para llevar a cabo el tratamiento biológico se ha empleado un biorreactor secuencial discontinuo ("sequencing batch reactor", SBR). Son muchas las ventajas de este sistema (Irvine y Ketchum, 1989), principalmente su simplicidad, flexibilidad de operación y bajo coste (EPA, 1999). Por ello, el SBR es considerado una alternativa a los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales convencionales ya que realiza el tratamiento biológico y una clarificación en un único tanque operando en un menor espacio. Asimismo, están especialmente diseñados para el tratamiento de pequeños caudales de aguas residuales (EPA, 1999).

En este apartado se emplea un tanque agitado de 6 L de volumen de trabajo con el que se opera en modo secuencial discontinuo. Se llena el tanque con 6 L de fangos activos recogidos en la EDAR "El Bobar" de Almería, se mantienen 24 h con aireación y, transcurrido este tiempo, se dejan decantar. Dependiendo de la composición del fango (principalmente de la proporción de bacterias filamentosas) la decantación del fango puede variar considerablemente. Así, se retira el sobrenadante resultante después de aproximadamente 30 minutos de decantación y se reemplaza por un volumen igual de

efluente del tratamiento mediante foto-Fenton. Se deja reaccionar y cuando el fango no es capaz de degradar más COD es que el ciclo ha concluido, se repite de nuevo la operación para proceder a realizar el segundo ciclo y así sucesivamente.

Este método ha sido utilizado para la biodegradación de aguas municipales e industriales (Mace y Mata-Álvarez, 2002). Igualmente, se ha empleado con éxito en la combinación de un tratamiento previo con foto-Fenton para la eliminación de colorantes (García-Montaña y cols., 2006a; García-Montaña y cols., 2006b) y plaguicidas (Farré y cols., 2006; Farré y cols., 2007; Farré y cols., 2008). También se ha usado posterior al tratamiento de aguas con Fenton con una DQO inicial muy elevada (Lin y Jiang, 2003; Lin y Kiang, 2003; Tekin y cols., 2006) o procedentes de la industria textil (Fongsatitkul y cols., 2004) y combinado con un tratamiento electro-Fenton previo (Lin y Chang, 2000).

4.3.1. Estudios preliminares. Degradación de la mezcla de cuatro plaguicidas comerciales Laition, Metasystox, Sevnol y Ultracid

Para realizar el acoplamiento con fangos activos se parte del efluente del tratamiento mediante foto-Fenton de los cuatro plaguicidas, previamente estudiado con *P. putida*, en el que se ha mineralizado el 30% del COD inicial.

El reactor con 6 L de fangos activos se deja decantar y se retira el sobrenadante (aproximadamente 5 L) que se reemplaza por un volumen igual de efluente del proceso foto-Fenton convenientemente acondicionado para el tratamiento biológico (apartado 3.4). Una vez que todo el carbono orgánico se ha consumido, se repite la operación, decantando de nuevo y reemplazando el sobrenadante por el efluente fototratado. La operación no puede realizarse nuevamente ya que parte de la biomasa queda adherida en las paredes del reactor y la concentración de SVS resultante es insuficiente para realizar un tercer ciclo discontinuo secuencial.

Durante el transcurso del experimento se sigue en línea la medida del pH (que varía entre 6 y 8) y la temperatura siendo el valor promedio obtenido de 26.7°C. Asimismo, se realiza un seguimiento del oxígeno disuelto para determinar la velocidad de consumo de oxígeno (Figura 4.26).

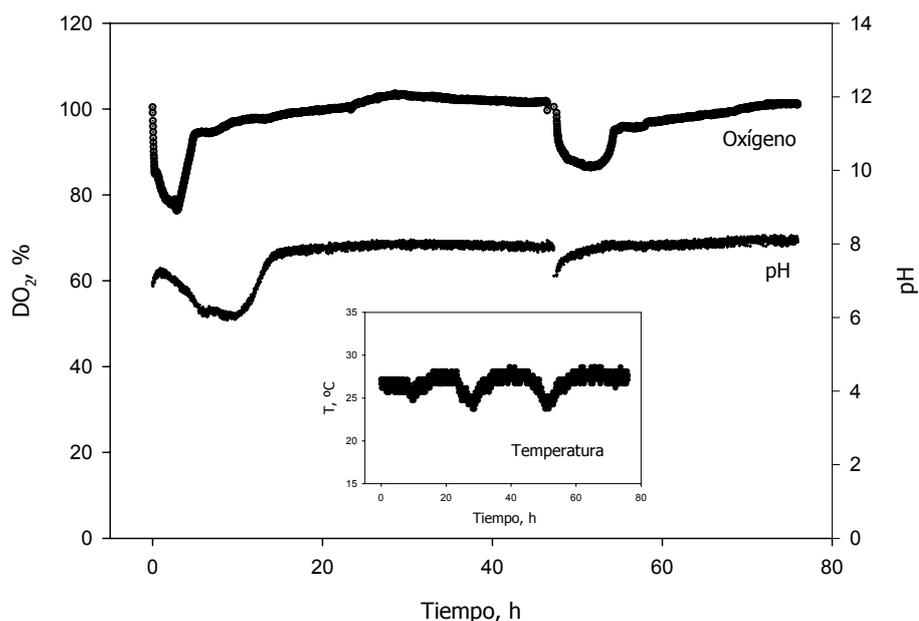


Figura 4.26. Evolución del oxígeno disuelto, pH y temperatura en el tratamiento biológico SBR del efluente del proceso foto-Fenton de la mezcla de 4 plaguicidas.

Como se ilustra en las Figuras 4.27 y 4.28 el COD se consume rápidamente siendo la disminución de DQO incluso más rápida, sobretudo al inicio del experimento, de modo que en 5 h se degradan más de 50 mg L⁻¹, y a partir de aquí disminuye muy lentamente durante las siguientes 20 horas.

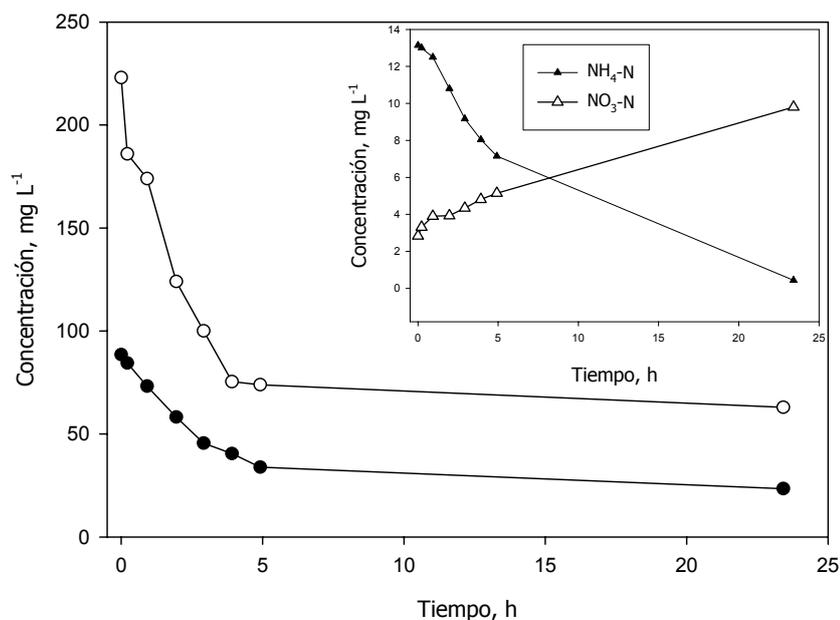


Figura 4.27. Evolución del COD (●) y DQO (○) en el primer ciclo discontinuo sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cuatro plaguicidas. En la gráfica anexa se representa el nitrógeno detectado en forma de amonio (▲) y nitrato (△) frente al tiempo de biodegradación.

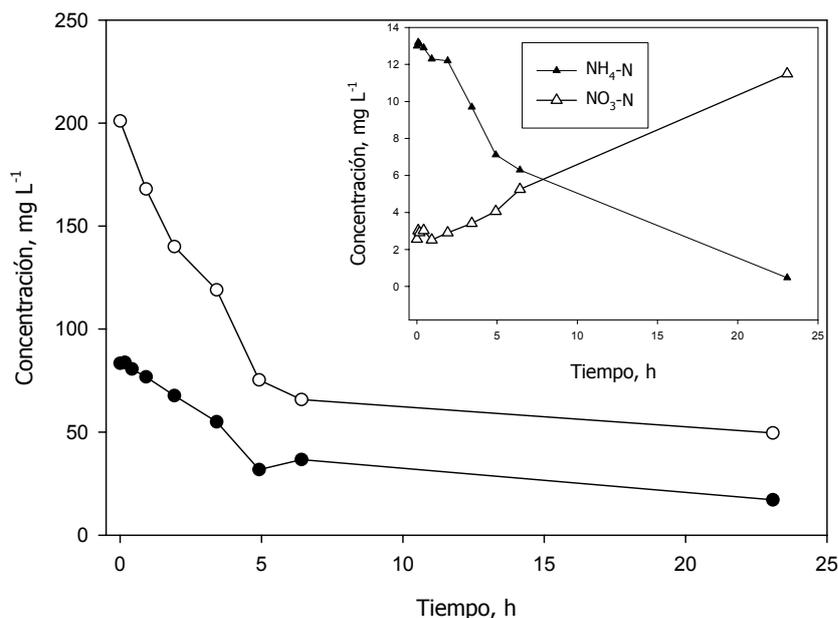


Figura 4.28. Evolución del COD (●) y DQO (○) en el segundo ciclo discontinuo sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cuatro plaguicidas. En la gráfica anexa se representa el nitrógeno detectado en forma de amonio (▲) y nitrato (△) frente al tiempo de biodegradación.

Antes de comenzar el primer ciclo, la concentración de sólidos volátiles en suspensión (SVS) es de 0.61 g L^{-1} y al concluir el ensayo la biomasa disminuye hasta 0.56 g L^{-1} lo que se puede atribuir a una pérdida de biomasa a lo largo del experimento por adhesión a las paredes del reactor y durante los ciclos por llevar a cabo la toma de muestra. Asimismo, cuando concluye el segundo ciclo, $SVS=0.49 \text{ g L}^{-1}$.

La velocidad máxima de degradación de COD en ambos ciclos es mucho menor que para el cultivo monoespecífico de *P. putida*, con valores de 11.4 y $10.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, debido a que la única fuente de carbono proviene de los intermedios generados durante el proceso de foto-Fenton. También es menor la velocidad máxima de consumo de oxígeno (1.62 y 0.85 mM h^{-1} a las 3 y 4.3 h en el ciclo 1 y 2, respectivamente). Sin embargo, el consumo de intermedios con fangos activos es inmediato y con *P. putida* son necesarias unas 30 h de tratamiento biológico. Los fangos provienen de una EDAR y no son previamente aclimatados a la mezcla de intermedios por lo que tiene más relevancia el que no se observe de fase de adaptación.

En ambos ciclos se mide la concentración de nitrógeno en forma de amonio y nitrato para garantizar que está transcurriendo adecuadamente el proceso de nitrificación en los fangos. Como se puede observar en las Figuras 4.27 y 4.28, el consumo de amonio (paralelo a la formación de nitratos) se produce hasta alcanzar valores finales de 0.4 - 0.5

mg L⁻¹ muy por debajo de los límites que impone la legislación española para aguas residuales urbanas (Real Decreto 509/1996) y la andaluza (Decreto 14/1996) para aguas litorales, siendo esta menos restrictiva.

Los valores de DQO al final del proceso de 63 y 49.6 mg L⁻¹ y los de COD (23.5 y 17.1 mg L⁻¹ en el ciclo 1 y 2, respectivamente) se encuentran típicamente en un biorreactor de una EDAR debido al metabolismo de los microorganismos que lo componen. Estos valores de COD están incluso por debajo de los valores iniciales de COD antes de añadir el efluente (32.1 y 19.6 mg L⁻¹, para el ciclo 1 y 2, respectivamente). Por tanto, la eficiencia de biodegradación alcanzada en ambos ciclos, E_f , es del 100% corroborándose que el efluente es biodegradable tal y como predicen los ensayos de biodegradabilidad con *P. putida*. En este caso la eficiencia final es mayor debido a que la capacidad de biodegradación de los fangos activos es muy superior a la de una única bacteria.

Las eficiencias de biodegradación conseguidas en estos dos ciclos son superiores a las encontradas en bibliografía. Así, en un acoplamiento electro-Fenton-SBR para el tratamiento de lixiviados de vertedero (Lin y Chang, 2000), el porcentaje de eliminación de DQO está en torno al 90% en cinco ciclos partiendo de una DQO inicial de 295 mg L⁻¹ y con una concentración de sólidos en suspensión de 10 g L⁻¹. Sin embargo, este alto porcentaje se debe a que el proceso fotocatalítico reduce el 85% de la DQO inicial. Otros autores alcanzan una eliminación de la DQO del 80% en la combinación de foto-Fenton y SBR para la depuración de un agua contaminada con 250 mg L⁻¹ de colorante Cibacron Red FN-R (García-Montaño y cols., 2006a) o con 50 mg L⁻¹ de COD provenientes de un agua contaminada con los plaguicidas linuron y diuron (Farré y cols., 2006) y empleando un fango con una concentración de 0.56 y 0.60 g L⁻¹. En estos casos los porcentajes de eliminación de COD con foto-Fenton son 50 y 36%, respectivamente, siendo superiores a la mineralización del 30% aplicada a la mezcla de cuatro plaguicidas estudiados en esta Memoria.

Con los resultados presentados se muestra que *P. putida* es un microorganismo válido para realizar estudios de biodegradabilidad de efluentes tratados mediante PPOA y determinar el punto óptimo (tiempo mínimo) de tratamiento fotocatalítico para una mezcla compleja de plaguicidas. Más aún, representa un método alternativo a los ya existentes que emplean fangos activos, como Zahn Wellens o la relación DBO₅/DQO en cuanto a disminución del tiempo de análisis y repetibilidad en los resultados.

4.3.2. Efecto de la influencia de la concentración inicial de COD. Degradación de la mezcla de cinco plaguicidas comerciales: Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala

Con los resultados anteriores ha quedado mostrado que *P. putida* es un microorganismo válido para determinar el tiempo mínimo de tratamiento fotocatalítico para un agua contaminada con una mezcla compleja de plaguicidas a una concentración inicial elevada ($\text{COD} = 180 \text{ mg L}^{-1}$), ya que un fango activo es capaz de biodegradar el efluente obtenido a este tiempo de tratamiento.

Sin embargo, es necesario establecer si la concentración inicial de carbono orgánico proveniente de los plaguicidas en el agua es determinante en la selección del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton, y si pueden producirse variaciones sustanciales en la biodegradación del efluente cuando se lleve a cabo la combinación del proceso fotocatalítico con una oxidación biológica con fangos activos de una EDAR.

Para realizar el estudio de la influencia de la concentración se ha seleccionado una segunda mezcla de cinco plaguicidas comerciales para ampliar la generalización de los resultados. Esta mezcla contiene Vydate (insecticida carbamato), Metomur (insecticida carbamato organoclorado), Couraze (insecticida neonicotinoide; piridilmetilamina), Ditimur (insecticida organofosforado) y Scala (fungicida pirimidina) cuyos principios activos son oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil en los porcentajes que se muestran en la Figura 4.29.

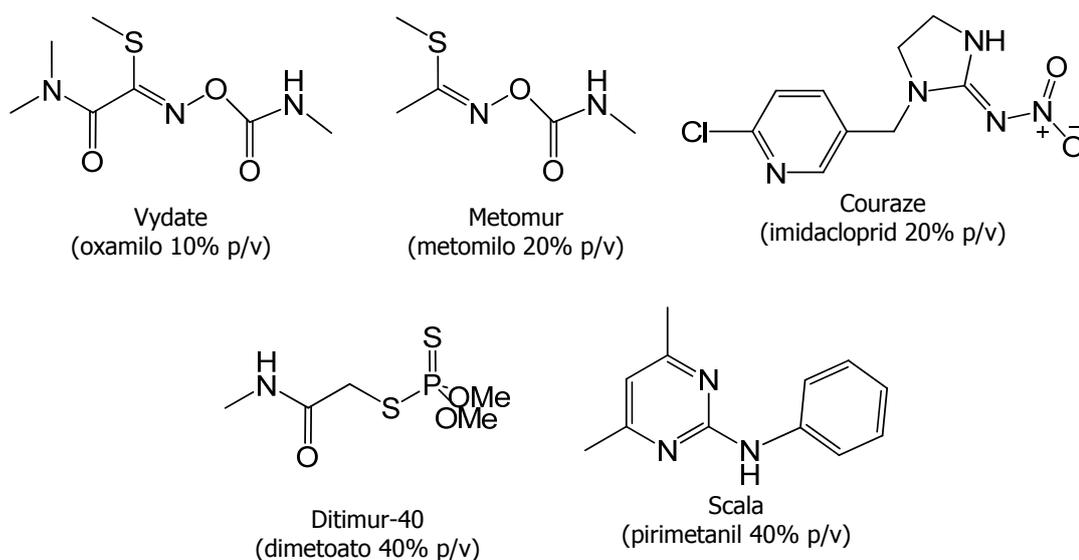


Figura 4.29. Principios activos de los plaguicidas Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala.

En este caso se vuelve a emplear dimetoato pero con una formulación comercial diferente y pirimetanil, ya estudiado previamente como producto puro de forma individual. Se trabajará a dos niveles de concentración inicial de COD; a 500 y 200 mg L⁻¹.

Los cinco plaguicidas son considerados por la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC) como contaminantes orgánicos prioritarios y el uso de los principios activos oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil está regulado mediante las Directivas 2006/16/EC, 2007/7/EC, 2006/26/EC, 2002/71/EC y 2006/74/EC.

Existen estudios previos (Oller y cols., 2006; Oller y cols., 2007a; Segura y cols., 2008) que indican la toxicidad y/o baja biodegradabilidad de los plaguicidas oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil, por lo que sería adecuado realizar un tratamiento mediante foto-Fenton para disminuir la toxicidad y elevar la biodegradabilidad de los mismos antes de un tratamiento biológico. Los compuestos oxamilo (empleado como Vydate) metomilo, dimetoato y pirimetanil a una concentración de 50 mg L⁻¹ muestran una elevada toxicidad en el test de *Vibrio fischeri* (Oller y cols., 2006) e igualmente, imidacloprid (100 mg L⁻¹) es tóxico para *Daphnia magna* (Segura y cols., 2008). Además, estudios de biodegradabilidad con fangos activos demuestran que metomilo y dimetoato no son biodegradables y que la biodegradabilidad de oxamilo y pirimetanil es baja (Oller y cols., 2006). La biodegradabilidad del imidacloprid no ha sido previamente evaluada y, debido a su compleja estructura química (Figura 4.24), no se realiza estudio de biodegradabilidad previa con *P. putida* ya que se prevé que sea poco o no biodegradable.

4.3.2.1. Degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton

i) Concentración de COD inicial de 500 mg L⁻¹

A diferencia de los experimentos fotocatalíticos anteriores, se fija un COD de partida (500 mg L⁻¹) que debe aportar la mezcla de plaguicidas. Por tanto, la concentración de COD de Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala inicial es de 100 mg L⁻¹ cada uno. Las concentraciones iniciales de cada principio activo (correspondiente a dicho COD) medidas por HPLC se presentan en la Tabla 4.11. Al igual que en los experimentos anteriores, la concentración inicial de Fe²⁺ es de 20 mg L⁻¹ y el peróxido de hidrógeno se adiciona de forma controlada para obtener muestras a diferentes intensidades de tratamiento. En el apartado 3.6.2 se describe la planta piloto empleada para la realización de los experimentos de foto-Fenton con la mezcla de cinco plaguicidas diseñada y

construida durante la realización de esta Tesis en el Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) de la Universidad de Almería.

Tabla 4.11. Variación de la concentración de los cinco principios activos de los plaguicidas y COD con el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton ($\text{COD}_i=500 \text{ mg L}^{-1}$). Se incluye también el H_2O_2 consumido.

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| t_{30W} , min | 0 | 68 | 128 | 179 | 220 | 257 | 295 | 386 | 532 |
| COD, mg L^{-1} | 485.7 | 463.7 | 459.3 | 386.4 | 343.7 | 294.9 | 234.3 | 207.3 | 169.3 |
| Mineralización, % | 0 | 4 | 5 | 20 | 29 | 39 | 52 | 57 | 65 |
| H_2O_2 consumido, mg L^{-1} | 0 | 128.6 | 300.0 | 642.9 | 814.3 | 985.7 | 1157.1 | 1328.6 | 1500.0 |
| oxamilo, mg L^{-1} | 197.4 | 134.3 | 82.7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| metomilo, mg L^{-1} | 51.3 | 35.6 | 21.7 | 0.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| imidacloprid, mg L^{-1} | 48.6 | 30.5 | 18.2 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| dimetoato, mg L^{-1} | 71.9 | 24.7 | 13.8 | 0.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pirimetanil, mg L^{-1} | 84.5 | 65.5 | 48.5 | 5.1 | 4.2 | 0.9 | 0.3 | 0 | 0 |

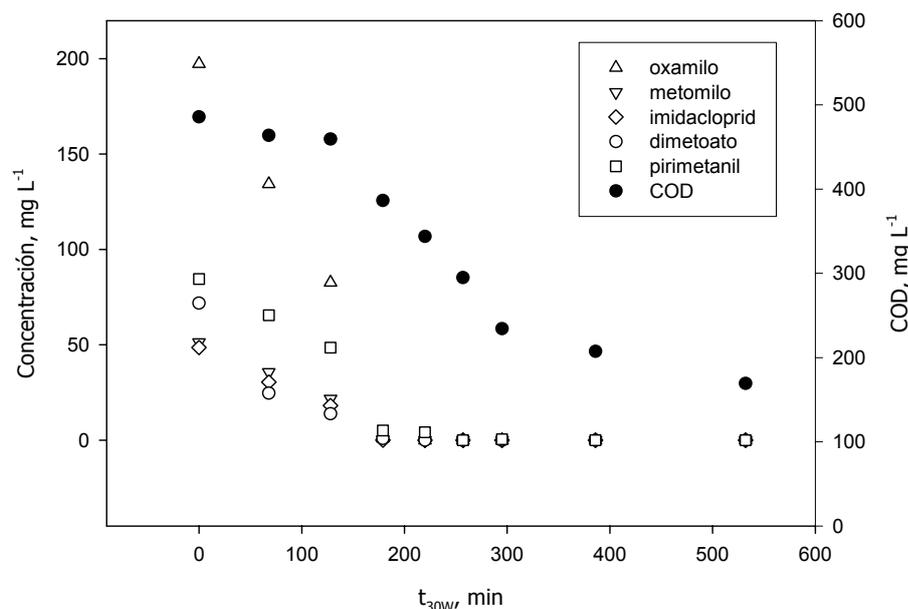


Figura 4.30. Degradación y mineralización de la mezcla de oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil mediante foto-Fenton con una concentración inicial de COD de 500 mg L^{-1} .

Los cinco plaguicidas se degradan por completo en el medio de reacción cuando se ha mineralizado el 57% del COD inicial (Figura 4.30), con un consumo de 1328.6 mg L^{-1} de peróxido de hidrógeno (Tabla 4.11). Sin embargo, cuando la mineralización es únicamente del 20% sólo quedan unos pocos miligramos de plaguicidas, encontrándose 5.1 mg L^{-1} de pirimetanil, que es el último plaguicida en degradarse por completo (a $t_{30W}= 257 \text{ min}$). Cabe destacar la rápida degradación del oxamilo pese a encontrarse al inicio de la reacción en una concentración mayor al doble respecto al resto de plaguicidas.

Varios investigadores han llevado a cabo previamente la degradación mediante foto-Fenton de los principios activos de los cinco plaguicidas de forma individual. Para oxamilo se ha empleado la formulación comercial (Oller y cols., 2006), siendo éste el que más tarda en degradarse (aproximadamente 50 min para degradar 50 mg L^{-1}). Metomilo se degrada en los primeros minutos (Oller y cols., 2006) al igual que imidacloprid (Malato y cols., 2002) y dimetoato y pirimetanil desaparecen en la etapa Fenton sin iluminación (Oller y cols., 2006).

También se ha estudiado la reacción foto-Fenton con 20 mg L^{-1} de hierro de una mezcla de cinco plaguicidas (Oller y cols., 2007a) muy similares a la mezcla objeto de estudio con 50 mg L^{-1} de metomilo, dimetoato, oxamilo (Vydate), pirimetanil y cimoxanilo (en lugar de imidacloprid). Para esta mezcla, se observa un efecto sinérgico en la degradación, de modo que los tiempos de degradación de cada plaguicida aumentan significativamente. El dimetoato se degrada en tan sólo 37 min frente a los 128 min necesarios en este ensayo para disminuir la concentración de plaguicida hasta 5 mg L^{-1} , oxamilo a los 72 min, metomilo a los 168 min (similar a los 179 min necesarios en este estudio para alcanzar una concentración muy baja de 0.4 mg L^{-1}) y pirimetanil a los 150 min.

ii) Concentración de COD inicial de 200 mg L^{-1}

El ensayo se repite en las mismas condiciones del apartado anterior pero con una concentración inicial de COD de 200 mg L^{-1} , por tanto, la concentración de COD aportada por cada plaguicida comercial es de 40 mg L^{-1} (Tabla 4.12).

Al igual que ocurre en el experimento a 500 mg L^{-1} , el último plaguicida en degradarse es el pirimetanil (Figura 4.31). Para ambos ensayos, cuando la mineralización alcanzada es de aproximadamente el 20% únicamente quedan unos pocos miligramos de plaguicidas. Sin embargo para el ensayo a 200 mg L^{-1} se alcanza una mineralización superior a menores t_{30W} . Esto es debido a que, en general, para alcanzar cualquier mineralización es necesario mucho más tiempo de irradiación cuando la concentración de COD inicial es mayor (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Variación de la concentración de los cinco principios activos de los plaguicidas y COD con el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton ($COD_i=200 \text{ mg L}^{-1}$). Se incluye también el H_2O_2 consumido.

| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t_{30w} , min | 0 | 95 | 117 | 127 | 138 | 190 | 267 |
| COD, mg L^{-1} | 199.3 | 158.4 | 121.5 | 105.0 | 88.4 | 67.8 | 49.9 |
| Mineralización, % | 0 | 21 | 39 | 47 | 56 | 66 | 75 |
| H_2O_2 consumido, mg L^{-1} | 0 | 264.0 | 409.2 | 481.8 | 554.4 | 699.6 | 871.2 |
| oxamilo, mg L^{-1} | 51.7 | 0.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| metomilo, mg L^{-1} | 10.5 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| imidacloprid, mg L^{-1} | 14.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| dimetoato, mg L^{-1} | 17.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pirimetanil, mg L^{-1} | 39.6 | 6.7 | 1.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

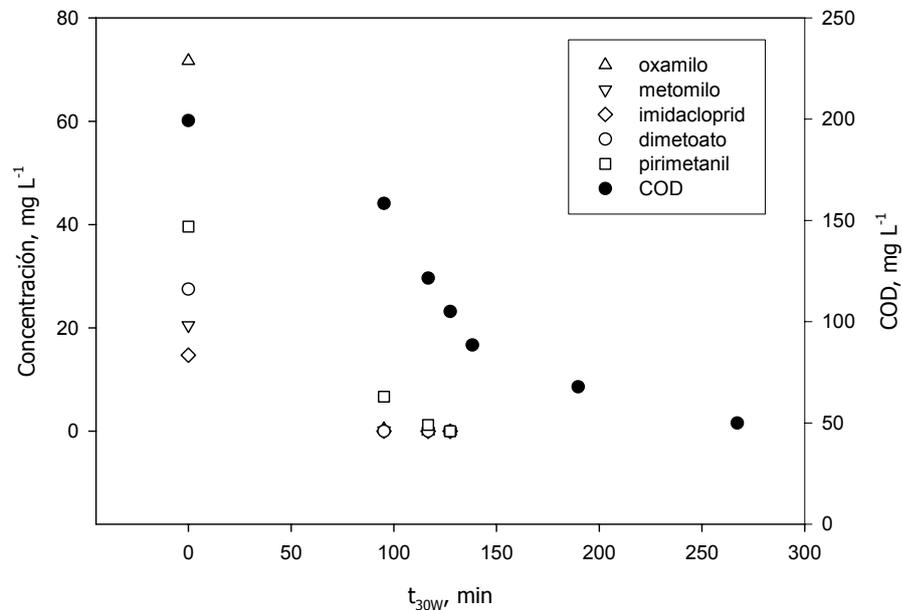


Figura 4.31. Degradación y mineralización de la mezcla de oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil mediante foto-Fenton con una concentración inicial de COD de 200 mg L^{-1} .

4.3.2.2. Determinación del tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton con *P. putida*

i) Concentración de COD inicial de 500 mg L^{-1}

Al igual que en los apartados anteriores, la determinación del tiempo mínimo de tratamiento se ha llevado a cabo añadiendo a las aguas tratadas a diferentes intensidades de foto-Fenton inóculo de *P. putida*. Dicho inóculo aporta un COD adicional de unos 360 mg L^{-1} . En la Figura 4.32 se muestran los consumos de COD respecto al COD inicial en el

ensayo y el crecimiento de biomasa asociado a dicho consumo para los diferentes tiempos de tratamiento biológico en matraz.

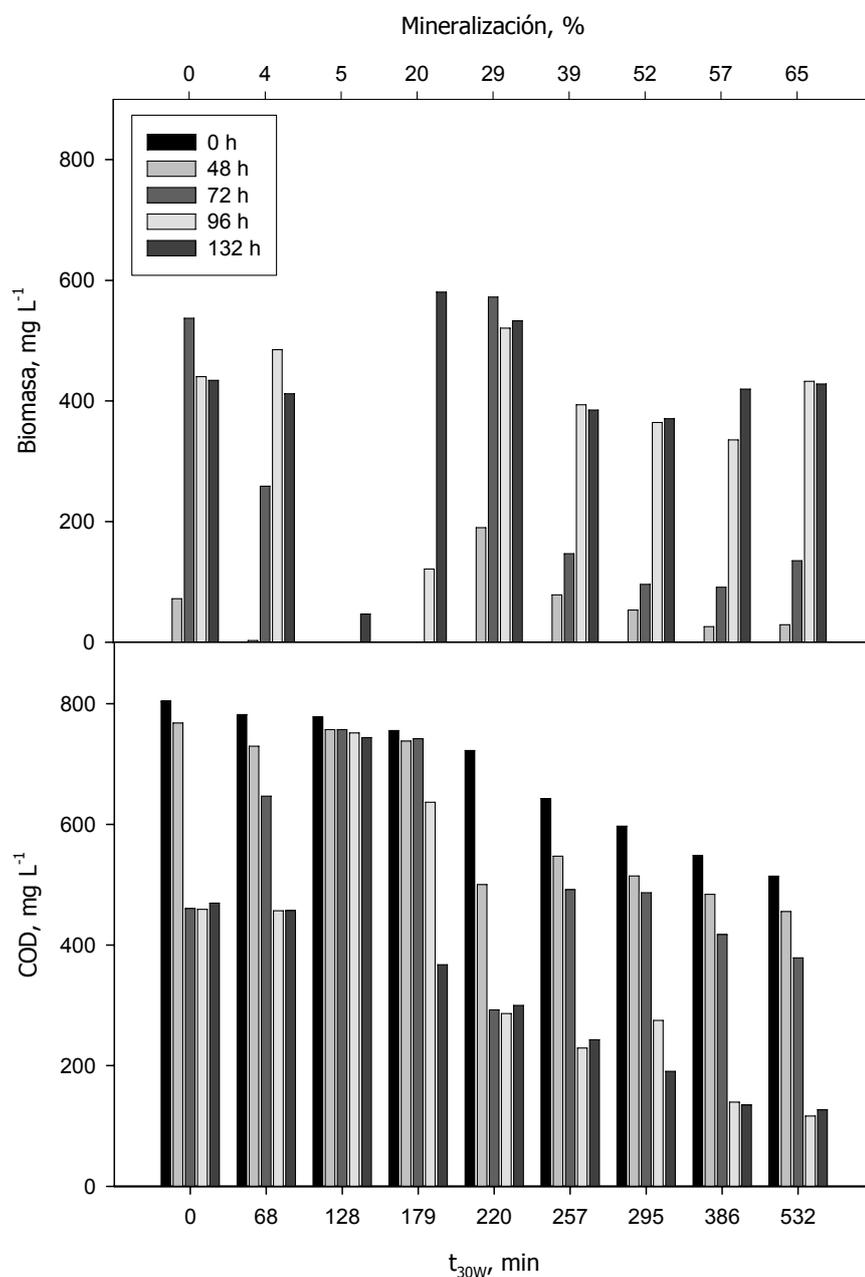


Figura 4.32. Evolución de la concentración de *P. putida* y COD en muestras de la mezcla de cinco plaguicidas (COD inicial = 500 mg L⁻¹) fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Los tiempos que aparecen en la leyenda corresponden al ensayo biológico.

A las 48 h, *P. putida* no es capaz de degradar más de 50 mg L⁻¹ de COD desde t_{30w} = 0 min hasta t_{30w} = 179 min. Sin embargo, a los 220 min (momento en que la mineralización mediante foto-Fenton es del 29%) sí se observa un crecimiento de biomasa apreciable debido al consumo de unos 230 mg L⁻¹ de COD, aunque a partir del 39% de mineralización (t_{30w} = 257 min) la biomasa alcanzada no supera los 100 mg L⁻¹. A las 72 h se observa a t_{30w} = 0 y 68 min un crecimiento considerable, siendo el comportamiento a

otros t_{30W} similar al de las 48 h. A las 96 h el crecimiento es similar a partir del 39% de mineralización y a las 132 h se alcanzan los máximos consumos de COD en todos los matraces.

De estos datos se puede concluir que cuando se ha mineralizado el 5% del COD inicial mediante foto-Fenton ($t_{30W}= 128$ min) se generan sustancias más tóxicas que los plaguicidas que forman la mezcla inicial ($t_{30W}= 0$ min) ya que no se observa crecimiento bacteriano al final del tratamiento biológico. Un efecto similar se observa con *Vibrio fischeri* para una mezcla de metomilo, dimetoato, oxamilo, cimoxanilo y pirimetanil (Oller y cols., 2007a) en el que, a diversos tiempos de tratamiento mediante foto-Fenton, con unos minutos de diferencia, la toxicidad aumenta considerablemente en varias ocasiones y consigue ser menor del 50% cuando se ha mineralizado el 65% del COD.

Una vez pasado este tiempo, a partir del 20% de mineralización, se generan en el medio intermedios de diversa biodegradabilidad que provocan que la adaptación de la bacteria al nuevo medio sea rápida (48 h cuando la mineralización es del 29%), intermedia (96 h para una mineralización de entre el 39 y 65%) o más lenta (132 h cuando se ha mineralizado el 20%).

Cuando los tiempos de fotocatalisis son bajos y aún quedan elevadas concentraciones de plaguicida en el medio ($t_{30W}=0-128$ min) la eficiencia de biodegradación es nula (Figura 4.33) aunque existe crecimiento bacteriano e incluso un consumo de COD muy elevado ($t_{30W}=0$ y 68 min después de 72 h de exposición a *P. putida*) como se ilustra en la Figura 4.32. Esto es debido a que el crecimiento bacteriano se produce a partir de la fuente de carbono biodegradable adicional (medio criogénico bacteriano) y no a los productos resultantes del tratamiento de foto-Fenton. Es necesario que los plaguicidas sean casi degradados por completo para comenzar a apreciar cierta biodegradabilidad de los intermedios generados en el proceso foto-Fenton. Así, cuando se ha mineralizado el 20% de COD mediante foto-Fenton, la eficiencia de biodegradación alcanza únicamente el 15%, siendo la concentración de plaguicidas ya muy baja.

Cabe destacar que, posteriormente, la eficiencia se mantiene entre un 25 y un 30% a $t_{30W}=220-295$ min cuando aún se detecta pirimetanil. Si se compara con los resultados obtenidos para el estudio de la eficiencia de biodegradabilidad en aguas con pirimetanil tratado mediante foto-Fenton (Figura 4.17), se observa que en la mezcla no es necesario que desaparezca el pirimetanil completamente para que los intermedios comiencen a ser biodegradables, puesto que estos provienen de otros plaguicidas además de pirimetanil.

Por tanto, para determinar el tiempo mínimo de tratamiento, no es necesario tener en cuenta la total eliminación del plaguicida.

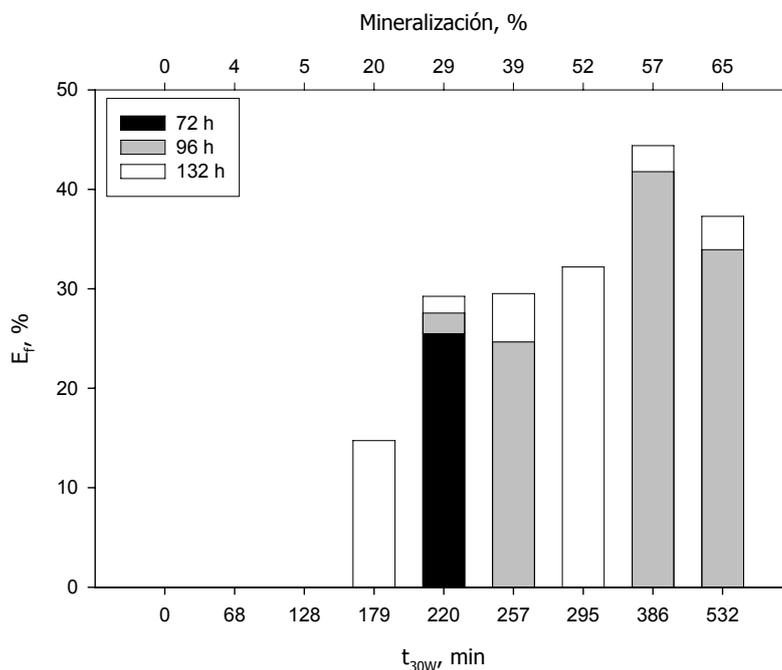


Figura 4.33. Evolución de la eficiencia de biodegradación (E_f) en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton para una mezcla de cinco plaguicidas con un COD inicial de 500 mg L^{-1} .

Sin embargo, una vez que el pirimetanil se degrada por completo la eficiencia de biodegradación alcanza su valor máximo (44%), cuando el 57% del COD ha sido mineralizado mediante foto-Fenton y disminuye ligeramente a $t_{30W}=532$ min debido a la aparición de intermedios menos biodegradables o más tóxicos. Además, si se comparan las eficiencias alcanzadas con la mezcla de 4 plaguicidas (Figura 4.23) con las mostradas en Figura 4.33 se puede observar que se necesitan tiempos mucho mayores para conseguir la misma mineralización mediante foto-Fenton (57% de mineralización en 386 min frente a los 144 necesarios para mineralizar el 59% en el ensayo con 4 plaguicidas (con un COD inicial de 180 mg L^{-1}) obteniéndose además efluentes mucho menos biodegradables como se demuestra con los menores valores de E_f . Por tanto, al aumentar la complejidad de la mezcla y la concentración inicial de COD la intensidad de tratamiento fotocatalítico debe incrementarse para conseguir efluentes capaces de ser biodegradados por *P. putida*.

Oller y cols. (2007a) encontraron biodegradabilidades similares para una mezcla de metomilo, dimetoato, oxamilo, cimoxanilo y pirimetanil tratada mediante foto-Fenton. Así, hallaron necesario mineralizar el 16% para conseguir que el efluente fuese ligeramente biodegradable (70% en 12 días) en un ensayo de Zahn Wellens con fangos activos. A partir de un 29% de mineralización los efluentes se podían considerar biodegradables (con una

biodegradabilidad mayor del 80% en 28 días). Además, las variaciones de toxicidad encontradas (mediante ensayos con la bacteria *Vibrio fischeri*) no se correlacionaban con la biodegradabilidad calculada mediante Zahn Wellens ya que, en general, la biodegradabilidad aumentaba con el tiempo de tratamiento. Por tanto, concluyeron que los test de toxicidad convencionales no son buenos para predecir biodegradabilidad.

En la Figura 4.34 se muestran los valores de la concentración de cada plaguicida antes y después del tratamiento biológico. La eliminación de los plaguicidas no es muy significativa, a excepción del plaguicida metomilo, que cuando se presenta en una alta concentración ($t_{30W}=0$) después del tratamiento biológico se elimina un 35%. Como se ha discutido previamente en el caso del experimento con cuatro plaguicidas, esta eliminación puede deberse a una adsorción del plaguicida en la biomasa bacteriana. En este caso la eliminación de los plaguicidas no implica que la eficiencia de biodegradación sea mayor que cero, ya que para las cuatro primeras muestras el COD al final del tratamiento biológico es mayor que el COD aportado por el efluente del proceso foto-Fenton (Ecuación 4.9) debido a que no se degrada todo el carbono orgánico fácilmente biodegradable.

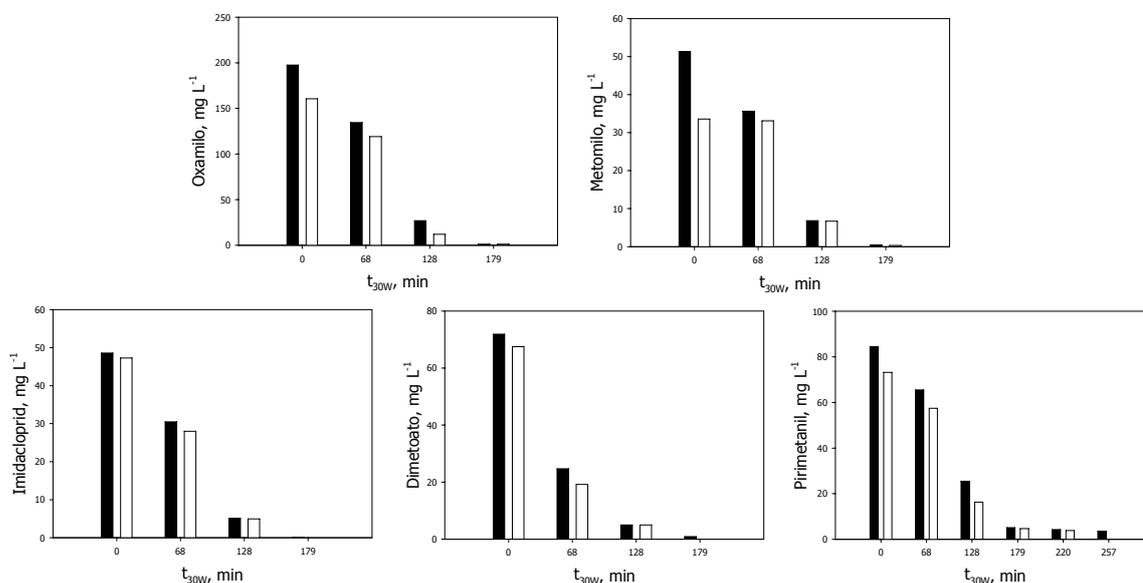


Figura 4.34. Concentraciones de oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil. Las columnas en color negro representan los valores iniciales (antes del tratamiento biológico) y las blancas son las concentraciones después de 132 h de tratamiento biológico.

ii) Concentración de COD inicial de 200 mg L⁻¹

En este experimento (Figura 4.35) se observa un marcado paralelismo, en cuanto a consumo de COD y crecimiento bacteriano, respecto al experimento con una mayor concentración de plaguicidas (COD inicial de 500 mg L⁻¹, Figura 4.32).

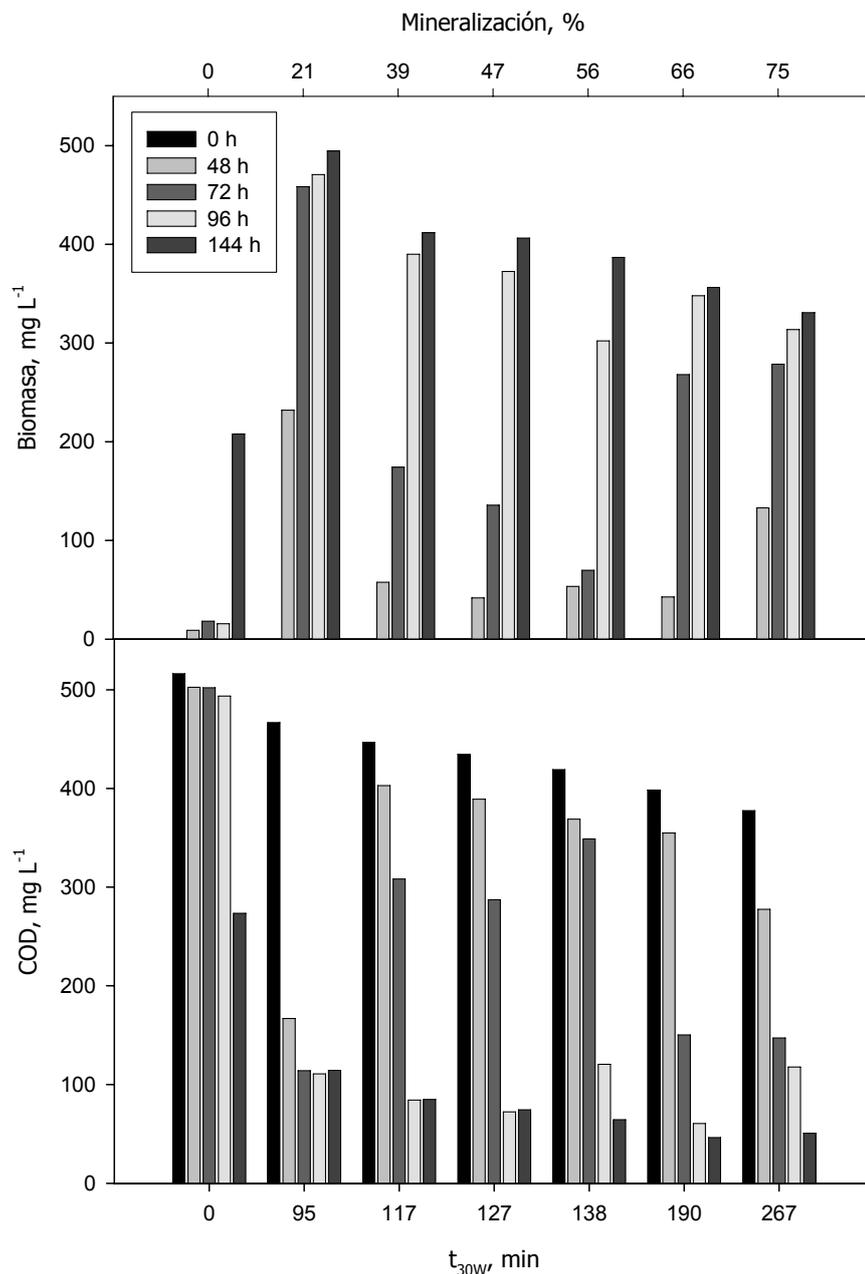


Figura 4.35. Evolución de la concentración de *P. putida* y COD en muestras de la mezcla de cinco plaguicidas (COD inicial = 200 mg L⁻¹) fototratadas en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton. Los tiempos que aparecen en la leyenda corresponden al ensayo biológico.

A las 48 h se produce un fuerte aumento en la concentración de biomasa debido al consumo de unos 300 mg L⁻¹ de COD cuando la mineralización es del 21% (29% para el

experimento con 500 mg L^{-1}). A partir de este momento, *P. putida* consume únicamente entre 50 y 100 mg L^{-1} de COD no observándose crecimiento a $t_{30W}=0$ (Figura 4.35). A las 72 h la tendencia es similar, aunque en general la biomasa bacteriana se incrementa en todos los ensayos, a excepción de $t_{30W} = 0$ (agua sin fototratar). Sin embargo, a las 96 h , al igual que para el experimento con 500 mg L^{-1} , los diferentes t_{30W} presentan un consumo equivalente de COD, estabilizándose a las 144 h . A este tiempo la bacteria también es capaz de crecer en la disolución con plaguicidas sin tratar ($t_{30W}=0$).

La principal diferencia entre ambos experimentos es que el crecimiento bacteriano a $t_{30W}=0$ se produce a las 72 h y a las 144 h para el ensayo de 500 y 200 mg L^{-1} , respectivamente. Esto puede ser debido a que en el ensayo de mayor concentración el crecimiento se vea favorecido por la presencia de una concentración COD biodegradable más elevada, proveniente de los excipientes presentes en los plaguicidas comerciales.

Nuevamente se encuentra una gran similitud en los experimentos ensayados a las dos concentraciones en cuanto a eficiencias de biodegradación (Figuras 4.33 y 4.36) ya que por debajo del 21% de mineralización mediante foto-Fenton el efluente no es biodegradable.

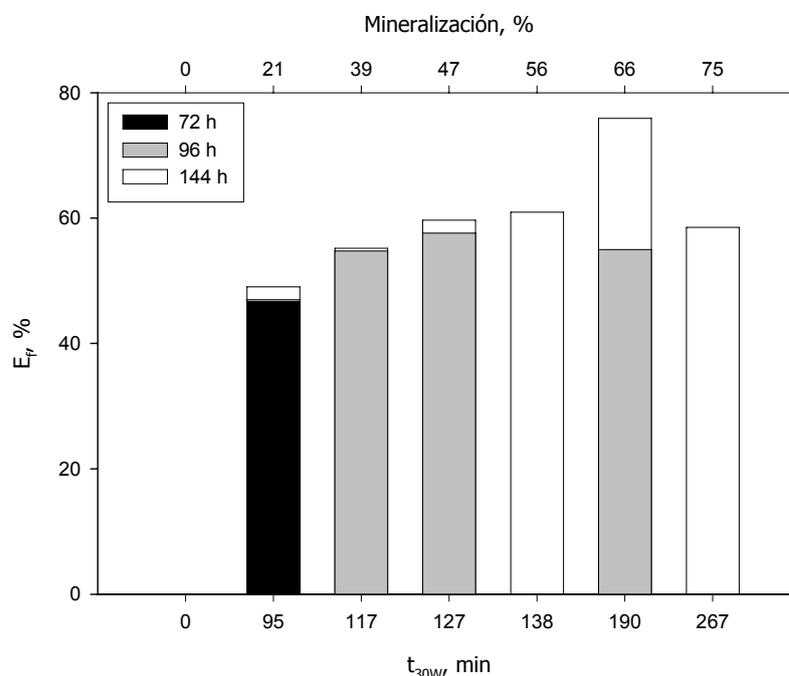


Figura 4.36. Evolución de la eficiencia de biodegradación (E_f) en función de la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton para una mezcla de cinco plaguicidas con un COD inicial de 200 mg L^{-1} .

A $t_{30W} = 95 \text{ min}$, cuando la concentración de plaguicidas en el medio es muy baja, los intermedios provenientes del tratamiento fotocatalítico comienzan a ser degradados por

P. putida (E_f es tres veces mayor en el ensayo a 200 mg L^{-1} que en el de 500 mg L^{-1}). A partir de este valor, la eficiencia de biodegradación aumenta al incrementarse la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton hasta alcanzar su valor máximo ($E_f=76\%$) cuando se ha mineralizado el 66% del COD inicial, coincidiendo con la total desaparición de los plaguicidas. Finalmente, cuando se ha mineralizado un 75% se produce un leve descenso en E_f posiblemente debido a la generación de algún intermedio más tóxico o menos biodegradable.

En la Figura 4.37 se presentan las concentraciones de cada plaguicida antes y después del tratamiento biológico. En este caso la eliminación de los plaguicidas es menor que para el ensayo con 500 mg L^{-1} de COD inicial, e igualmente en este experimento el descenso en la concentración del plaguicida metomilo es el más acusado (aunque no supera el 15%) a $t_{30W}=0$. Esto puede deberse a que la concentración de biomasa alcanzada a este tiempo es mucho menor que en el experimento a 500 mg L^{-1} (con una diferencia de más de 200 mg L^{-1}) y por tanto, la adsorción del plaguicida sea más reducida.

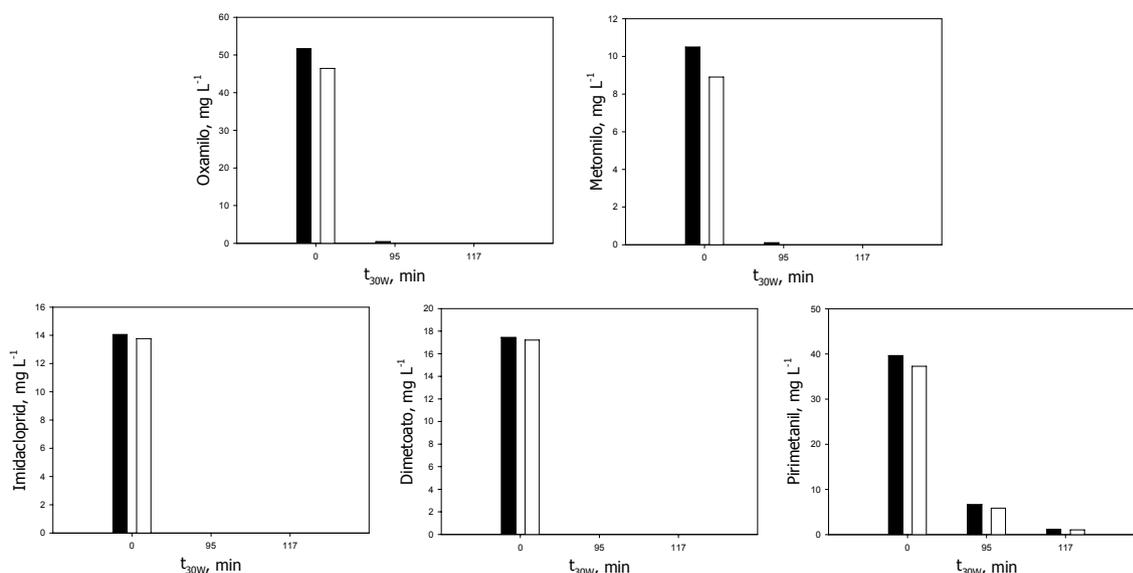


Figura 4.37. Concentraciones de oxamilo, metomilo, imidacloprid, dimetoato y pirimetanil. Las columnas en color negro representan los valores iniciales (antes del tratamiento biológico) y las blancas son las concentraciones después de 144 h de tratamiento biológico.

Aunque la tendencia de E_f frente al avance de reacción fotocatalítica es similar para ambas concentraciones de COD inicial, la selección de la intensidad o tiempo mínimo de tratamiento varía significativamente. Para el ensayo a 500 mg L^{-1} (Figura 4.33) el tiempo mínimo de tratamiento sería aquel en que desaparece el pirimetanil (mineralización = 57%) ya que si se escoge el momento en el que la biodegradabilidad comienza a ser

apreciable (mineralización=20%) y persistiendo en el agua 5.1 mg L^{-1} de pirimetanil sin degradar, E_f podría ser demasiado baja (15%) para asegurar la posterior biodegradación del efluente fotocatalítico.

Para el ensayo a 200 mg L^{-1} la selección del tiempo mínimo de tratamiento se realiza en base a las eficiencias de mineralización, debido a que estas son considerablemente mayores que las obtenidas a 500 mg L^{-1} . Cuando se ha mineralizado el 21% del COD inicial la eficiencia de biodegradación es casi del 50% aunque queden en el medio 6.5 mg L^{-1} de pirimetanil. Para que desaparezca el plaguicida sería necesario realizar el proceso foto-Fenton hasta mineralizar un 47% del COD, logrando solamente un aumento en la eficiencia del 10% y necesitando 271.8 mg L^{-1} más de peróxido de hidrógeno (casi el doble que para el 21% de mineralización) con el consiguiente encarecimiento del proceso. Además, esta concentración de plaguicida no afecta considerablemente al crecimiento bacteriano ya que las eficiencias de biodegradación son muy similares, lo que no ocurre en el ensayo a 500 mg L^{-1} , en el que la diferencia en E_f es del 20% si se compara la muestra en la que aún quedan 4.2 mg L^{-1} de pirimetanil y en la que todos los plaguicidas se han degradado por completo. Por tanto, únicamente si fuera necesaria la eliminación completa del plaguicida (por cuestiones de limitación de vertido u otras consideraciones) debería llevarse a cabo la mineralización hasta el 47%. Así, los tiempos mínimos de tratamiento de foto-Fenton para la mezcla con concentración 500 y 200 mg L^{-1} de COD son aquellos en que se mineraliza un 57% y un 21%, respectivamente.

Otros autores (Oller y cols., 2007a) también encontraron (utilizando el procedimiento de Zahn Wellens, de 28 días de duración) que el mejor momento para acoplar el tratamiento de foto-Fenton y biológico era cuando aún quedaban pequeñas concentraciones de pesticidas en el efluente (2.4 mg L^{-1} de cimoxanilo, 3.4 mg L^{-1} de metomilo y 6.2 mg L^{-1} de pirimetanil) cuando la mineralización de una mezcla inicial de cinco plaguicidas era del 30%.

4.3.2.3. Acoplamiento de foto-Fenton y oxidación empleando fangos activos

i) Concentración de COD inicial de 500 mg L^{-1}

Se lleva a cabo la mineralización de la mezcla de cinco plaguicidas con foto-Fenton hasta un COD de 222.8 mg L^{-1} (mineralización = 55%) para lo que se emplea un $t_{30w} = 236 \text{ min}$. Si se observa la Tabla 4.11, cabría esperar que se necesitaran más de 300 min para conseguir la mineralización alcanzada. Esta diferencia de tiempos se debe a la distinta

metodología empleada para la adición de peróxido de hidrógeno. En los experimentos descritos en el apartado 4.3.2.1, el peróxido se añade en pequeñas cantidades para que sea limitante de la reacción, de este modo, cuando se consume el peróxido no continúa la reacción de oxidación, por lo que las muestras tomadas son estables. En este caso, el peróxido de hidrógeno necesario para alcanzar el 55% de mineralización se añade sin que este llegue a ser limitante hasta el final del proceso. Consecuentemente, la diferencia en los tratamientos radica en que en el primer caso hay una mayor limitación por peróxido de hidrógeno lo que conlleva un tiempo de tratamiento superior. El momento seleccionado para verter el agua pretratada con foto-Fenton al biorreactor conteniendo fangos activos corresponde al determinado mediante la biodegradación con *P. putida* que ocurriría entre el 52 y 57% de mineralización.

Análogamente al estudio preliminar realizado con la mezcla de cuatro plaguicidas, se lleva a cabo el tratamiento biológico con fangos activos con un reactor de 6 L de volumen de trabajo empleando fangos suministrados por la EDAR "El Bobar" de Almería. Se deja decantar y se retira el sobrenadante que se reemplaza por un volumen igual de efluente del proceso foto-Fenton. Sin embargo, en este caso los tiempos necesarios para que el COD se consuma por completo son aproximadamente de 200 h (Figura 4.38), con lo que el efluente no podrá ser tratado en una depuradora convencional ya que los tiempos de residencia en una EDAR varían entre 4 y 24 h.

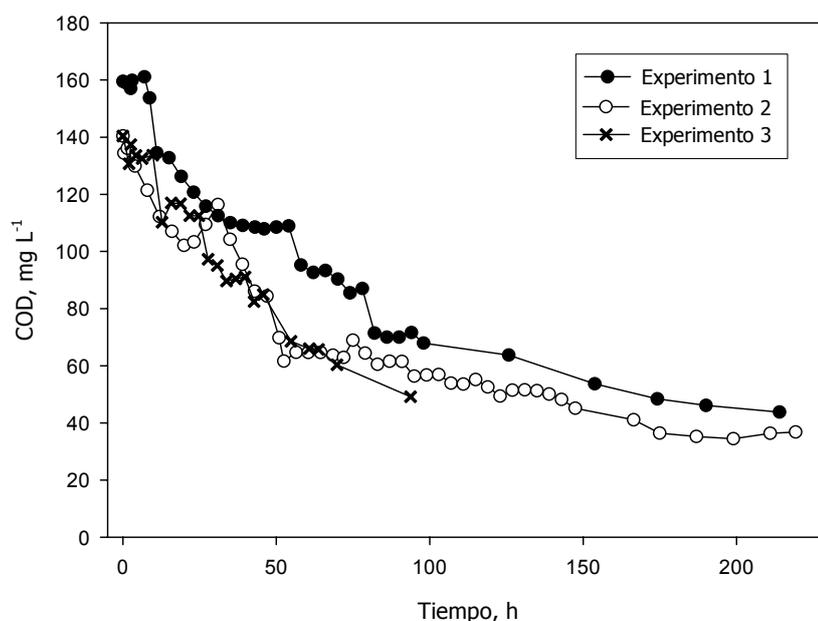


Figura 4.38. Evolución del COD en los tres experimentos con fangos activos sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con una concentración inicial de 500 mg L⁻¹.

Este ensayo se repite tres veces (Figura 4.38) con distintos fangos recogidos en la misma depuradora pero espaciados en el tiempo para descartar que la degradación no se esté produciendo por falta de actividad del fango. En cada ensayo el volumen de sobrenadante retirado depende de la decantación del fango empleado, por lo que en el primer experimento se retiran 4 L y en los dos siguientes 3.5 L. En los dos primeros ensayos son necesarias alrededor de 200 h para que E_f alcance un valor de 91 y 95% y en el tercero se consumen casi 100 h en alcanzar una E_f del 86%, siendo la concentración de biomasa inicial en cada experimento de 0.97, 0.84 y 1.4 g L⁻¹.

En el ensayo con cuatro plaguicidas prácticamente todo el COD inicial es consumido en las primeras 5 h de tratamiento biológico frente a las 200 h necesarias para los experimentos con cinco plaguicidas. La diferencia entre los dos efluentes radica en que en los ensayos con cuatro plaguicidas, a partir del 29% de mineralización, la eficiencia de biodegradación aumentaba linealmente con la intensidad de tratamiento fotocatalítico (Figura 4.23) hasta lograr casi el 100%. Sin embargo, la biodegradabilidad de la mezcla de intermedios proveniente del tratamiento de los cinco plaguicidas es como máximo un 44% (Figura 4.33), lo que provoca que la biodegradación de los intermedios mediante fangos activos sea más lenta a pesar de comenzar con concentraciones de SVS mayores.

Con el objetivo de mejorar la biodegradación del efluente del fototratamiento, simulando condiciones más reales, se añade desde el principio una fuente de carbono biodegradable de modo que el proceso se asemeje al de una EDAR. Para ello, el efluente de foto-Fenton se mezcla con un agua residual simulada, se añaden las sales inorgánicas y el medio mineral mostrado en la Tabla 3.1 y se ajusta el pH a 7. El agua residual simulada empleada tiene la misma composición que la utilizada en el experimento blanco con *P. putida* aportando una concentración de COD de 360 mg L⁻¹. Este COD está algo por encima de los valores de concentración de carbono orgánico (entre 80 y 290 mg L⁻¹) del agua que llega a una depuradora convencional de aguas residuales urbanas (Metcalf y Eddy, 1991). Sin embargo, estas concentraciones pueden hacerse diez veces mayores cuando se trata del lixiviado de vertederos urbanos (Ganigué y cols., 2007) incluso alcanzando valores cercanos a 4000 mg L⁻¹ (Ziyang y cols., 2008). En estos experimentos no se realiza control de pH ni temperatura, manteniéndose el pH entre 7 y 8 y siendo la temperatura promedio de 21°C.

Una vez que los fangos han decantado, 4.5 L del agua residual preparada (efluente del tratamiento mediante foto-Fenton y agua residual simulada) reemplazan al sobrenadante, con lo que el COD inicial es de 417 mg L⁻¹ y se reduce hasta unos 59 mg L⁻¹

en 45 h (Figura 4.39). Se continúa 70 h más consiguiendo únicamente una reducción adicional de 5 mg L^{-1} con lo que la eficiencia final es del 89%.

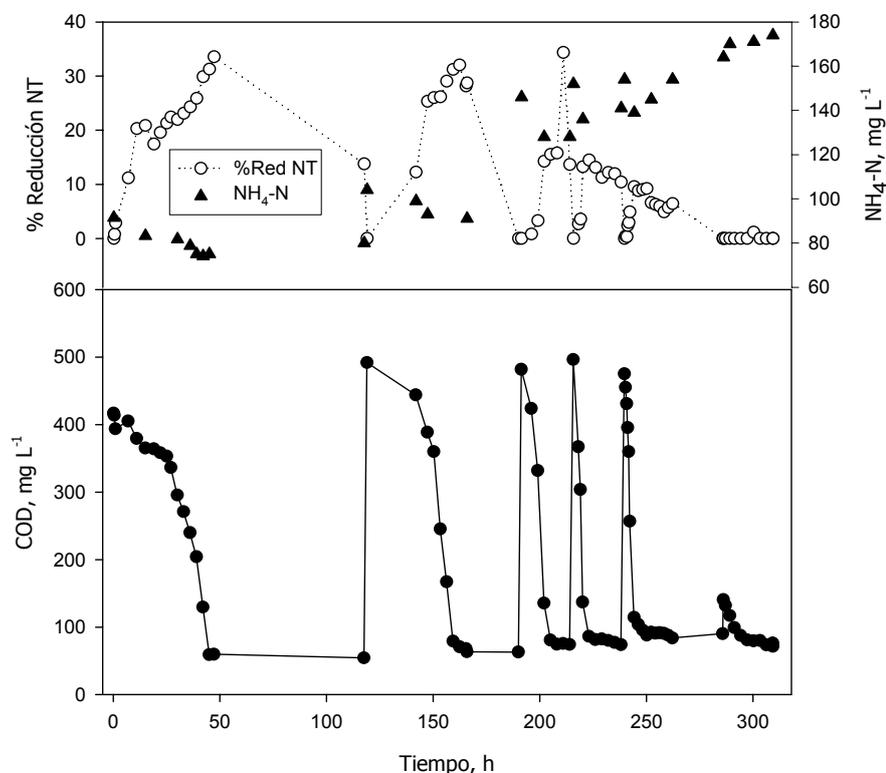


Figura 4.39. Evolución del COD (●) en los seis ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con un COD inicial de 500 mg L^{-1} . En la gráfica superior se representa el porcentaje de reducción de nitrógeno total (▲) y el nitrógeno en forma de amonio frente al tiempo de tratamiento biológico.

Posteriormente, se vuelve a decantar el fango, se retira el sobrenadante (5 L) y se añade la misma disolución acuosa a tratar partiendo en este caso de un COD próximo a 500 mg L^{-1} que se consume en 40 h quedando un COD residual de 63 mg L^{-1} ($E_f = 85\%$). Se repite la misma operación pero en este caso el consumo del COD inicial se produce en tan sólo 14 h y en el cuarto experimento en 7.5 h quedando en ambos casos un COD final de alrededor de 74 mg L^{-1} y lográndose una eficiencia de biodegradación del 81%. En el quinto ciclo, la biodegradación se produce en tan sólo 4.5 h con un 76% de eficiencia (Figura 4.39).

Como se puede observar en la Figura 4.39, el tratamiento es cada vez más rápido debido a la adaptación de la biomasa al efluente de foto-Fenton, que sin embargo viene acompañado de una ligera pérdida de eficiencia. Esta pérdida de eficiencia es posiblemente debida a la pérdida de biomasa entre ciclos por la realización de la toma de muestra y la adhesión de la biomasa en las sondas y paredes del reactor ya que al comienzo del primer

ciclo SVS=1.40 g L⁻¹ y disminuye hasta 1.03 g L⁻¹ en este último. Aunque también puede ser debido a que se va acumulando en el biorreactor algunos metabolitos difícilmente biodegradables. Esto, en todo caso, se solucionaría haciendo más largo alguno de los ciclos con el objetivo de degradar esos metabolitos algo biorrecalcitrantes.

Si se tiene en cuenta que en el proceso fotocatalítico se mineraliza el 55% del COD inicial, y en el proceso biológico la eficiencia en el primer ciclo es del 89%, la eficiencia global del tratamiento acoplado es del 95%. Otros autores (Oller y cols., 2007a) alcanzan eficiencias similares eliminando el 92% del COD inicial con fangos activos inmovilizados para la degradación de un efluente del tratamiento mediante foto-Fenton de una mezcla de los plaguicidas metomilo, dimetoato, oxamilo, cimoxanilo y pirimetanil (COD=113 mg L⁻¹) y glucosa (COD=142 mg L⁻¹) como fuente de carbono adicional necesitando cinco días de tratamiento.

Igualmente la DQO se va reduciendo en todos los ciclos paralela al consumo de COD (Figura 4.40) En los cinco ciclos en los que se emplea el efluente del tratamiento con foto-Fenton junto con el agua residual simulada, el valor inicial de DQO es de unos 1200 mg L⁻¹, quedando al final de cada uno una DQO residual de 95 mg L⁻¹.

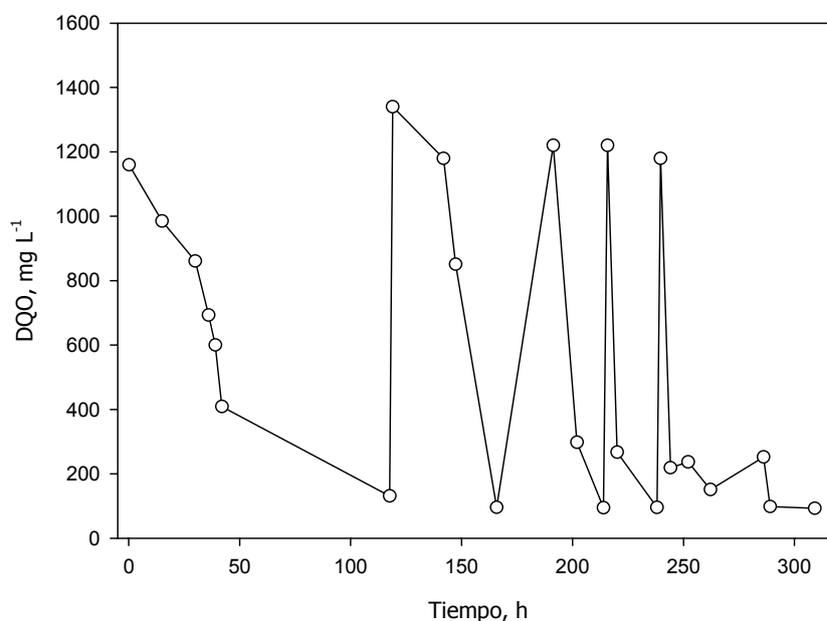


Figura 4.40. Variación de la DQO en los seis ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con un COD inicial de 500 mg L⁻¹.

Como se ilustra en la Figura 4.41, existe una correlación entre la concentración de carbono inorgánico presente y el pH. Cuando los microorganismos respiran generan dióxido de carbono, que se disuelve en el agua a tratar formando ácido carbónico y bicarbonatos, y por tanto, disminuye el pH del agua. Para cada ciclo se observa este descenso en el valor de pH que viene acompañado del consecuente aumento en la concentración de carbono inorgánico disuelto, CID.

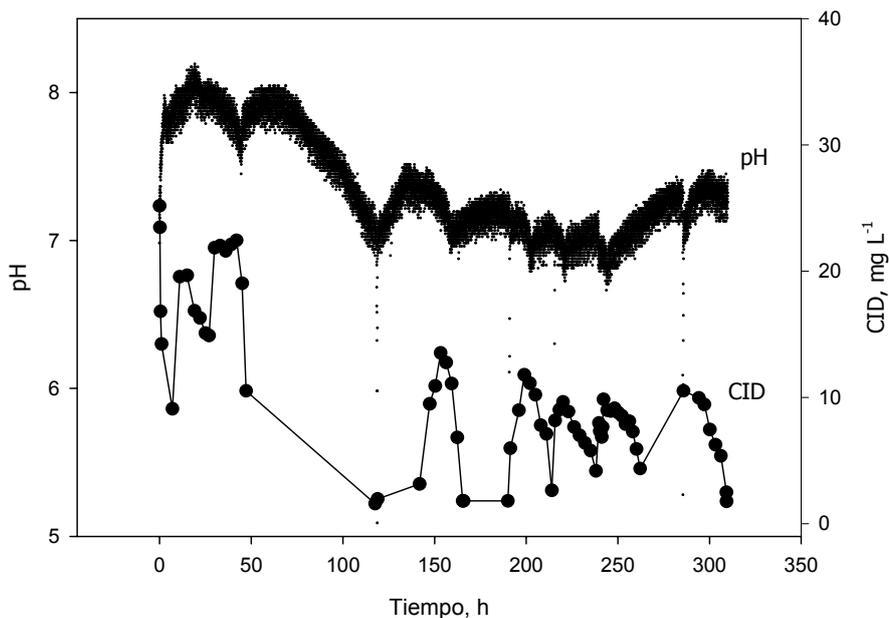


Figura 4.41. Evolución del pH y el carbono inorgánico en los ciclos SBR sobre el efluente del tratamiento con foto-Fenton de una mezcla de 5 plaguicidas con una concentración inicial de 500 mg L⁻¹.

Los datos mostrados indican que el fango se ha adaptado a la biodegradación del efluente del tratamiento mediante foto-Fenton ya que el COD se elimina 10 veces más rápido en el quinto ciclo secuencial que en el primero. Como se puede observar en la Tabla 4.13, la adaptación gradual se evidencia también en la velocidad máxima de degradación de COD (calculadas en la zona lineal de consumo de COD) que se incrementa desde un valor inicial de 10.6 mg L⁻¹ h⁻¹ hasta superar los 80 mg L⁻¹ h⁻¹. Asimismo, la velocidad de consumo de DQO es cada vez mayor, incrementándose desde 63 hasta 219 mg L⁻¹ h⁻¹ en el quinto ciclo.

Uno de los parámetros de diseño más importantes cuando la biodegradación se lleva a cabo en modo secuencial discontinuo es el tiempo de retención hidráulico (TRH) que se calcula mediante la Ecuación 4.15:

$$TRH = \frac{V_T}{Q} \quad \text{Ec. 4.15.}$$

donde V_T es el volumen total en L y Q es el caudal diario en $L d^{-1}$.

El TRH en ambos experimentos es alto en los primeros ciclos porque se mantiene la reacción un tiempo mayor esperando a que el COD residual pueda ser consumido por el fango activo (Tabla 4.13). En los ciclos tercero y cuarto disminuye hasta 1.25 d, siendo este valor mayor que las 6-14 h de TRH empleado en una depuradora convencional para el tratamiento de un agua municipal mediante SBR, aunque para aguas residuales industriales este valor puede variar (Mikkelsen, 1995). Asimismo, para aguas urbanas la duración de un ciclo de tratamiento está en torno a 4 h y varía entre 4 y 24 h para un agua industrial. Una vez que el fango está completamente adaptado, el quinto ciclo tiene un TRH mayor (2.5 d) porque se continuó la biodegradación durante 24 h para asegurar que el fango no biodegradaba el COD residual.

Tabla 4.13. TRH y velocidades máximas de consumo de COD y oxígeno para los cinco ciclos discontinuos en modo secuencial de adaptación al efluente del tratamiento con foto-Fenton de un agua contaminada con cinco plaguicidas con una concentración inicial de COD de 500 mg L^{-1} .

| Ciclo | TRH, d | Velocidad máxima de consumo de COD ($r_{\text{COD, max}}$), $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | Velocidad máxima de consumo de oxígeno ($r_{\text{O}_2, \text{max}}$), mM h^{-1} |
|-------|--------|---|---|
| 1 | 6.3 | 10.6 ($r^2=0.99$) | 1.02 |
| 2 | 3.6 | 21.2 ($r^2=0.98$) | 0.53 |
| 3 | 1.25 | 48.1 ($r^2=0.96$) | 1.62 |
| 4 | 1.25 | 76.9 ($r^2=0.96$) | 2.96 |
| 5 | 2.5 | 82.5 ($r^2=0.98$) | 2.92 |

Cabe destacar que en el cuarto ciclo la velocidad máxima de consumo de carbono es de $76.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ incluso cuando el TRH es de únicamente 1.25 d. Por tanto, la adaptación se logra en este cuarto ciclo, ya que en el siguiente ciclo la velocidad máxima de consumo de carbono se incrementa en menos de $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Asimismo, la adaptación se pone de manifiesto comparando las velocidades máximas de consumo de oxígeno (Tabla 4.13). En los dos primeros ciclos $r_{\text{O}_2, \text{max}}$ es baja ya que el consumo de COD se produce más lentamente aumentando en el tercer ciclo, en el que se produce un incremento significativo de la velocidad máxima de consumo de carbono, y manteniéndose a partir del cuarto ciclo en un valor de aproximadamente 3 mM h^{-1} . Estos valores son superiores a los encontrados para el biotratamiento con fangos

activos (a una concentración de 1.30 g L^{-1} de sólidos en suspensión) de un agua contaminada con los éteres clorados bis (2-cloroetil-éter) y bis (2-cloroetoxi-metano) tratadas con Fenton catalizado en superficie (Mutuc y cols., 2008) en los que la velocidad máxima de consumo de oxígeno es de 0.6 mM h^{-1} , aunque son del orden de los hallados para la biodegradación de fenol mediante fangos activos adaptados (Contreras y cols., 2008) con una velocidad máxima de consumo de oxígeno de 4 mM h^{-1} .

Con los datos presentados se muestra la capacidad de un fango de depuradora de biodegradar el efluente del proceso foto-Fenton con una alta eficiencia cuando existen otras fuentes de carbono adicionales debido a la adaptación de éste a los diversos intermedios presentes en el medio. Por tanto, si se compara con el ensayo para cuatro plaguicidas (en el que la concentración de biomasa es menor) cabe esperar que efluentes provenientes del tratamiento de aguas contaminadas que sean menos biodegradables necesiten ser combinados con aguas residuales urbanas (que contienen fuentes de carbono fácilmente biodegradables) para que la biodegradación de los intermedios sea efectiva. La combinación del efluente del tratamiento con un POA y un agua urbana para realizar la posterior degradación biológica ya ha sido realizada por otros autores. Así, Lin y Chan (2000) combinaron un agua tratada con electro-Fenton con 295 mg L^{-1} de DQO con un agua residual urbana para eliminar el 90% de la DQO inicial.

Para comprobar la biodegradación del efluente del tratamiento por foto-Fenton (una vez que los fangos están adaptados), se realiza un sexto ciclo en el que no se adiciona la fuente de carbono biodegradable proveniente del agua residual simulada. Esta vez, los fangos decantan peor y sólo se retiran 3 L de sobrenadante, siendo el COD inicial de 140.7 mg L^{-1} (Figura 4.39). En este experimento, con un TRH de 1.9 d, son únicamente necesarias 11 h para consumir el COD frente a las más de 200 h empleadas en los ensayos sin adaptar. La velocidad máxima de consumo de COD ($8.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $r^2=0.99$) es menor que para los cinco ciclos anteriores porque no está presente la fuente de carbono adicional, e igualmente, disminuye la velocidad máxima de consumo de oxígeno (0.48 mM h^{-1}). También en este ciclo la DQO se reduce hasta 92.9 mg L^{-1} (Figura 4.40) siendo la velocidad de consumo de DQO de $51.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ del orden de la calculada por otros autores, que determinaron que la velocidad de degradación de un fango ($\text{SVS}>5 \text{ g L}^{-1}$) adaptado durante 60 días al efluente del tratamiento foto-Fenton de agua proveniente de la industria textil era de $44.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fongsatitkul y cols., 2004) o de $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en un fango con una concentración de SVS de 3 g L^{-1} , degradando un agua con una DQO inicial de 430 mg L^{-1} con acetato y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno (Bernat y cols., 2008).

La eficiencia de biodegradación obtenida es del 82%, debido a que parte del carbono no es biodegradable (un 11% tampoco se degrada en el primer ciclo) y la debilitación de la biomasa procedente del fango que se evidencia en una peor decantación y un decaimiento en el porcentaje de reducción del nitrógeno total en el que el nitrógeno en forma de amonio deja de nitrificarse (Figura 4.39).

A su vez se realizó un ensayo con un fango activo con una concentración inicial de sólidos volátiles en suspensión de 1.21 g L^{-1} proveniente de la misma EDAR, en el que la única fuente de carbono proviene del agua residual simulada (Figura 4.42). Para este experimento se retiró el sobrenadante (5 L) y se adicionó el mismo volumen de agua residual simulada de modo que el COD inicial sea similar al experimento blanco de *P. putida*, en este caso de unos 370 mg L^{-1} .

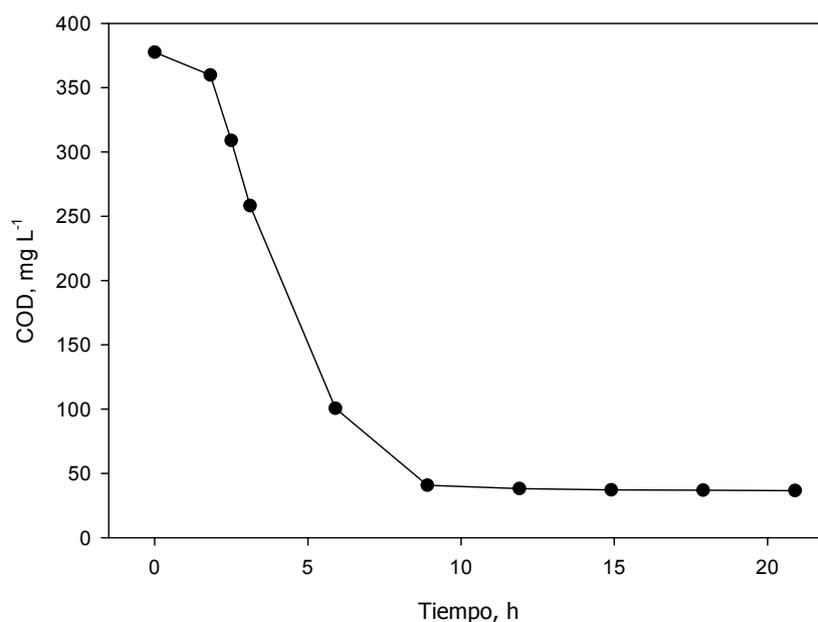


Figura 4.42. Evolución del COD en el ensayo con agua residual simulada en un reactor tipo tanque agitado de 6 L.

Para este ensayo, el COD se degrada en 9 h, quedando 36.6 mg L^{-1} que el fango no degrada y que se corresponde con el COD metabólico común en sistemas de fangos activos. En este caso, la velocidad máxima de consumo de oxígeno es de 7.7 mM h^{-1} , mayor que para los ciclos con mezcla de efluente de foto-Fenton y agua residual simulada. Asimismo, al igual que en los ensayos con *P. putida*, la diferencia en la velocidad máxima de consumo de oxígeno pone de manifiesto un decrecimiento en la actividad metabólica de los microorganismos, causada por la presencia de intermedios, en los experimentos donde se añade efluente del tratamiento mediante foto-Fenton.

Sin embargo, la velocidad máxima de consumo de COD está en torno a la calculada para el tercer y cuarto ensayo ($62.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $r^2=0.99$). Esto es así porque aunque la proporción de carbono biodegradable es superior en el ensayo con agua residual simulada como única fuente de carbono, en el cuarto ciclo en discontinuo el fango está adaptado.

ii) Concentración de COD inicial de 200 mg L^{-1}

El acoplamiento se realiza nuevamente, partiendo de un agua contaminada con la mezcla de cinco plaguicidas con una concentración inicial de COD de 198.3 mg L^{-1} . En este caso, el momento seleccionado para verter el agua pretratada con foto-Fenton al biorreactor conteniendo fangos activos corresponde al determinado mediante la biodegradación con *P. putida* que ocurriría entre el 21 y el 39 % de mineralización.

Por tanto, se lleva a cabo un ensayo de foto-Fenton sobre 50 L de esta agua consiguiendo una mineralización del 33% del COD y detectándose únicamente 1.4 mg L^{-1} de pirimetanil para lo que se consumen aproximadamente 360 mg L^{-1} de peróxido de hidrógeno. De este modo, el acoplamiento se realiza cuando prácticamente los plaguicidas han sido fotodegradados y la eficiencia de biodegradación estimada con *P. putida* sería del 50% (Figura 4.36). Igual que en el apartado anterior, no se realiza control de pH ni temperatura siendo la temperatura promedio de 23.7°C y los valores de pH entre 6.5 y 7.5.

De nuevo, el efluente de foto-Fenton (con un COD inicial de 132.5 mg L^{-1}) se mezcla con el agua residual simulada, en concordancia con la biodegradación que se produciría en una EDAR y verificar la biodegradabilidad real del agua pretratada. Esta disolución acuosa (2.6 L) reemplaza el sobrenadante una vez que los fangos activos han decantado en el tanque agitado de 6 L. Para este primer ciclo, el COD inicial es de 207.2 mg L^{-1} y se reduce en 23 h hasta 32.7 mg L^{-1} consiguiéndose una eficiencia de biodegradación del 98% (Figura 4.43). Si además se tiene en cuenta que en el proceso fotocatalítico se mineraliza el 33% del COD inicial la eficiencia global del tratamiento acoplado es del 99%.

La mayor eficiencia de biodegradación y el menor tiempo para el consumo del carbono orgánico presente respecto al ensayo con 500 mg L^{-1} , pone de manifiesto la mayor biodegradabilidad de este efluente. Este aumento de biodegradabilidad se puede predecir

mediante el ensayo con *P. putida*, ya que se obtiene una mayor E_f para la mezcla de plaguicidas a 200 mg L^{-1} con igual grado de mineralización que para ésta a 500 mg L^{-1} (Figura 4.36).

El ensayo se repite nuevamente con el mismo volumen de disolución acuosa y con una eficiencia del 93% (Figura 4.43). Esta pérdida de actividad está asociada a la disminución de concentración de biomasa por adhesión a las paredes y sondas y a la toma de muestra. De hecho, la concentración inicial de SVS es de 2.54 g L^{-1} y después del primer y segundo ciclo se reduce hasta 2.23 y 1.91 g L^{-1} .

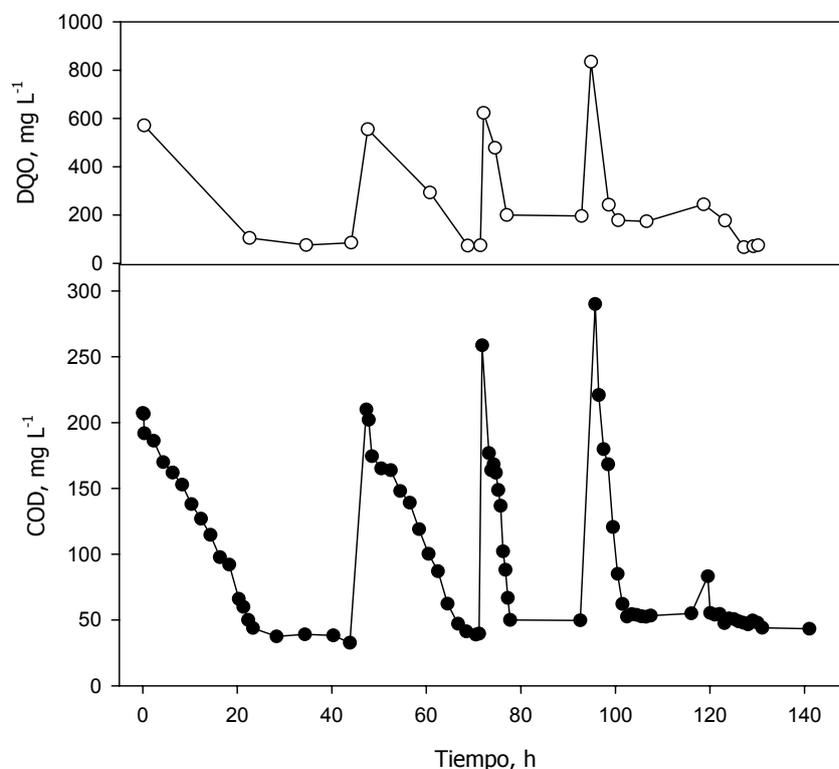


Figura 4.43. Evolución del COD (●) en los cinco ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con $\text{COD} = 200 \text{ mg L}^{-1}$. En la gráfica superior se representa la variación de DQO (○) frente al tiempo.

Al igual que para el ensayo con 500 mg L^{-1} a partir del tercer ciclo el tiempo para el consumo de COD disminuye drásticamente. En los ciclos tercero y cuarto la decantación es más rápida pudiéndose reemplazar 3.1 y 3.6 L de medio, respectivamente, por lo que la concentración de COD inicial es mayor que en los anteriores (Figura 4.43). La adaptación a la mezcla de efluente de foto-Fenton y el agua residual simulada es completa, consumiéndose en menos de 5 h con una E_f de 89 y 82% habiendo disminuido los SVS

hasta 1.66 g L^{-1} . En todos los ciclos el consumo de COD es paralelo a la variación de la DQO en cada ciclo y al final del ensayo la DQO disminuye hasta 66.4 mg L^{-1} (Figura 4.43).

En la Tabla 4.14 se presentan las velocidades máximas de consumo de COD y oxígeno para los cuatro ciclos. La adaptación se pone de nuevo de manifiesto en los aumentos en las velocidades máximas de consumo de COD ($r_{\text{COD,max}}$) y de oxígeno ($r_{\text{O}_2,\text{max}}$) en los dos últimos ensayos.

Tabla 4.14. TRH y velocidades máximas de consumo de COD y oxígeno para los cinco ciclos discontinuos en modo secuencial de adaptación al efluente del tratamiento con foto-Fenton de un agua contaminada con cinco plaguicidas con una concentración inicial de COD de 200 mg L^{-1} .

| Ciclo | TRH, d | Velocidad máxima de consumo de COD ($r_{\text{COD,max}}$), $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | Velocidad máxima de consumo de oxígeno ($r_{\text{O}_2,\text{max}}$), mM h^{-1} |
|-------|--------|--|--|
| 1 | 4.5 | 6.6 ($r^2=0.99$) | 1.5 |
| 2 | 2.4 | 7.7 ($r^2=0.98$) | 1.5 |
| 3 | 2 | 35.2 ($r^2=0.99$) | 3.8 |
| 4 | 1.7 | 40.7 ($r^2=0.99$) | 4.5 |

El consumo de COD sigue la misma tendencia que la observada en el experimento con 500 mg L^{-1} , ya que una vez realizados los dos primeros ciclos la velocidad máxima de consumo de COD aumenta drásticamente. Sin embargo, cuando concluye la adaptación, la velocidad de consumo de carbono es mayor en el experimento de más concentración (Tablas 4.13 y 4.14), incluso habiendo una diferencia en ambos de 0.63 g L^{-1} de biomasa. Esto puede deberse a que existe una mayor proporción de agua residual simulada en el experimento a 500 mg L^{-1} , en el que el volumen de influente es de 5 L frente a los 3.6 L de disolución que se emplean en el de 200 mg L^{-1} .

Para comprobar que el fango adaptado es capaz de degradar el efluente sin una fuente de carbono adicional se realiza un quinto ciclo reemplazando el sobrenadante del fango decantado (2.8 L) por efluente del tratamiento mediante foto-Fenton durante un TRH=2.1 d. El COD inicial es de 83.2 mg L^{-1} y en media hora se reduce en 28 mg L^{-1} siendo después de 11 h el COD final de 44 mg L^{-1} con lo que se consigue una eficiencia del 83%. En este caso las velocidades máximas de consumo de COD y oxígeno son de $57.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 2.7 mM h^{-1} , respectivamente.

La mayor diferencia con el experimento a 500 mg L^{-1} es que se ha controlado la adición de sal de amonio, de forma que sólo se añade cuando desaparece del medio de

reacción (Figura 4.44). Como se observa en la Figura 4.44, en el primer ciclo se adiciona la sal amónica junto con el resto de compuestos que forman la disolución acuosa, de modo que al comienzo del primer ciclo la concentración de nitrógeno en forma de amonio es de 70 mg L^{-1} . El amonio se va transformando en nitrato hasta una concentración final de 6.5 mg L^{-1} , que se reduce en el segundo ciclo por efecto de dilución concluyéndose la desnitrificación en este experimento. Una vez que todo el nitrógeno se ha consumido, se vuelve a adicionar sal amónica en el tercer ciclo y nuevamente el nitrógeno en forma de amonio y nitrato se degrada en el cuarto ciclo. Al final del proceso, la dificultad para llevar a cabo la nitrificación-desnitrificación pone de manifiesto la disminución de actividad del fango, aunque los valores finales de nitrógeno amoniacal están dentro de los establecidos por la legislación para aguas residuales urbanas, en torno a 20 mg L^{-1} .

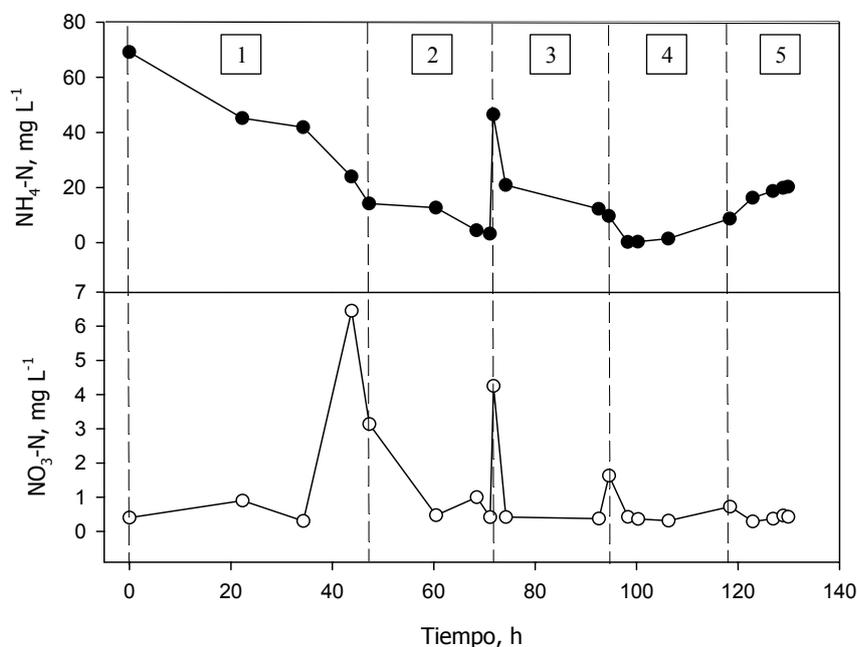


Figura 4.44. Evolución del $\text{NH}_4\text{-N}$ (●) y $\text{NO}_3\text{-N}$ (○) en los cinco ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con un COD inicial de 200 mg L^{-1} .

Al igual que para el ensayo a 500 mg L^{-1} se encuentra una correspondencia entre el carbono orgánico disuelto y el pH (Figura 4.45). Asimismo, la variación de la concentración de CID es muy similar, partiendo de concentraciones muy elevadas al comienzo del primer ciclo que se reducen al finalizar el tratamiento biológico.

Sin embargo, el cambio en el valor de pH durante un ciclo en un sistema biológico responde a todas las reacciones llevadas a cabo por los microorganismos, siendo por tanto,

un buen indicador de que el tratamiento biológico se desempeña correctamente. Debido a que en este primero ciclo sí se produce una correcta nitrificación-desnitrificación, la variación de pH también se ve influenciada por dichas reacciones. Si sólo se produce biodegradación de la materia orgánica, bajo condiciones aerobias, el pH se ve únicamente afectado por la desorción del CO_2 generado en la respiración. Sin embargo, cuando también se elimina el nitrógeno, se pueden observar dos puntos críticos en la curva de pH: el valle amonio y la cima nitrato (Chang y Hao, 1996).

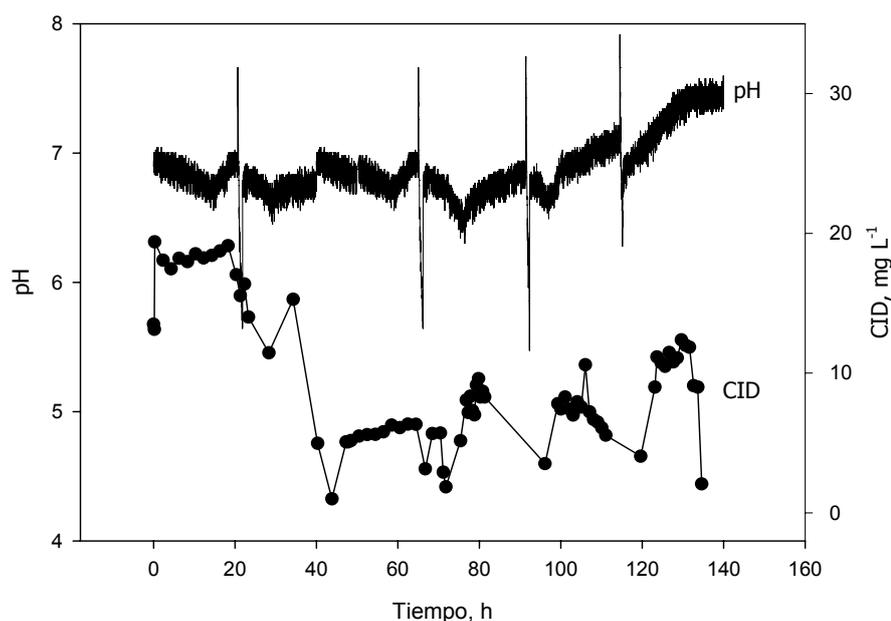


Figura 4.45. Evolución del pH y el carbono inorgánico en los ciclos SBR sobre el efluente del tratamiento con foto-Fenton de una mezcla de 5 plaguicidas con una concentración inicial de 200 mg L^{-1} .

Cuando se está produciendo la nitrificación el pH decrece hasta alcanzar un mínimo (valle amonio) correspondiéndose al final de la nitrificación (Figura 4.46). Después el pH comienza a incrementarse debido a la desorción del CO_2 . Este aumento de pH suele ser más destacado en sistemas que carecen de una fuerte capacidad tamponadora dependiendo la variación del pH de la alcalinidad del agua residual. Finalmente, bajo condiciones anóxicas la desnitrificación incrementa el pH del sistema alcanzando un punto de inflexión (cima nitrato) y decreciendo después levemente con la completa desnitrificación.

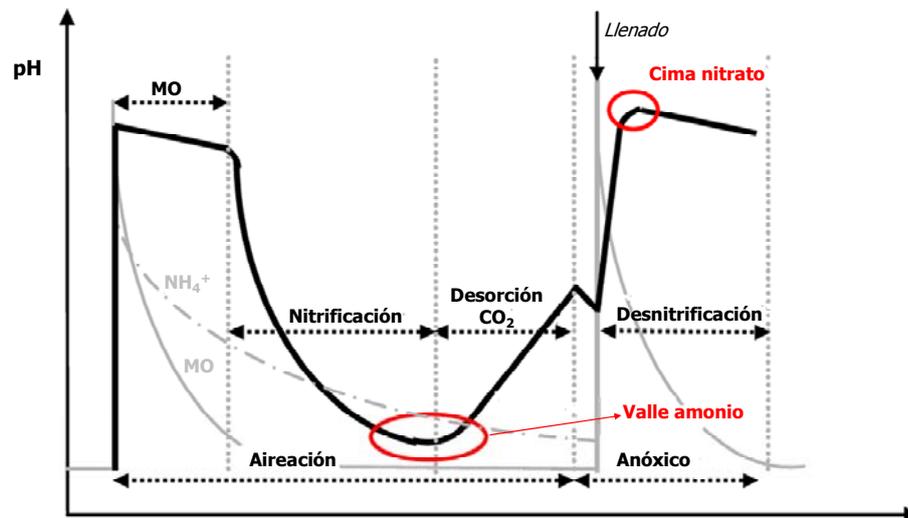


Figura 4.46. Evolución del pH en un sistema biológico en el que se produce biodegradación de la materia orgánica (MO), nitrificación y desnitrificación.

En la actualidad existen tres generaciones de modelos de la IWA (International Association of Water Quality), el ASM1 y ASM3, capaces de predecir la degradación de la materia orgánica, nitrificación y desnitrificación en fangos, y el ASM2 y su versión modificada ASM2d que incluyen además la eliminación biológica del fósforo (Henze y cols., 2000; Gernaey y cols., 2004). Son utilizados para modelar y calibrar las plantas de tratamiento por fangos activos, pudiendo así predecir la calidad del efluente, la demanda de oxígeno y la producción de lodo en respuesta a las fluctuaciones en tiempo real de la carga y el caudal del influente. Sin embargo, cabe destacar la necesidad de realizar estudios anteriores para calibrar los modelos, así como la complejidad de datos empleados (por ejemplo, el ASM1 cuenta con 13 componentes en total: 7 disueltos y 6 de partículas y 9 procesos: 3 de crecimiento, 2 de decaimiento y 4 de hidrólisis), siendo aplicables a aguas residuales urbanas. Además, la bibliografía existente respecto a la aplicación de estos modelos en aguas industriales es muy escasa (Coen y cols., 1998; Petersen y cols., 2002) ya que son aplicables a aguas residuales municipales y deben ser adaptados para ser empleados en efluentes industriales (Gernaey y cols., 2004) por lo que quedan fuera del objetivo de esta Tesis.

Otros autores centran sus estudios de biodegradación con fangos activos en determinar los parámetros cinéticos para un agua residual industrial concreta basándose en modelos mucho más sencillos, como cinéticas de Monod (Bertola y cols., 1999; Özbelge y cols., 2007), Contois (Beltrán-Heredia y cols., 2001; Beltrán y cols., 2008) o Andrews (Sahinkaya y Dilek, 2005; Marrot y cols., 2006).

El consumo de sustrato limitante por parte de un microorganismo viene definido por la Ecuación 4.16:

$$-\frac{dS}{dt} = \mu \frac{X}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec. 4.16}$$

Normalmente, la cinética que describe el crecimiento del microorganismo responde al modelo de Monod (Ecuación 4.17), si bien cuando existe inhibición se utiliza comúnmente la ecuación de Andrews (Ecuación 4.18):

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{X}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 4.17}$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{X}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad \text{Ec. 4.18}$$

En un fango activo, la biomasa esta constituida por un grupo muy diverso de microorganismos y es usualmente expresada como sólidos volátiles en suspensión (Eckenfelder y Musterman, 1995; Cabrero y cols., 1998; Henze y cols., 2002). Sin embargo, con la configuración del reactor empleado, parte de la biomasa queda adherida en las paredes, lo que imposibilita conseguir una medida fiable de biomasa con el tiempo. A pesar de ello, se puede suponer que la concentración de biomasa permanece prácticamente constante en cada ciclo (Quesnel y Nakhla, 2006) debido a que la concentración de biomasa inicial es mucho mayor que la concentración de COD disponible y además los rendimientos de sustrato en biomasa suelen ser bajos para fangos activos, en torno a 0.5 (Ledakowicz y cols., 2001; Al-Malack, 2006), lo que supone que el consumo de carbono genera poca biomasa. Si además, se supone el rendimiento y la velocidad específica de crecimiento máxima constantes en todo el ciclo, se puede introducir el parámetro K que engloba dichas constantes, por lo que el consumo de sustrato con el tiempo se expresaría según las Ecuaciones 4.19 o 4.20, siguiendo una cinética tipo Monod o tipo Andrews:

$$-\frac{dS}{dt} = K \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 4.19}$$

$$-\frac{dS}{dt} = K \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad \text{Ec. 4.20}$$

donde $K = \frac{\mu_{\max} X}{Y_{X/S}}$ representa la velocidad de consumo de sustrato cuando la

velocidad de crecimiento es máxima y tiene unidades de $\text{mg COD L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Para introducir los valores de concentración de sustrato se emplean las concentraciones de COD, al igual que se realiza en los ensayos bacterianos. La mayoría de los autores cuando se refieren a fangos activos emplean la DQO en lugar del COD (Blok, 2001; Al-Malack 2006) pero también se utiliza el COD (Furukawa y cols., 1994; Liu, 2000; Huang y cols., 2008). En la presente Memoria se elige el COD porque la medida es más rápida, fiable y económica. Asimismo, los parámetros del modelo fueron determinados ajustando estas ecuaciones diferenciales a los datos experimentales empleando el programa Matlab™ (ver. 6.5) con las funciones incluidas en su librería de optimización. En los ciclos que presentan fase de adaptación los datos fueron ajustados una vez que dicha fase concluye.

En los ciclos 3, 4, 5 y 6 para el experimento a 500 mg L^{-1} y en todos los ciclos para 200 mg L^{-1} se observa que el descenso de COD varía linealmente con el tiempo. Si estos datos experimentales de consumo de sustrato se ajustan a una cinética tipo Monod y K_S es mucho menor que la concentración inicial de carbono orgánico disuelto, entonces la velocidad de consumo de sustrato se simplificaría resultando igual al parámetro K del modelo propuesto (Ecuación 4.21) mediante una cinética de orden cero:

$$-\frac{dS}{dt} = K \frac{S}{K_S + S} \approx K \frac{S}{S} \approx K \quad \text{Ec. 4.21}$$

De este modo, al representar la concentración de S frente al tiempo se obtiene una línea recta de pendiente K , corroborándose que el modelo propuesto puede ajustar los datos experimentales obtenidos. Otros autores también emplean cinéticas de orden cero para el ajuste de los datos experimentales de consumo de sustrato en aguas con alto contenido de aceite y grasas (Liu y cols., 2004; Nakhla y cols., 2006).

Para que los valores de K obtenidos en ensayos con diferentes concentraciones de COD inicial sean comparables deben realizarse ensayos con lotes iguales de fangos con la

misma cantidad de SVS inicial y actividad metabólica, lo que incluye el mismo comportamiento frente a la decantación.

Como se observa en la Figura 4.39, en los dos primeros ciclos del experimento a 500 mg L^{-1} existe una fase de adaptación a los nuevos sustratos de unas 25 h aproximadamente. En estos dos ciclos los datos experimentales se pueden ajustar según el modelo propuesto anteriormente a una cinética de inhibición tipo Andrews (Ecuación 4.18), en la que la velocidad de consumo de sustrato, K , aumenta en el segundo ciclo 1.6 veces respecto al primero, la afinidad por el sustrato también es mayor (con un valor de K_S de 0.19 mg L^{-1}) y la inhibición es menos acusada (Figura 4.47, Tabla 4.15) por lo que en el segundo ciclo se produce una cierta adaptación del fango a los distintos sustratos.

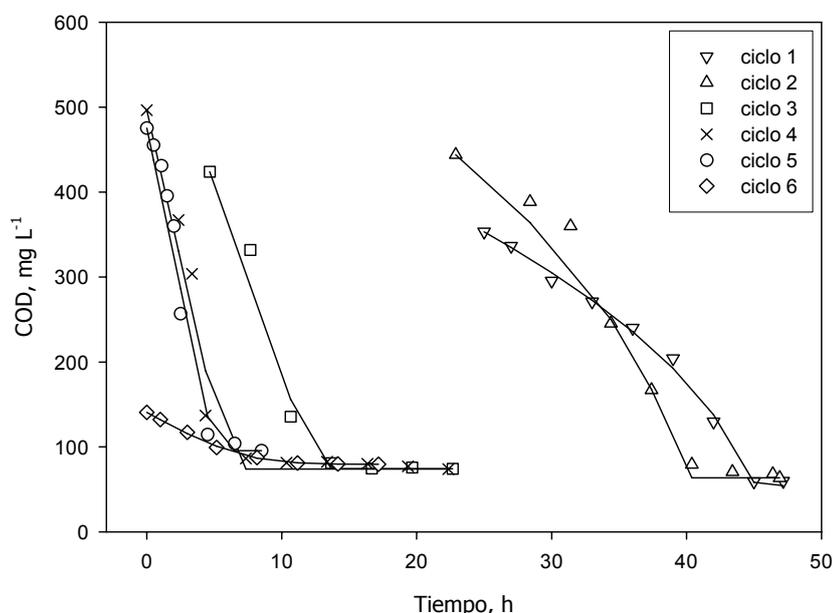


Figura 4.47. Ajuste de los datos experimentales para los seis ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con $\text{COD} = 500 \text{ mg L}^{-1}$. Las líneas en los ciclos 1 y 2 representan el ajuste del modelo de Andrews y en los ciclos 3-6 del modelo de Monod.

En bibliografía se encuentran valores de K_i similares para la biodegradación de 2500 mg L^{-1} de fenol con fangos adaptados partiendo de una concentración de sólidos en suspensión de 10 g L^{-1} operando a temperatura ambiente (Marrot y cols., 2006) y en la biodegradación de 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol operando en SBR con una concentración de fangos de $3\text{-}3.2 \text{ g L}^{-1}$ (Nalbur y Alkan, 2007). Asimismo, Buitron y cols., (1998) encontraron bajos valores de K_S al degradar fenol con fangos activos adaptados pero partiendo de concentraciones iniciales de sustrato bajas (40 mg L^{-1}) con un efecto de inhibición menos acusado ($K_i = 217 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabla 4.15. Valores de los parámetros del modelo cinético para el ensayo con la mezcla fototratada de cinco plaguicidas a una concentración inicial de 500 mg L⁻¹. *Efluente de foto-Fenton como única fuente de carbono.

| Ciclo | Velocidad de consumo de sustrato, K , (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | Constante de saturación, K_s , (mg L ⁻¹) | Constante de inhibición, K_i , (mg L ⁻¹) |
|-------|---|--|--|
| 1 | 51.4 | 6.91 | 63.4 |
| 2 | 81.1 | 0.19 | 74.1 |
| 3 | 44.5 | 0.25 | - |
| 4 | 70.6 | 0.62 | - |
| 5 | 75.6 | 0.20 | - |
| 6* | 11.7 | 19.5 | - |

La aclimatación a la mezcla efluente de foto-Fenton-agua residual simulada se hace evidente cuando se realiza el tercer ciclo, en el que no se aprecia fase de adaptación y la velocidad de consumo de carbono máxima ($r_{\text{COD, max}}$) es casi cinco veces mayor que la del primer ciclo (Tabla 4.13). Asimismo, el modelo de Andrews no es adecuado para ajustar los datos experimentales, que sí se ajustan a una cinética tipo Monod (Figura 4.47), por lo que el sustrato ya no produce inhibición, poniéndose de manifiesto la adaptación.

En los ciclos cuarto y quinto, el consumo de carbono se ajusta nuevamente a una cinética tipo Monod (Figura 4.47), siendo mayor que en los ciclos anteriores, observándose igualmente un incremento en el valor de K hasta 75.6 mg L⁻¹ h⁻¹ (Tabla 4.15). Sin embargo, la afinidad del fango por el sustrato es similar desde el segundo ciclo, siendo K_s en todos los casos del mismo orden de magnitud e inferior a 0.62 mg L⁻¹. Dado que en tercer, cuarto y quinto ciclo $K_s \ll S$, se cumple la Ecuación 4.21 y los datos de velocidad de consumo de sustrato máxima ($r_{\text{COD, max}}$) se asemejan a los valores de K que ofrece el modelo cinético (Tablas 4.13 y 4.15).

Una vez que el fango se ha adaptado, se realiza el sexto ciclo en el que la única fuente de carbono proviene del efluente tratado mediante foto-Fenton. Para este ensayo, como cabría esperar, la cinética también es de tipo Monod (Figura 4.47) puesto que el fango se ha adaptado previamente, y no debe observarse inhibición. En este ciclo la afinidad del sustrato disminuye, puesto que no se añade la fuente de carbono biodegradable, obteniéndose un valor de $K_s=19.5$ mg L⁻¹. Igualmente disminuye la velocidad de consumo de sustrato, siendo $K = 11.7$ mg L⁻¹ h⁻¹, similar al valor obtenido por regresión lineal asumiendo orden cero al inicio del primer ciclo (Tabla 4.13). En general, los datos de K están dentro de los intervalos encontrados en bibliografía. Así, para un agua contaminada con altas concentraciones de aceite y grasas que es pretratada con flotación

por aire disuelto se obtienen valores de K entre 18.3 y $92.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para fangos adaptados con una concentración de $\text{SVS}=7-9.13 \text{ g L}^{-1}$ (Nakhla y cols., 2006).

Cuando la concentración inicial de COD es de 200 mg L^{-1} no se aprecia fase de adaptación, por lo que la concentración de sustrato empieza a disminuir inmediatamente después de iniciarse el primer ciclo. Sin embargo, al igual que para el experimento a 500 mg L^{-1} , en los dos primeros ciclos el consumo de carbono es más lento que en el resto de ciclo. Para este ensayo, el consumo se ajusta a una cinética tipo Monod (Figura 4.48), no observándose inhibición en ninguno de los ciclos. Para los dos primeros ciclos, la constante de saturación es muy baja ($K_S=0.22 \text{ mg L}^{-1}$), lo que se traduce en una gran afinidad del fango por los sustratos presentes, aunque la velocidad de consumo de COD es baja (Tablas 4.14 y 4.16) ya que son necesarias 20 h para consumir todo el COD presente.

La adaptación a las nuevas fuentes de carbono se produce en el tercer ciclo, siendo K_S del mismo orden y aumentando en cinco veces el valor de K respecto al ciclo 1 (Tabla 4.16). En el cuarto experimento el valor de K_S permanece invariable respecto al ciclo anterior aunque la velocidad de consumo de carbono aumenta un 35%. Para todos los ciclos $K_S \ll S$, y, análogamente al ensayo a 500 mg L^{-1} se cumple la Ecuación 4.21 y los datos de velocidad de consumo de sustrato máxima se asemejan a los valores de K que ofrece el modelo cinético (Tablas 4.14 y 4.16).

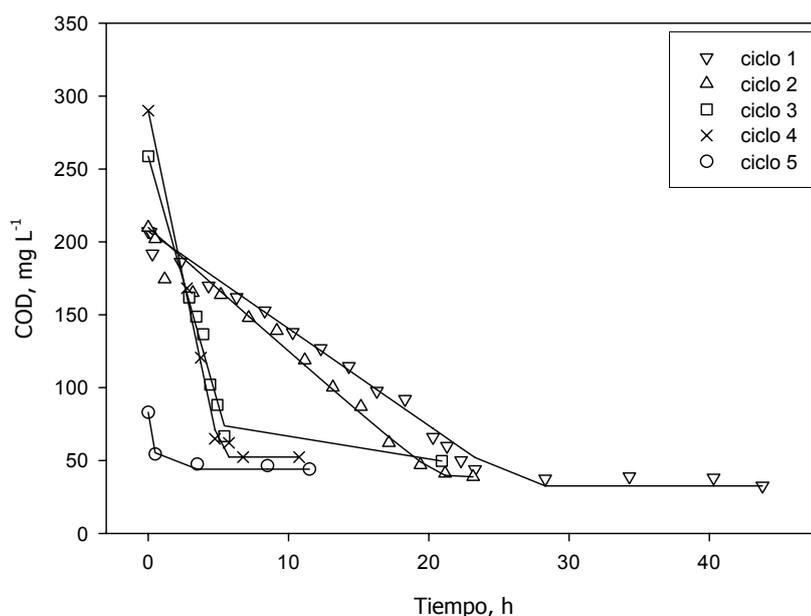


Figura 4.48. Ajuste de los datos experimentales para los cinco ciclos en discontinuo de fangos activos en modo secuencial sobre los intermedios generados en el fototratamiento de la mezcla de cinco plaguicidas con $\text{COD}= 200 \text{ mg L}^{-1}$. Las líneas representan el ajuste del modelo de Monod.

Tabla 4.16. Valores de los parámetros del modelo cinético para el ensayo con la mezcla fototratada de cinco plaguicidas a un concentración inicial de 200 mg L⁻¹. *Efluente de foto-Fenton como única fuente de carbono.

| Ciclo | Velocidad de consumo de sustrato, K, (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | Constante de saturación, K _s , (mg L ⁻¹) |
|-------|---|--|
| 1 | 6.8 | 0.22 |
| 2 | 8.4 | 0.22 |
| 3 | 34.2 | 0.31 |
| 4 | 46.2 | 0.31 |
| 5* | 60.1 | 0.92 |

Si se comparan los ciclos a 500 y 200 mg L⁻¹ de COD inicial para foto-Fenton, 222.8 y 132.5 mg L⁻¹ de COD inicial en el proceso biológico, se observa que, según se predice con los ensayos mediante *P. putida*, ambos efluentes son biodegradables, aunque es necesario la adaptación previa para que la biodegradación pueda llevarse a cabo en tiempos aceptables para una EDAR urbana.

En el último ciclo (sin adición de agua residual simulada), la velocidad de consumo de carbono máxima, K, es de 60.1 mg L⁻¹ h⁻¹ para la menor concentración de plaguicidas, siendo necesarias 0.5 h para la eliminación del COD. En el ensayo a la mayor concentración de plaguicidas, fueron necesarias 11 h para la eliminación del COD, siendo K cinco veces menor (K=11.7 mg L⁻¹ h⁻¹). Este resultado está en concordancia con los ensayos con *P. putida*, dado que los valores de E_f fueron mayores al disminuir la concentración inicial de plaguicidas. La diferencia observada en los valores de K no puede atribuirse sólo a la mayor carga de biomasa en el ensayo a 200 mg L⁻¹, (SVS = 2.54 g L⁻¹) 1.8 veces mayor que los 1.40 g L⁻¹ de SVS en los ensayos de 500 mg L⁻¹. En este sentido, la mayor afinidad del fango por los intermedios generados a la menor concentración de plaguicidas se muestra al aumentar K_s de 0.92 a 19.5 mg L⁻¹ al pasar de 200 a 500 mg L⁻¹ de COD inicial de plaguicidas en el tratamiento mediante foto-Fenton.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados presentados en esta Memoria, se destacan las siguientes conclusiones como respuesta a los objetivos planteados en esta investigación:

1. La bacteria *Pseudomonas putida* es capaz de degradar, en el intervalo de pH entre 5 y 7, y de temperatura entre 25°C y 35°C, cuatro intermedios modelo (vanilina, fenol, ácido oxálico y ácido fórmico) de aquellos muy frecuentes en el tratamiento parcial mediante un POA de un agua contaminada con plaguicidas.

2. Para el intervalo de condiciones ensayadas, el crecimiento de *P. putida* sobre los cuatro sustratos se ha ajustado mediante suma de cinéticas con parámetros de interacción, siguiendo vanilina y ácido fórmico una cinética tipo Monod, y fenol y ácido oxálico una cinética tipo Andrews.

3. Se propone el empleo de *P. putida* como alternativa a otros métodos que emplean fangos activos (DBO, Zahn Wellens) para la estimación de la biodegradabilidad mediante la medida de la eficiencia de biodegradación. Al tratarse de un cultivo monoespecífico, los resultados son reproducibles, fiables y rápidos. Asimismo, permite estudiar el efecto de las sustancias de interés en la cinética del proceso biológico.

4. Tanto con plaguicidas tratados individualmente (alaclor o pirimetanil) como con una mezcla de cuatro plaguicidas comerciales (Laition, Metasystox, Sevnot y Ultracid), se ha demostrado que la medida de la eficiencia de biodegradación con *P. putida* permite estimar el tiempo mínimo de tratamiento mediante foto-Fenton que hace viable un posterior proceso biológico.

5. El estudio cinético realizado con *P. putida* a los tiempos mínimos de tratamiento seleccionados revela que, dependiendo del plaguicida de partida, las fases de adaptación y las velocidades de respiración y de consumo de carbono pueden ser muy diferentes, debido a cambios en las cinéticas de crecimiento del microorganismo.

6. Para una mezcla de cinco plaguicidas comerciales (Vydate, Metomur, Couraze, Ditimur y Scala) al aumentar la concentración inicial de COD aportado por éstos (de 200 a 500 mg L⁻¹),

la intensidad del tratamiento fotocatalítico debe incrementarse para conseguir el mismo grado de mineralización con menores eficiencias de biodegradación.

7. Se ha comprobado que a la intensidad de tratamiento mediante foto-Fenton seleccionada con *P. putida* para la mezcla de cuatro plaguicidas con un COD inicial de 180 mg L⁻¹, el efluente es biodegradado por fangos activos de una EDAR, en reactores tanque agitado operados en modo discontinuo secuencial, consiguiéndose una eficiencia de biodegradación del 100%. Al aumentar la complejidad de la mezcla (cinco plaguicidas con COD inicial de 200 y 500 mg L⁻¹), es necesario añadir una fuente de carbono biodegradable (agua residual simulada) al efluente del tratamiento mediante foto-Fenton para favorecer la biodegradación.

8. Combinando foto-Fenton (con una mineralización del 55%) y tratamiento biológico discontinuo secuencial (con una biodegradación del 89%), se ha logrado degradar una mezcla de cinco plaguicidas comerciales con una concentración de COD de hasta 500 mg L⁻¹ con una eficacia total del 95%.

9. La biodegradación mediante fangos activos de la mezcla de cinco plaguicidas pretratada mediante foto-Fenton con concentraciones iniciales de carbono de 200 mg L⁻¹ y 500 mg L⁻¹ se ajusta al modelo:

$$-\frac{dCOD}{dt} = K \frac{COD}{K_s + COD}$$

donde $K = \frac{\mu_{max} X}{Y_x/s}$ representa la velocidad de consumo de COD cuando la velocidad de

crecimiento es máxima y K_s indica la afinidad del fango activo por los sustratos presentes.

10. La aplicación del modelo a la biodegradación de los intermedios del proceso foto-Fenton predice que, al aumentar el número de ciclos en un proceso discontinuo secuencial, se incrementa la velocidad de consumo de COD (K), obteniéndose valores de la constante de afinidad (K_s) menores a la unidad. Asimismo, el valor de estos parámetros depende de la naturaleza del fango y de su concentración.

NOMENCLATURA

6. NOMENCLATURA

| | |
|--------------------------------|---|
| COD | Carbono orgánico disuelto (mg L^{-1}) |
| COD _f | COD medido al final del proceso biológico (mg L^{-1}) |
| COD _i | COD inicial aportado por los intermedios de reacción (mg L^{-1}) |
| COD _m | COD procedente del medio criogénico que no puede ser degradado por <i>P. putida</i> (30 mg L^{-1}) |
| DBO | Demanda biológica de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) |
| DO ₂ | Oxígeno disuelto (%) |
| DQO | Demanda química de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) |
| E _f | Eficiencia de biodegradación (%) |
| I _{ij} | Constante de interacción (L mg^{-1}) |
| J | Función objetivo |
| K | Velocidad de consumo de sustrato cuando la velocidad de crecimiento es máxima ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) |
| K _d | Constante de muerte |
| K _i | Constante de inhibición (mg L^{-1}) |
| K _s | Constante de saturación (mg L^{-1}) |
| $\overline{\text{UV}}$ | Radiación solar ultravioleta promedio (W m^{-2}) |
| Q | Caudal diario (L d^{-1}) |
| q _{O₂,max} | Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) |
| r _{COD,max} | Velocidad máxima de consumo de COD ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) |
| r _{O₂,max} | Velocidad máxima de consumo de oxígeno (mM h^{-1}) |
| S | Concentración de sustrato (mg L^{-1}) |
| STS | Sólidos totales en suspensión (g L^{-1}) |
| SVS | Sólidos volátiles en suspensión (g L^{-1}) |
| t _{30W} | Tiempo de iluminación normalizado (min) |
| TRH | Tiempo de retención hidráulico (d) |
| V _i | Volumen total irradiado (L) |
| V _T | Volumen total de agua a tratar (L) |
| X | Biomasa (mg L^{-1}) |
| X _{exp} | Espacio de estado vectorizado de los datos experimentales |
| X _{mod} | Espacio de estado vectorizado de los datos simulados |
| Y _{X/S} | Rendimiento biomasa-sustrato (gX gS^{-1}) |

LETRAS GRIEGAS

| | |
|--------------------|--|
| λ | Longitud de onda (nm) |
| μ | Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) |
| μ_{max} | Velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}) |

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abuhamed T., Bayraktar E., Mehmetoglu T., Mehmetoglu Ü. (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochem.*, 39: 983-988.
- Adams C., Scanlon P. A., Secrist N. D. (1994). Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-dioxane using hydrogen peroxide and ozone. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1812-1818.
- Adroer N., Casas C., de Mas C., Sola C. (1990). Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 217-220.
- Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z. M. (2007). Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Hazard. Mater.*, 149: 60-66.
- Agüera A., Almansa E., Tejedor A., Fernández-Alba A. (2000). Photocatalytic pilot scale degradation study of pyrimethanil and of its main degradation products in waters by means of solid-phase extraction followed by gas and liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 1563-1571.
- Ajbar A. (2001). Stability analysis of the biodegradation of mixed wastes in a continuous bioreactor with cell recycle. *Water Res.*, 35: 1201-1208.
- Al-Malack M. H. (2006). Determination of biokinetic coefficients of an immersed membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.*, 271: 47-58.
- Amat A. M., Arqués A., Miranda M. A., Seguí S. (2004). Photo-Fenton reaction for the abatement of commercial surfactants in a solar pilot plant. *Sol. Energy*, 77: 559-566.
- Amat A. M., Arqués A., López F., Miranda M. A. (2005). Solar photo-catalysis to remove paper mill wastewater pollutants. *Sol. Energy*, 79: 393-401.
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R. (1999). Advanced Oxidation Processes (AOP) for water purification and recovery. *Catal. Today*, 53: 51-59.
- Andreozzi R., Caprio V., Marotta R. (2001). Oxidation of benzothiazole, 2-mercaptobenzothiazole and 2-hydroxybenzothiazole in aqueous solution by means of H₂O₂/UV or photoassisted Fenton systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76: 196-202.
- Andrews J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 10: 707-723.
- APHA-AWWA-WEF. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed., Washington DC, USA.
- Arqués A., Amat A. M., García-Ripoll A., Vicente R. (2007a). Detoxification and/or increase of the biodegradability of aqueous solutions of pesticides by means of solar photocatalysis. *J. Hazard. Mater.*, 146: 447-452.
- Arqués A., García-Ripoll A., Sanchís R., Santos-Juanes L., Amat A. M., López M. F., Miranda M. A. (2007b). Detoxification of aqueous solutions containing the commercial pesticide Metasystox by TiO₂-mediated solar photocatalysis. *J. Sol. Energy Eng.*, 129: 74-79.
- Balogh S. J., Nollet Y. H. (2008). Mercury mass balance at a wastewater treatment plant employing sludge incineration with offgas mercury control. *Sci. Total Environ.*, 389: 125-131.

- Baltzis B. C., Tsangaris D. M., Wang K. W. (1996). Utilization of substitutable substrates in a bioreactor under cycling: A study on process dynamics and optimization. *Chem. Eng. Sci.*, 51: 3801-3811.
- Bandala E. R., Peláez M. A., García-López A. J., Salgado M. J., Moeller G. (2008). Photocatalytic decolourisation of synthetic and real textile wastewater containing benzidine-based azo dyes. *Chem. Eng. Process*, 47: 169-176.
- Bandhyopadhyay K., Das D., Bhattacharyya P., Maiti B. R. (2001). Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochem. Eng. J.*, 8: 179-186.
- Barceló D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. Special issue. *Trends Anal. Chem.*, 22 (10) xiv-xvi.
- Barreto-Rodrigues M., Souza J. V. B., Silva E. S., Silva F. T., Paiva T. C. B. (2008). Combined photocatalytic and fungal processes for the treatment of nitrocellulose industry wastewater. *J. Hazard. Mater.* En prensa. Disponible desde el 9 de mayo de 2008.
- Bauer R., Fallman H. (1997). The photo-Fenton oxidation-a cheap and efficient wastewater treatment method. *Res. Chem. Intermediat.*, 23: 341-354.
- Baxter R. M., Sutherland D. A. (1984). Biochemical and photochemical processes in the degradation of chlorinated biphenyls. *Environ. Sci. Technol.*, 18: 608-610.
- Beltrán F. J., García-Araya J. F., Álvarez P. M. (1999a). Wine distillery wastewater degradation. 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (ozone)-biological treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3919-3924.
- Beltrán F., Acedo B., Rivas J. (1999b). Use of ozone to remove alachlor from surface water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 324-329.
- Beltrán J., González T., García J. (2008). Kinetics of the biodegradation of green table olive wastewaters by aerobic and anaerobic treatments. *J. Hazard. Mat.*, 154: 839-845.
- Beltrán-Heredia J., Torregrosa J., García J., Domínguez J. R., Tierno J. C. (2001). Degradation of olive mill wastewater by the combination of Fenton's reagent and ozonation processes with an aerobic biological treatment. *Water Sci. Technol.*, 44: 103-108.
- Benítez F. J., Beltrán-Heredia J., Torregrosa J., Acero J. L. (1999). Treatment of olive mill wastewaters by ozonation, aerobic digestion and the combination of both treatments. *J. Chem. Technol. Biot.*, 74: 639-646.
- Bernat K., Wojnowska-Baryła I., Dobrzyńska A. (2008). Denitrification with endogenous carbon source at low C/N and its effect on P(3HB) accumulation. *Biores. Technol.*, 99: 2410-2418.
- Bertin L., Majone M., di Gioia D., Fava F. (2001). An aerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *J. Biotechnol.*, 87: 161-177.
- Bertola N., Palladino L., Bevilacqua A., Zaritzky N. (1999). Optimisation of the design parameters in an activated sludge system for the wastewater treatment of a potato processing plant. *J. Food Eng.*, 40: 27-33.
- Bigda R. (1995). Consider Fenton's chemistry for wastewater treatment. *Chem. Eng. Progr.*, 91: 62-66.
- Blok J. A. (2001). Single model for mass transfer and growth for biodegradation rates in activated sludge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48: 148-160.

- Bossmann S. H., Oliveros E., Göb S., Siegwart S., Dahlen E. P., Payawan L., Straub M., Wörner M., Braun A. M. (1998). New evidence against hydroxyl radicals as reactive intermediates in the thermal and photochemically enhanced Fenton reactions. *J. Phys. Chem. A*, 102: 5542-5550.
- Bowers A. R., Gaddipati P., Eckenfelder Jr., W. W., Monsen R. M. (1989). Treatment of toxic or refractory wastewaters with hydrogen peroxide. *Water Sci. Technol.*, 21: 477-486.
- Brillas E., Mur E., Sauleda R., Sánchez L., Peral J., Domènech X., Casado J. (1998). Aniline mineralization by AOP's: anodic oxidation, photocatalysis, electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes. *Appl. Catal. B: Environ.*, 16: 31-42.
- Buitrón G., González A., López-Marín L. M. (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.*, 37: 371-378.
- Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P., Ross A. B. (1988). Critical-review of rate constant for reactions of hydrated electrons, hydrogen-atoms and hydroxyl radicals (OH^*/O^*) in aqueous-solution. *J. Phys. Chem.*, 14: 1041-1100.
- Cabrero A., Fernández S., Mirada F., García J. (1998). Effects of copper and zinc on the activated sludge bacteria growth kinetics. *Water Res.*, 32: 1355-1362.
- Carberry J. B., Benzing T. M. (1991). Peroxide preoxidation of recalcitrant toxic waste to enhance biodegradation. *Water Sci. Technol.*, 23: 367-376.
- Cardenosa M., Autenrieth R. L., Bonner J. S. (1989). In situ soil reclamation by air stripping and sludge uptake. *J. Hazard. Mater.*, 22: 256-257.
- Carraghera J. M., McCleana W. S., Woodleyb J. M., Hacka C. J. (2001). The use of oxygen uptake rate measurements to control the supply of toxic substrate: toluene hydroxylation by *Pseudomonas putida* UV4. *Enz. Microb. Technol.*, 28: 183-188.
- Casas López J. L., Rodríguez Porcel E. M., Oller Alberola I., Ballesteros Martín M. M., Sánchez Pérez J. A., Fernández Sevilla J. M., Chisti Y. (2006). Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors. *Ind. Eng.Chem.Res.*, 45: 1167-1171.
- Catalkaya E. C., Kargi F. (2007). Color, TOC and AOX removals from pulp mill effluent by advanced oxidation processes: A comparative study. *J. Hazard. Mater.*, 139: 244-253.
- Chamarro E., Marco A., Prado J., Esplugas S. (1996). Tratamiento de aguas y aguas residuales mediante utilización de procesos de oxidación avanzada. *Química & Industria*, 1:28-32.
- Chamarro E., Marco A., Esplugas S. (2001). Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Res.*, 35: 1047-1051.
- Chang C. H., Hao O. J. (1996). Sequencing batch reactor system for nutrient removal: ORP and pH profiles. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 67: 27-38.
- Chen Y. M., Lin T. F., Huang C., Lin J. C., Hsieh F. M. (2007a). Degradation of phenol and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard. Mater.*, 148: 660-670.
- Chen S., Sun D., Chung J. S. (2007b). Treatment of pesticide wastewater by moving-bed biofilm reactor combined with Fenton-coagulation treatment. *J. Hazard. Mater.*, 144: 577-584.
- Cheung K. H., Gu J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59: 8-15.
- Chiang L. C., Chang J. E., Tseng S. C. (1997). Electrochemical oxidation pretreatment of refractory organic pollutants. *Water Sci. Technol.*, 36: 123-130.

- Chung T. P., Tseng H. Y., Juang R. S. (2003). Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochem.*; 38: 1497-1507.
- Coen F., Petersen B., Vanrolleghem P. A., Vanderhaegen B., Henze M. (1998). Model-based characterisation of hydraulic, kinetic and influent properties of an industrial WWTP. *Water Sci. Technol.*, 39: 195-214.
- Comisión Europea. (2003). Water for life. EU Water initiative. International cooperation from knowledge to action.
- Contreras S., Rodriguez M., Al Momani F., Sans C., Esplugas S. (2003). Contribution of the ozonation pre-treatment to the biodegradation of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol. *Water Res.*, 37: 3164-3171.
- Contreras E. M., Albertario M. E., Bertola N. C., Zaritzky N. E. (2008). Modelling phenol biodegradation by activated sludges evaluated through respirometric techniques. *J. Hazard. Mater.* En prensa. Disponible desde el 2 de febrero de 2008.
- Da Hora Machado A. E., Xavier T. P., de Souza D. R., de Miranda J. A., Mendonsa-Duarte E. T. F., Ruggiero R., de Oliveira L., Sattler C. (2004). Solar photo-Fenton treatment of chip board production waste water. *Sol. Energ.*, 77: 583-589.
- De Heredia J. B., Torregrosa J., Domínguez J. R., Peres J. A. (2001). Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere*, 45: 85-90.
- Decreto 14/1996. BOJA, 19: 1344-1353.
- Deng Y., Englehardt J. D. (2007). Electrochemical oxidation for landfill leachate treatment. *Waste Manage.*, 27: 380-388.
- 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: 455-461.
- Dikshitulu S., Baltzis B. C., Lewandowski G. A., Pavlou S. (1993). Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor: theory, experimental verification, and implications for waste treatment applications. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 643-656.
- Directiva 2000/60/EC. *Official Journal of the European Communities*, 327: 1-72.
- Directiva 2002/71/EC. *Official Journal of the European Communities*, 225: 21-28.
- Directiva 2006/16/EC. *Official Journal of the European Communities*, 36: 37-39.
- Directiva 2006/26/EC. *Official Journal of the European Communities*, 19: 23-29.
- Directiva 2006/59/CE. *Official Journal of the European Communities*, 175: 61-76.
- Directiva 2006/74/EC. *Official Journal of the European Communities*, 235: 17-22.
- Directiva 2007/7/EC. *Official Journal of the European Communities*, 43: 19-31.
- Directiva 76/160/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 31 (5.2.1976).
- Directiva 76/464/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 129: 23-29.
- Directiva 80/778/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 778: 1-18.
- Directiva 88/303/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 132: 76-79.
- Directiva 91/271/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 15: 26-38.
- Directiva 91/676/EEC. <http://ec.europa.eu/environment/water/waternitrates/directiv.html>.
- Directiva 96/61/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 257:26-40.
- Directiva de Sustancias Prioritarias. WISE Newsletter, Iss. 5, Jun 2007, ISSN-725-390X.

- Dosta J., Galí A., El-Hadj T. B., Macé S., Mata-Álvarez J. (2007). Operation and model description of a sequencing batch reactor treating reject water for biological nitrogen removal via nitrite. *Bioresour. Technol.*, 98: 2065-2075.
- Eckenfelder W. W., Musterman J. L. (1995). Activated sludge treatment of industrial wastewater. Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania, USA.
- EFSA, European Food Safety Authority. (2006). Conclusion on the peer review of pyrimethanil. *Scientific Report*, 61: 1-70.
- Entezari M. H., Pétrier C. (2003). A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of substituted phenols. *Ultrason. Sonochem.*, 10: 241-246.
- EPA. (1999). Wastewater technology fact sheet. Sequencing Batch Reactors. 832-F-99-073. Washington DC, USA.
- Esplugas S., Ollis D. F. (1997). Economic aspects of integrated (chemical + biological) processes for water treatment. *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2: 197-202.
- Essam T., Amin M. A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieysse B. (2007). Solar-based detoxification of phenol and p-nitrophenol by sequential TiO₂ photocatalysis and photosynthetically aerated biological treatment. *Water Res.*, 41: 1697-1704.
- Evgenidou E., Konstantinou I., Fytianos K., Albanis T. (2006). Study of the removal of dichlorvos and dimethoate in a titanium dioxide mediated photocatalytic process through the examination of intermediates and the reaction mechanism. *J. Hazard. Mater.*, 137: 1056-1064.
- Farré M.; Barceló D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal. Chem.*, 22: 299-310.
- Farré M. J., Franch M. I., Malato S., Ayllón J. A., Peral J., Doménech X. (2005). Degradation of some biorecalcitrant pesticides by homogeneous and heterogeneous photocatalytic ozonation. *Chemosphere*, 58: 1127-1133.
- Farré M. J., Doménech X., Peral J. (2006). Assessment of photo-Fenton and biological treatment coupling for Diuron and Linuron removal from water. *Water Res.*, 40: 2533-2540.
- Farré M. J., Doménech X., Peral J. (2007). Combined photo-Fenton and biological treatment for Diuron and Linuron removal from water containing humic acid. *J. Hazard. Mat.*, 147: 167-174.
- Farré M. J., Maldonado M. I., Gernjak W., Oller I., Malato S., Doménech X., Peral J. (2008). Coupled solar photo-Fenton and biological treatment for the degradation of Diuron and Linuron herbicides at pilot scale. *Chemosphere*, 72: 622-629.
- Fenton H. J. H. (1884). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.*, 65: 889-910.
- Fernández-Alba A. R., Hernando Guil L., Díaz López G., Chisti Y. (2001). Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta*, 426: 289-301.
- Fongsatitkul P., Elefsiniotis P., Yamasmit A., Yamasmit N. (2004). Use of sequencing batch reactors and Fenton's reagent to treat a wastewater from a textile industry. *Biochem. Eng. J.*, 21: 213-220.
- Furukawa K., Tanaka N., Fujita M. (1994). Stoichiometry of activated sludge process for the treatment of synthetic organic wastewater. *J. Ferment. Bioeng.*, 78: 175-178.
- Gallard H., De Laat J., Legube B. (1999). Spectrophotometric study of the formation of iron(III)-hydroperoxy complexes in homogeneous aqueous solutions. *Water Res.*, 33: 2929-2936.
- Ganigué R., López H., Balaguera M. D., Colprima J. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Res.*, 41 3317-3326.

- García A., Amat A. M., Arqués A., Sanchís R., Gernjak W., Maldonado M. I., Oller I., Malato S. (2006). Detoxification of aqueous solutions of the pesticide "SevnoI" by solar photocatalysis. *Environ. Chem. Lett.*, 3: 169-172.
- García Sanchez J. L., Kamp B., Onysko K. A., Budman H., Robinson W. (1998). Double inhibition model for degradation of phenol by *Pseudomonas putida* Q5. *Biotechnol. Bioeng.*, 60: 560-567.
- García-Montaño J., Torrades F., García-Hortal J. A., Doménech X., Peral J. (2006a). Combining photo-Fenton process with aerobic sequencing batch reactor for commercial hetero-bireactive dye removal. *Appl. Catal.B: Environ.*, 67: 86-92.
- García-Montaño J., Torrades F., García-Hortal J. A., Doménech X., Peral J. (2006b). Degradation of Procion Red H-E7B reactive dye by coupling a photo-Fenton system with a sequencing batch reactor. *J. Hazard. Mat.*, 134: 220-229.
- García-Montaño J., Doménech X., García-Hortal J. A., Torrades F., Peral J. (2008). The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal. *J. Hazard. Mater.*, 154: 484-490.
- García-Ripoll A., Amat A. M., Arqués A., Vicente R., Lopez M. F., Oller I., Maldonado M. I., Gernjak W. (2007). Increased biodegradability of Ultracid™ in aqueous solutions with solar TiO₂ photocatalysis. *Chemosphere*, 68: 293-300.
- García-Ripoll A., Amat A. M., Arqués A., Vicente R., Ballesteros Martín M. M., Sánchez Pérez J. A., Oller I., Malato S. (2008). Confirming *P. putida* as a reliable bioassay for demonstrating biocompatibility enhancement by solar photo-oxidative processes of a biorecalcitrant effluent. *J. Hazard. Mat.* En prensa. Disponible desde el 11 de junio de 2008.
- Gernaey K. V., van Loosdrecht M. C. M., Henze M., Lind M., Jørgensen S. B. (2004). Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art. *Environ. Modell. Software*, 19: 763-783.
- Gernjak W., Krutzler T., Glaser A., Malato S., Cáceres J., Bauer R., Fernández-Alba A. R. (2002). Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere*, 50: 71-78.
- Gernjak W., Fuerhacker M., Fernández-Ibañez P., Blanco J., Malato S. (2006). Solar photo-Fenton treatment- Process parameters and Process control. *Appl. Catal. B: Environ.*, 64: 121-130.
- Glancer-Soljan M., Soljan V., Dragicević T. L., Cacić L. (2001). Aerobic degradation of formaldehyde in wastewater from the production of melamine resins. *Food Technol. Biotechnol.*, 39: 197-202.
- Glaze W., Chapin D. (1987). The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Eng.*, 9: 335-342.
- Glaze W., Kang J. (1989). Advanced oxidation processes. Test of a kinetic model for the oxidation of organic compounds with ozone and hydrogen peroxide in a semibatch reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 28: 1580-1587.
- Gogate P. R., Pandit A. (2004a). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.*, 8: 501-551.
- Gogate P. R., Pandit A. (2004b). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Adv. Environ. Res.*, 8: 553-597.
- González G., Herrera G., García M. T., Peña M. (2001). Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.*, 80: 137-142.

- Gonze E., Fourel L., Gonthier Y., Boldo P., Bernis A. (1999). Wastewater pretreatment with ultrasonic irradiation to reduce toxicity. *Chem. Eng. J.*, 73: 93-100.
- Gonze E., Commenges N., Gonthier Y., Bernis A. (2003). High frequency ultrasound as a pre-or a post-oxidation for paper mill wastewaters and landfill leachate treatment. *Chem. Eng. J.*, 92: 215-225.
- Greated A., Lambertsen L., Williams P. A., Thomas C. M. (2002). Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, 4: 856-871.
- Grizard G., Ouchchane L., Roddier H., Artonne C., Sion B., Vasson M. P., Janny L. (2007). *In vitro* alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. *Reprod. Toxicol.*, 23: 55-62.
- Guhl W.; Steber J. (2006). The value of biodegradation screening test results for predicting the elimination of chemicals' organic carbon in waste water treatment plants. *Chemosphere*, 63: 9-16.
- Guo G. L., Tseng D. H., Huang S. L. (2001). Co-metabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* in a fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.*, 23: 1653-1657.
- Haag W. R., Yao C. C. D. (1992). Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with several drinking water contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 1005-1013.
- Hayaishi O., Katagari M., Rothberg. S. (1955). Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 5450-5451.
- Henze M., Gujer W., Mino T., van Loosdrecht M. (2000). Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Publishing. London.
- Henze M., Harremoës P., Cansen J. C., Harbin E. (1995). Wastewater treatment, biological and chemical processes. Springer, Berlin.
- Henze M., Harremoës P., Jansen J., Arvin E. (2002). Wastewater treatment. Biological and chemical processes. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hernando M. D., De Vettori S., Martínez Bueno M. J., Fernández-Alba A. R. (2007). Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, 68: 724-730.
- Hernando M. D., Fernández-Alba A. R., Tauler R., Barceló D. (2005). Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*, 65: 358-366.
- Herrmann J. M. (2005). Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications. *Top. Catal.*, 34: 49-65.
- Hess T. F., Lewis T. A., Crawford R. L., Katamneni S., Wells J. H., Watts R. J. (1998). Combined photocatalytic and fungal treatment for the destruction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Water Res.*, 32: 1481-1491.
- Hill G. A., Robinson C. W. (1975). Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 1599-1615.
- Hincapié M., Maldonado M. I., Oller I., Gernjak W., Sánchez-Pérez J. A., Ballesteros M. M., Malato S. (2005). Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances. *Catal. Today*, 101: 203-210.
- Hislop K. A., Bolton J. R. (1999). The photochemical generation of hydroxyl radical in the UVvis/ferrioxalate/H₂O₂ system. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 3119-3126.
- Hochstrat R., Wintgens T., Melin T., Jeffrey P. (2005). Wastewater reclamation and reuse in Europe: A model-based potential estimation. *Water Sci. Technol.: Water Supply*, 5: 67-75.
- Hoi T. C., Chen J., Shukla S., Hopper J. R. (1989). Metal capture during fluidized bed incineration of solid wastes. *J. Hazard. Mater.*, 22: 257-258.

- Horberg G. (1990). Risk, science and politics, Alachlor regulation in Canada and the United States. *Canadian J. Polit. Sci.*, 23: 257-277.
- Horii Y., Reiner J. L., Loganathan B. G., Kumar K. S., Sajwan K., Kannan K. (2007). Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA. *Chemosphere*, 68: 2011-2020.
- Hörsch P., Speck A., Frimmel F. H. (2003). Combined advanced oxidation and biodegradation of industrial effluents from the production of stilbenzene-based fluorescence whitening agents. *Water Res.*, 37: 2748-2756.
- Hospido A., Moreira M. T., Fernández-Couto M., Feijoo G. (2004). Environmental performance of a municipal wastewater treatment plant. LCA case studies. *Int. J. Life Cycle Ass.*, 10: 336-345.
- Huang G., Jin G., Wu J., Liu Y. (2008). Effects of glucose and phenol on soluble microbial products (SMP) in sequencing batch reactor systems. *Int. Biodeter. Biodegr.* En prensa. Disponible desde el 30 de enero de 2008.
- Huston P. L., Pignatello J. (1999). Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Res.*, 33: 1238-1246.
- Jojiu E. E., Landrison E., Raeder H., Torp E. G., Miachon S., Dalmon J. A. (2006). The "Watercatox" process: Wet air oxidation of industrial effluents in a catalytic membrane reactor. First report on contactor CMR up-scaling to pilot unit. *Catal. Today*, 118: 246-252.
- Irvine, R. L., Ketchum Jr., L. H. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *Crit. Rev. Env. Contr.*, 18: 255-294.
- Jiménez J. I., Miñambres B., García J. L., Díaz E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, 4: 824-841.
- Juang R. S., Tsai S. Y. (2006). Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. *Biochem. Eng. J.*, 31: 133-140.
- Kakko R., Christiansen V., Mikkola E., Kallonen R., Smith-Hansen L. Jørgensen K. (1995). Toxic combustion products of three pesticides. *J. Loss Prev. Process Ind.*, 8: 127-132.
- Kargi F., Eker S. (2004). Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 35: 424-428.
- Kargi F., Eker S. (2005). Removal of 2,4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochem.*, 40: 2105-2111.
- Katsumata H., Kaneco S., Suzuki T., Ohta K., Yobiko Y. (2006). Photo-Fenton degradation of alachlor in the presence of citrate solution. *J. Photochem. Photobiol. A.: Chem.*, 180: 38-45.
- Kearney P. C., Zeng Q., Ruth J. M. (1983). Oxidative pretreatment accelerates TNT metabolism in soils. *Chemosphere*, 12: 1583-1597.
- Kearney P. C., Muldoon M. T., Somich C. J., Ruth J. M., Voaden D. J. (1988). Biodegradation of ozonated atrazine as a wastewater disposal system. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 1301-1306.
- Keulen F., Correia C. N., Fonseca M. M. R. (1998). Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. *J. Molec. Catal. B: Enz.*, 5: 295-299.
- Kim S. M., Vogelpohl A. (1998). Degradation of organic pollutants by the photo-Fenton process. *Chem. Eng. Technol.*, 21: 187-191.
- Kiwi J., Pulgarin C., Peringer P. (1994). Effect of Fenton and photo-Fenton reactions on the degradation and biodegradability of 2 and 4-nitrophenols in water treatment. *Appl. Catal. B: Environ.*, 3: 335-350.

- Kiwi J., Denisov N., Gak Y., Ovanesyan N., Buffat P., Suvorova E., Gostev F., Titov A., Sarkisov O., Albers P., Nadtochenko V. (2002). Catalytic Fe³⁺ clusters and complexes in Naftion active in photo-Fenton processes. High-resolution electron microscopy and femtosecond studies. *Langmuir*, 18: 9054-9066.
- Konstantinou I. K., Albanis T. A. (2003). Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways. *Appl. Catal. B: Environ.*; 42: 319-335.
- Konstantinou I. K., Albanis T. A. (2004). TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations: A review. *Appl. Catal. B: Environ.*, 49: 1-14.
- Kopling D. W., Thurman E. M., Goosby D. A. (1996). Occurrence of select pesticides and their metabolites in near-surface aquifers of the Midwestern United States. *Env. Sci. Technol.*, 30: 335-340.
- Kormann C., Bahnemann D. W., Hoffmann M. R. (1988). Photocatalytic production of H₂O₂ and organic peroxides in aqueous suspensions of TiO₂, ZnO and desert salt. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 798-806.
- Koskinen W. C., Sellung J. M., Baker J. M., Barber B. L., Dowdy R. H. (1994). Ultrasonic decomposition of alachlor and atrazine in water. *J. Environ. Sci. Health B*, 29: 581-590.
- Kumar A., Kumar S., Kumar S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.*, 22: 151-159.
- Lafi W. K., Al-Qodah Z. (2006). Combined advanced oxidation and biological treatment processes for the removal of pesticides from aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.*, 137: 489-497.
- Lapertot M. E.; Pulgarín C. (2006). Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: Choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere*, 65: 682-690.
- Lapertot M., Pulgarín C., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M. I., Pérez-Estrada L., Oller I., Gernjak W., Malato S. (2006). Enhancing biodegradability of priority substances (pesticides) by solar photo-Fenton. *Water Res.*, 40: 1086-1094.
- Lapertot M., Ebrahimi S., Dazio S., Rubinelli A., Pulgarin C. (2007). Photo-Fenton and biological integrated process for degradation of a mixture of pesticides. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 186: 34-40.
- Ledakowicz S., Solecka M., Zylla R. (2001). Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *J. Biotechnol.*, 89: 175-184.
- Lee S. H., Carberry J. B. (1992). Biodegradation of PCP enhanced by chemical oxidation pretreatment. *Water Environ. Res.*, 64: 682-690.
- Legrini O., Oliveros E., Braun A. M. (1993). Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.*, 93: 671-698.
- Li K., Chan, S., Yu C. (2000). Treatment of chlorohydrocarbon contaminated groundwater by air stripping. International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. 2nd, Monterey, CA, United States, May 22-25: 293-300.
- Lin S., Chuang T. (1994). Combined treatment of phenolic wastewater by wet air-oxidation. *Toxicol. Environ. Chem.*, 44: 243-258.
- Lin S. H., Chang C. C. (2000). Treatment of landfill leachate by combined electro-fenton oxidation and sequencing batch reactor method. *Water Res.*, 34: 4243-4249.
- Lin S. H., Jiang C. D. (2003). Fenton oxidation and sequencing batch reactor (SBR) treatments of high-strength semiconductor wastewater. *Desalination*, 154: 107-116.
- Lin S. H., Kiang C. D. (2003). Combined physical, chemical and biological treatments of wastewater containing organics from a semiconductor plant. *J. Hazard. Mat.*, 97: 159-171.

- Liu Y. (2000). The So/Xo-dependent dissolved organic carbon distribution in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Water Res.*, 34: 1645-1651.
- Liu V. L., Nakhla G., Bassi A. (2004). Treatability and kinetics studies of mesophilic aerobic biodegradation of high oil and grease pet food wastewater. *J. Hazard. Mat.*, 112: 87-94.
- Loh K. C., Yu Y. G. (2000). Kinetics of carbazole degradation by *Pseudomonas putida* in presence of sodium salicylate. *Water Res.*, 34: 4131-4138.
- López Cisneros R., Gutarra Espinoza A., Litter M. I. (2002). Photodegradation of an azo dye of the textile industry. *Chemosphere*, 48: 393-399.
- Luck F. (1999). Wet air oxidation: past, present and future. *Catal.Today*, 53: 81-91.
- Mace S., Mata-Alvarez J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41: 5539-5553.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Brock P. J. (2004). Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Educación S.A. Madrid.
- Malato S., Blanco J., Richter C., Maldonado M. (2000). Optimization of preindustrial solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides. Application to pesticide container recycling. *Appl. Catal. B Environ.*, 25: 31-38.
- Malato S., Cáceres J., Agüera A., Mezcua M., Vial J., Fernández-Alba, A. (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: a comparative study. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 4359-4366.
- Malato S., Blanco J., Cáceres J., Fernández-Alba A. R., Agüera A., Rodríguez A. (2002). Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. *Catal. Today*, 76: 209-220.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Alarcón D., Maldonado M. I., Cáceres J., Gernjak W. (2003a). Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview. *Sol. Energy*, 75: 329-336.
- Malato S., Cáceres J. Fernández-Alba A. R. Piedra L., Hernando M. D., Agüera A., Vial J. (2003b). Photocatalytic treatment of diuron by solar photocatalysis: evaluation of main intermediates and toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 2516-2524.
- Malato S., Blanco J., Maldonado M. I., Fernández P., Gernjak W., Oller I. (2005). Treatment of chlorinated solvents by TiO₂ photocatalysis and photo-Fenton: influence of operating conditions in a solar pilot plant. *Chemosphere*, 58: 391-398.
- Malato S., Blanco J., Maldonado M. I., Oller I., Gernjak W., Pérez-Estrada L. (2007a). Coupling solar photo-Fenton and biotreatment at industrial scale: Main results of a demonstration plant. *J. Hazard. Mater.*, 146: 440-446.
- Malato S., Blanco J., Alarcón D. C., Maldonado M. I., Fernández-Ibáñez P., Gernjak W. (2007b). Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catal. Today*, 122: 137-149.
- Maldonado M. I., Passarinho P. C., Oller I., Gernjak W., Fernández P., Blanco J., Malato S. (2007). Photocatalytic degradation of EU priority substances: A comparison between TiO₂ and Fenton plus photo-Fenton in a solar pilot plant. *J. Photoch. Photobio. A*, 185: 354-363.
- Manilal V. B., Haridas A., Alexander R., Surender G. D. (1992). Photocatalytic treatment of toxic organics in wastewater: toxicity of photodegradation products. *Water Res.*, 26: 1035-1038.

- Mantzavinos D., Lauer E., Hellenbrand R., Livingston A. G., Metcalfe I. S. (1997). Wet oxidation as a pretreatment method for wastewaters contaminated by bioresistant organics. *Water Sci. Technol.*, 36: 109-116.
- Mantzavinos D., Sahibzada M., Livingston A. G., Metcalfe I. S., Hellgardt K. (1999). Wastewater treatment: Wet air oxidation as a precursor to biological treatment. *Catal. Today*, 53: 93-106.
- Mantzavinos D., Psillakis E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79: 431-454.
- Margesin R., Bergauer P., Gander S. (2004). Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter sp.* and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles*, 8: 201-207.
- Marrón-Montiel E., Ruiz-Ordaz N., Rubio-Granados C., Juárez-Ramírez C., Galíndez-Mayer C. J. (2006). 2,4-D-degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochem.*, 41: 1521-1528.
- Marrot B., Barrios-Martinez A., Moulin P., Roche N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 30: 174-183.
- Marugán J., López-Muñoz M. J., Gernjak W., Malato S. (2006). Fe/TiO₂/pH interactions in solar degradation of imidacloprid with TiO₂/SiO₂ photocatalysts at pilot-plant scale. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45: 8900-8908.
- Masselli J., Masselli N., Burford M. (1970). Simplifying textile waste pollution surveys and treatment. *Proc. S. Water Resour. Pollut. Contr. Conf.*, 19: 37-48.
- McCarty P. L. (1991). Terrestrial physical and chemical processes for liquid waste treatment. *Waste Manage. Res.*, 9: 79-387.
- Metcalfe L., Eddy H. P. (1985). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. McGraw-Hill, 2nd Ed., New York, USA.
- Metcalfe L., Eddy H. P. (1991). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. McGraw-Hill, 3th Ed., New York, USA.
- Mikkelson K. A. (1995). AquaSBR Design Manual, Aqua-Aerobic Systems, Inc.
- Mohan N., Balasubramanian N., Basha C. (2007). An electrochemical oxidation of textile wastewater and its reuse. *J. Hazard. Mater.*, 147: 644-651.
- Monero A., Lanza L., Zilli M., Sene L., Converti A. (2003). Batch kinetics of *Pseudomonas sp.* growth on benzene. Modelling of product and substrate inhibitions. *Biotechnol. Prog.*, 19: 676-679.
- Monteiro A. A. M. G., Boaventura R. A. R, Rodrigues A. E. (2000). Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.*, 6: 45-49.
- Montie T. C. (1998). *Pseudomonas*. Plenum Press, New York.
- Mutuc M. D. M., Love N. G., Vikesland P. J. (2008). Surface catalyzed Fenton treatment of bis(2-chloroethyl) ether and bis(2-chloroethoxy) methane. *Chemosphere*, 70: 1390-1398.
- Nakhla G., Liu V., Bassi A. (2006). Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and grease rendering wastewater. *Bioresour. Technol.*, 97: 131-139.
- Nalbur B. E., Alkan U. (2007). The inhibitory effects of 2-CP and 2,4-DCP containing effluents on sequencing batch reactors. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 60: 178-188.
- Neelavannan M. G., Revathi M., Basha C. A. (2007). Photocatalytic and electrochemical combined treatment of textile wash water. *J. Hazard. Mater.*, 149: 371-378.

- Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Düsterhöft A., Tümmler B., Fraser C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, 4: 799-808.
- Neyens E., Baeyens J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J. Hazard. Mater.*, 98: 33-50.
- Nogueira R. F. P., Cuimaraes J. R. (2000). Photodegradation of dichloroacetic acid and 2-4 dichlorophenol by Ferrioxalate/H₂O₂ system. *Water Res.*, 34: 895-901.
- Nogueira R. F. P., Oliveira M. C., Paterlini W. C. (2005). Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66 86-91.
- O'Neill C., Hawkes F. R., Hawkes D. L., Esteves S., Willcox S. J. (2000). Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. *Water Res.*, 34: 2355-2361.
- OECD series on pesticides. (2003). Persistent, bioaccumulative and toxic pesticides in OECD member countries. 15 ENV/JM/MONO(2002)22.
- Olivera E. R., Minambres B., Garcia B., Muniz C., Moreno M. A., Ferrandez A. (1998). Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6419-6424.
- Oller I., Gernjak W., Maldonado M. I., Pérez-Estrada L. A., Sánchez-Pérez J. A., Malato S. (2006). Solar photocatalytic degradation of some hazardous water-soluble pesticides at pilot-plant scale. *J. Hazard. Mater.*, 138: 507-517.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J. A., Maldonado M. I., Gassó R. (2007a). Detoxification of wastewater containing five common pesticides by solar AOPs-biological coupled system. *Catal. Today*, 129: 69-78.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J. A., Maldonado M. I., Gernjak W., Pérez-Estrada L. A., Muñoz J. A., Ramos C., Pulgarín C. (2007b). Pre-industrial-scale combined solar photo-Fenton and immobilised biomass activated-sludge bio-treatment. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 46: 7467-7475.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J. A., Gernjak W., Maldonado M. I., Pérez-Estrada L. A., Pulgarín C. (2007c). A combined solar photocatalytic-biological field system for the mineralization of an industrial pollutant at pilot scale. *Catal. Today*, 122: 150-159.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J. A., Maldonado M. I., Gernjak W., Pérez-Estrada L. A. (2007d). AOPs-Biological system for wastewater containing a recalcitrant pollutant. *Water Sci. Technol.*, 55: 229-235.
- Oller I. (2008). Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Ollis D. F. (2001). On the need for engineering models of integrated chemical and biological oxidation of wastewaters. *Water Sci. Technol.*, 44: 117-123.
- Osano O., Admiraala W., Klamerc H. J. C., Pastorc D., Bleekera E. A. J. (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.*, 119: 195-202.
- Özbelge T. A., Özbelge H. Ö., Altinten P. (2007). Effect of acclimatization of microorganisms to heavy metals on the performance of activated sludge process. *J. Hazard. Mater.*, 142: 332-339.
- Panikov N. S. (1995). Microbial growth kinetics. Chapman & Hall, London.

- Panizza M., Cerisola G. (2008). Removal of colour and COD from wastewater containing acid blue 22 by electrochemical oxidation. *J. Hazard. Mater.*, 153: 83-88.
- Park S. J., Yoon T. I., Bae J. H., Seo H. J., Park H. J. (2001). Biological treatment of wastewater containing dimethyl sulphoxide from the semi-conductor industry. *Process Biochem.*, 36: 579-589.
- 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. *Appl. Catal. B: Environ.*, 27: 153-168.
- Parra S., Malato S., Pulgarin C. (2002). New integrated photocatalytic-biological flow system using supported TiO₂ and fixed bacteria for the mineralization of isoproturon. *Appl. Catal. B: Environ.*, 36: 131-144.
- Parra S., Henao L., Mielczarski E., Mielczarski J., Albers P., Suvorova E., Guindet J., Kiwi J. (2004). Synthesis, testing, and characterization of a novel nafion membrane with superior performance in photoassisted immobilized fenton catalysis. *Langmuir*, 20: 5621-5629.
- Pazarlioğlu N. K., Telefoncu A. (2005). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochem.*, 40: 1807-1814.
- Peñuela G. A., Barceló D. (1996). Comparative degradation kinetics of alachlor in water by photocatalysis with FeCl₃, TiO₂ and photolysis, studied by solid phase disk extraction followed by gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, 754: 187-195.
- Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M. A., Jiménez J., Esplugas S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general overview. *Appl. Catal. B: Environ.*, 47: 219-256.
- Pérez M., Torrades F., García-Hortal J. A., Domènech X., Peral J. (1997). Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents by TiO₂ photocatalyzed oxidation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 109: 281-286.
- Pérez M., Torrades F., Garcia-Hortal J. A., Domènech X., Peral J. (2002). Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents by Fenton and photo-Fenton reactions. *Appl. Catal. B: Environ.*, 36: 63-74.
- Pérez-Estrada L. A., Maldonado M. I., Gernjak W., Agüera A., Fernández-Alba A. R., Ballesteros M. M., Malato S. (2005a). Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catal. Today*, 101: 219-226.
- Pérez-Estrada L. A., Malato S., Gernjak W., Agüera A., Thurman E. M., Ferrer I., Fernández-Alba A. R. (2005b). Photo-Fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 8300-8306.
- Pérez-Estrada L. A., Malato S., Agüera A., Fernández-Alba A. R. (2007). Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs. Identification of intermediate products and toxicity assessment. *Catal. Today*, 129: 207-214.
- Petersen B., Gernaey K., Henze M., Vanrolleghem P. A. (2002). Evaluation of an ASM1 model calibration procedure on a municipal-industrial wastewater treatment plant. *J. Hydroinformatics*, 4: 15-38.
- Pignatello J., Liu D., Huston P. (1999). Evidence for an additional oxidant in the photoassisted Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 1832-1839.
- Pignatello J., Oliveros E., MacKay A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 36: 1-84.
- Plataforma Solar de Almería. (2004). Informe Annual.

- Priefert H., Rabenhorst J., Steinbüchel A. (1997). Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.*, 179: 2595-2607.
- 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. *Catal. Today*, 54: 341-352.
- Quesnel D., Nakhla G. (2006). Removal kinetics of acetone and MIBK from a complex industrial wastewater by an acclimatized activated sludge. *J. Hazard. Mat.*, 132: 253-260.
- Raghu S., Basha C. A. (2007). Electrochemical treatment of Procion Black 5B using cylindrical flow reactor. A pilot plant study. *J. Hazard. Mater.*, 139: 381-390.
- Real Decreto 509/1996. *BOE*, 77: 12038-12041.
- Real Decreto 1620/2007. *BOE*, 294: 50639-50661.
- Reardon K. F., Mosteller D. C., Rogers J. D. B. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrate for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.*, 69: 386-400.
- Rivas F. J., Beltrán F. J., Gimeno O., Alvarez P. (2001). Chemical-biological treatment of table olive manufacturing wastewater. *J. Environ. Eng.-ASCE*, 127: 611-619.
- Rodríguez M., Sarria V., Esplugas S., Pulgarin C. (2002). Photo-Fenton treatment of a biorecalcitrant wastewater generated in textile activities: biodegradability of the photo-treated solution. *J. Photochem. Photobiol. A*, 151: 129-135.
- Rorschach R. C., Autenrieth R. I., Bonner J. S. (1989). Air stripping of hexachlorobiphenyl from the aqueous phase. *J. Hazard. Mater.*, 22: 256.
- Sahinkaya E., Dilek F. B. (2005). Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge-Evaluation of biokinetic coefficients. *Environ. Res.*, 99: 243-252.
- Sakkas V. A., Arabatzis I. M., Konstantinou I. K., Dimou A.D., Albanis T. A., Falaras P. (2004). Metolachlor photocatalytic degradation using TiO₂ photocatalysts. *Appl. Catal. B: Environ.* 49: 195-205.
- Santos A., Yustos P., Rodriguez S., Garcia-Ochoa F. (2004). Evolution of toxicity upon wet catalytic oxidation of phenol. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 133-138.
- Santos-Juanes L., Amat A. M., Arqués A., Bernabeu A., Silvestre M., Vicente R., Añó E. (2008). Activated sludge respirometry to assess solar detoxification of a metal finishing effluent. *J. Hazard. Mater.*, 153: 905-910.
- Saracco G., Solarino L., Aigotti R., Specchia V., Maja M. (2000). Electrochemical oxidation of organic pollutants at low electrolyte concentrations. *Electrochim. Acta*, 46: 373-380.
- Sarria V., Parra S., Invernizzi M., Péringier P., Pulgarin C. (2001). Photochemical-biological treatment of a real industrial biorecalcitrant wastewater containing 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone. *Water Sci. Technol.*, 44: 93-101.
- Sarria V., Parra S., Adler N., Péringier P., Benitez N., Pulgarin C. (2002). Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. *Catal. Today*, 76: 301-315.
- Sarria V., Deront M., Péringier P., Pulgarin C. (2003a). Degradation of a biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewaters by a new integrated iron(III) photoassisted-biological treatment. *Appl. Catal. B: Environ.*, 40: 231-246.
- Sarria V., Kenfack S., Guillod O., Pulgarin C. (2003b). An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 159: 89-99.

- Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409: 258-268.
- Scott J. P., Ollis D. F. (1995). Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations. *Environm. Prog.*, 14: 88-103.
- Scott J. P., Ollis D. F. (1996). Engineering models of combined chemical and biological processes. *J. Environ. Eng.*, 122: 1110-1114.
- Scott J. P., Ollis D. F. (1997). Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: II. Recent illustrations and experiences. *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2: 374-381.
- Segura A., Bünz P. V., D'Argenio D. A., Ornston L. N. (1999). Genetic analysis of a chromosomal region containing vanA and vanB, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.*, 181: 3494-3504.
- Segura C., Zaror C., Mansilla H. D., Mondaca M. A. (2008). Imidacloprid oxidation by photo-Fenton reaction. *J. Hazard. Mater.*, 150: 679-686.
- Seker S., Beyenal H., Salih B., Tanyolac A. (1997). Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 47: 610-614.
- Shibin X., Shuichun X., Changqing Z. (2007). Removal of organic pollutants from 2,2',5,5'-tetrachlorobenzidine (TCB) industrial wastewater by micro-electrochemical oxidation and air-stripping. *J. Hazard. Mater.*, 144: 159-163.
- Shim H., Yang S. T. (1999). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *J. Biotechnol.*, 67: 99-112.
- Shim H., Shin E., Yang S. T. (2002). A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Adv. Environ. Res.*, 7: 203-216.
- Spain J. C., Gibson D. T. (1988). Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. Strain JS6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1399-1404.
- Spain J. C., Zylstra G. J., Blake C. K., Gibson D. T. (1989). Monohydroxylation of phenol and 2,5-dichlorophenol by toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2648-2652.
- Staehelin J., Hoigné J. (1982). Decomposition of ozone in water: Rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.*, 16: 676-681.
- Stalikas C. D., Lunar L., Rubio S., Pérez-Dendito D. (2001). Degradation of medical X-ray film developing wastewaters by advanced oxidation processes. *Water Res.*, 35: 3845-3856.
- Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S. J. (1995). Principles of fermentation technology. 2nd Edition. Pergamon Ed.
- Stephenson R. L., Blackburn J. B. Jr. (1998). *The industrial wastewater systems handbook*. Lewis publishers, New York, USA.
- Steverson E. (1991). Proving a firestorm: Waste Incineration. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1419-1427.
- Stowell J. P., Jensen J. N., Webber A. S. (1992). Sequential chemical/biological oxidation of 2-chlorophenol. *Water Sci. Technol.*, 26: 2085-2087.
- Suh Y. J., Rousseaux P. (2002). A LCA of alternative wastewater sludge treatment scenarios. *Resour. Conserv. Recy.*, 35: 191-200.
- Sun Y., Pignatello J. (1993). Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4-D by Fe³⁺/H₂O₂/UV. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 304-310.

- Suzuki J., Nakagawa H., Ito H. (1976). Study on ozone treatment of water-soluble polymers. II. Utilization of ozonized polyethylene glycol by bacteria. *J. Appl. Polymer Sci.*, 20: 2791-2797.
- Sychev A. Y., Isak V. G. (1995). Iron compounds and the mechanisms of the homogeneous catalysis of the activation of O₂ and H₂O₂ and of the activation of organic substrates. *Russ. Chem. Rev.*, 64: 1105-1129.
- Takahashi N., Nakai T., Satoh Y., Katoh Y. (1994). Variation of biodegradability of nitrogenous organic compounds by ozonation. *Water Res.*, 28: 563-1570.
- Tang W. Z., Huang C. P. (1996). 2,4-Dichlorophenol oxidation kinetics by Fenton's reagent. *Environ. Technol.*, 17: 1371-1378.
- Tekin H., Bilkay O., Ataberk S. S., Balta T. H., Ceribasi I. H., Sanin F. D., Dilek F. B., Yetis U. (2006). Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *J. Hazard. Mat.*, 136: 258-265.
- Tian-Ming C., Li-Bo G., Li-Wei C., Shu C., Xiao-Dan L., Zhong-Li C., Shun-Peng L. (2007). Enhanced biological phosphorus removal with *Pseudomonas putida* GM6 from activated sludge. *Pedosphere*, 17: 624-629.
- Timmis K. N. (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*. *Environ. Microbiol.*, 4: 779-781.
- Torres R. A., Sarria V., Torres W., Périgner P., Pulgarin C. (2003). Electrochemical treatment of industrial wastewater containing 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone: toward an electrochemical-biological coupling. *Water Res.*, 37: 3118-3124.
- UNEP. (2002). Global environment outlo 3. Nairobi, Kenya.
- Urs von Gunten (2003). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.*, 37: 1443-1467.
- van der Werf H. M. G. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agr. Ecosys. Environ.*, 60: 81-96.
- van Rijn J., Tal Y., Schreier H. J. (2006). Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquac. Eng.*, 34: 364-376.
- Vicente Candela R. (2007). Evolución de la toxicidad y la biodegradabilidad de contaminantes persistentes en medios acuosos durante un proceso de fotocátalisis solar empleando diferentes técnicas analíticas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Vlyssides A. G., Loizidou M., Karlis P. K., Zorpas A. A., Papaioannou D. (1999). Electrochemical oxidation of a textile dye wastewater using a Pt Ti electrode. *J. Hazard. Mater.*, 70: 41-52.
- Wackett L. P., Gibson D. T. (1988). Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1703-1708.
- Walsh U. F., Morrissey J. P., O'Gara F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12: 289-295.
- Wang K. W., Baltzis B. C., Lewandowski G. A. (1996). Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose. *Biotechnol. Bioeng.*; 51: 87-94.
- Wang S. J., Loh K. C. (1999). Modeling the role metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enz. Microbial Technol.*, 25: 177-184.
- Wang T. H., Kang S. F., Lin Y. H. (1999). Comparison among Fenton-related processes to remove 2,4-Dinitrophenol. *J. Environ. Sci. Health A*, 34: 1267-1281.

- Wang C., Yediler A., Lienert D., Wang Z., Kettrup A. (2003). Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere*, 52: 1225-1232.
- Wang C. C., Lu K. L., Chen X. Y. (2007). Removal of triethylamine from synthetic wastewater by acclimated mixed bacteria cultures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 59: 202-205.
- Weng Y., Hong P. K. A., Wavrek D. A. (1999). Integrated chemical-biological treatment of Benzo[a]pyrene. *Environ. Sci. Tech.*, 34: 854-862.
- Whitby G. (1989). The treatment of spa water with ozone produced by UV light. *Ozone Sci. Eng.*, 11: 313-324.
- WHO y UNICEF Joint Monitoring Programme. (2005). Water for Life: Making it happen. Geneva, Switzerland.
- Yang R. D., Humphrey A. E. (1975). Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.*; 17: 1211-1235.
- Yavuz Y., Koparal A. S. (2006). Electrochemical oxidation of phenol in a parallel plate reactor using ruthenium mixed metal oxide electrode. *J. Hazard. Mater.*, 136: 296-302.
- Yeh R., Hung Y., Liu R., Chiu H., Thomas A. (2002). Textile wastewater treatment with activated sludge and powdered activated carbon. *Int. J. Environ. Stud.*, 59: 607-622.
- Yoon H., Klinzing G., Blanch H. W. (1977). Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 1193-1210.
- Zahn R., Wellens H. (1974). Ein einfaches verfahren zur prüfung der biologischen abbaubarkeit von produckten and abwasserinhaltsstoffen. *Chem. A.*, 98: 228-232.
- Zhuang W. Q., Tay J. H., Yi S., Tay S. T. L. (2005). Microbial adaptation to biodegradation of tert-butyl alcohol in a sequencing batch reactor. *J. Biotechnol.*, 118: 45-53.
- Ziyang L., Xiaoli C., Dongji N., Yuanyang O., Youcai Z. (2008). Size-fractionation and characterization of landfill leachate and the improvement of Cu²⁺ adsorption capacity in soil and aged refuse. *Waste Manage.* En prensa. Disponible desde el 1 de abril de 2008.

