

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA TEXTIL Y PAPELERA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

**EVOLUCIÓN DE LA TOXICIDAD Y LA
BIODEGRADABILIDAD DE CONTAMINANTES
PERSISTENTES EN MEDIOS ACUOSOS
DURANTE UN PROCESO DE FOTOCATÁLISIS
SOLAR EMPLEANDO DIFERENTES TÉCNICAS
ANALÍTICAS**

TESIS DOCTORAL

Autor: Rafael Vicente Candela

Directores de Tesis: Dra. D^a Ana María Amat Payá (U.P.V.)
Dr. D. Antonio Arques Sanz (U. P.V.)

Abril 2007

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
RESUM	13
1.- INTRODUCCIÓN	15
1.1.- PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACION DEL AGUA	17
1.2.- PROCESOS DE TRATAMIENTO CONVENCIONALES DE AGUAS RESIDUALES	26
1.3.- PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN APLICADOS AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	31
1.3.1.- PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	34
1.3.2.- PROCESOS FOTOQUÍMICOS	35
1.3.2.A.- REACTIVO DE FENTON Y PROCESOS FOTOFENTON	37
1.3.2.B.- PROCESOS FOTOCATALÍTICOS CON SEMICONDUCTORES	38
1.3.2.C.- SENSIBILIZADORES ORGÁNICOS	40
1.4.- EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS AGUAS RESIDUALES	43
1.4.1.- ESTADO ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUAS RESIDUALES	44
1.4.2.- ESTADO ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA BIODEGRADABILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUAS RESIDUALES	57
2.- OBJETIVOS	71
3.- PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	75
4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	79
4.1 .- REACTIVOS	81
4.2 .- EQUIPOS DE ANÁLISIS	85
4.3 .- PLANTAS PILOTO DE TRATAMIENTO	95

4.4 .- MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD	97
4.4.1.- DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE <i>Vibrio fischeri</i>	97
4.4.2.- DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN DE FANGOS ACTIVOS	100
4.4.3.- DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO ₅)	104
4.5 .- MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA BIODEGRADABILIDAD	107
4.5.1.- MÉTODO DE ZAHN-WELLENS	107
4.5.2.- MEDIDA DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO A TIEMPO CORTO (DBO _{st})	110
4.5.3.- RELACIÓN ENTRE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO Y LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DBO ₅ /DQO)	111
4.6 .- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LOS TRATAMIENTOS FOTOCATALÍTICOS	114
<u>5.- RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN</u>	117
5.1.- TRATAMIENTOS FOTOCATALÍTICOS: ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES	119
5.2.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICION DE LA RESPIRACIÓN DE FANGOS ACTIVOS	127
5.3.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICION DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅)	137
5.4.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE <i>Vibrio fischeri</i>	140
5.5.- COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE MEDIDA DE TOXICIDAD	142
5.6.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD CON LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO A TIEMPO CORTO (DBO_{st})	145
5.7.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD CON LA RELACIÓN ENTRE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO Y LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅/DQO)	149
5.8.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD CON EL MÉTODO DE ZAHN-WELLENS	152
5.9.- COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE MEDIDA DE LA BIODEGRADABILIDAD	157

5.10.- APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL A UNA MUESTRA COMPLEJA	158
6.- CONCLUSIONES	165
7.- APORTACIONES DE LA TESIS	171
7.1.- PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	173
7.2.- PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS	176
8.- BIBLIOGRAFÍA	179
9. APÉNDICES	211
9.1.- ÍNDICE DE TABLAS	213
9.2.- ÍNDICE DE GRÁFICOS	215
9.3.- ÍNDICE DE FIGURAS	217
9.4.- ÍNDICE DE ECUACIONES	219

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Dr. D^a. Ana M^a Amat Paya y Dr. D. Antonio Arques Sanz, por la gran ayuda prestada, el empeño empleado y el tiempo dedicado en la realización de la Tesis; a Alicia Doménech, Rosa Vercher, Lucas Santos-Juanes y Ana García por su apoyo y por su colaboración desinteresada; a Inmaculada de Mora por su gran eficacia en la solución de todos los problemas burocráticos.

Al Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, cuyo programa de doctorado he realizado y que me ha permitido desarrollar el trabajo experimental en sus instalaciones. A la Universidad Politécnica de Valencia, a la Generalitat Valenciana, al Ministerio de Educación y Ciencia y a la Comunidad Europea por permitirme participar en los proyectos de investigación

A los amigos de la Plataforma Solar de Almería y de la Universidad de Almería por sus aportaciones y colaboración. A mis amigos y compañeros de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy por su comprensión.

A mis hijos Lara y Rafael, y a Margarita. Sin ellos no habría conseguido este objetivo. Gracias por todo su cariño, apoyo y comprensión en todos los momentos, sin los cuales no podría haber realizado este trabajo.

RESUMEN

Los métodos biológicos basados en fangos activos son los más utilizados para el tratamiento de aguas residuales debido a su eficacia y a su bajo coste. Sin embargo, algunos efluentes presentan contaminantes tóxicos y/o no biodegradables que impiden la acción de los fangos activos. Las tecnologías o procesos avanzados de oxidación que utilizan como energía la radiación solar han demostrado ser eficaces en la eliminación de estos contaminantes y podrían ser un buen pretratamiento para mejorar la biocompatibilidad del efluente.

La evaluación de la toxicidad y la biodegradabilidad del efluente es muy necesaria para combinar ambos procesos, aunque en muchos casos es difícil su medida debido a la utilización de bioensayos con organismos vivos, lo que dificulta la interpretación y reproducibilidad de los análisis.

Se han utilizado tres métodos de medida de la toxicidad que se diferencian principalmente en el tipo de organismo vivo y en el tiempo de exposición al contaminante. Estos métodos se basan en la inhibición de la bioluminiscencia de la *Vibrio fischeri* y de la tasa de respiración específica de fangos activos. El método bioluminiscente ha demostrado una mayor sensibilidad que los respirométricos, aunque éstos últimos podrían aportar una mayor información sobre el comportamiento de los reactores biológicos.

Para la determinación de la biodegradabilidad de un efluente también se ha utilizado tres parámetros distintos basados en fangos activos, aunque con diferentes niveles de adaptación como la medida de la biodegradabilidad intrínseca con el test de Zahn-Wellens, la biodegradabilidad inmediata con una modificación del método de respirometría manométrica y la biodegradabilidad directa, con la medida de la Demanda Bioquímica de Oxígeno a tiempo corto (DBO_{st}). Los tres métodos muestran tendencias similares, aunque se pueden detectar diferencias cuantitativas en el porcentaje de biodegradabilidad estimado.

Para este trabajo se emplearon tres tipos muy diferentes de efluentes, que han sido sometidos a procesos de fotocatalisis solar: aguas ricas en cianuros y metales procedentes del tratamiento de superficies, disoluciones de plaguicidas comerciales y por último, contaminantes fenólicos.

ABSTRACT

Activated sludge-based biological methods are widely used in wastewater treatment because of their high efficiency and low costs that involve. Nevertheless, some effluents contain toxic or non-biodegradable pollutants that have a negative effect towards the sludge respiration. Advanced oxidation processes or technologies that use sunlight as energy source have proven to be efficient to remove such pollutants and thus, they could be employed as a pre-treatment to enhance the biocompatibility of the effluent.

Evaluation of the toxicity and biodegradability of the effluent is necessary to couple solar photocatalysis and biological processes, although these measurements are usually difficult, because they are based on bioassays using living systems, and results may show a limited reproducibility and are difficult to understand.

Three methods have been employed to determine toxicity. The main differences among these methods are the organism that is involved and their time of exposure to the pollutant. These assays are based on the inhibition of the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and the specific respiration tax of activated sludge. The bioluminescent method has showed higher sensibility, although activated sludge-based respirometric measurements are expected to give more information on the behaviour of biological reactors.

Biodegradability of the effluent has also been estimated according to three different assays; all of them involve activated sludge, although the time of adaptation to the pollutant is different: intrinsic biodegradability is measured according to Zahn-Wellens test, immediate biodegradability is obtained from the manometric respirometric assay and the direct biodegradability from the short time biological oxygen demand. Similar trends are obtained from all three methods, although quantitative differences can be appreciated in the estimated percentage of biodegradability.

Effluents having very different composition and characteristics have been employed in this work; metal and cyanide containing wastewaters, obtained from electroplating industry, aqueous solutions of commercial pesticides and, finally, phenolic pollutants. All of them have been submitted to solar photocatalysis and their biocompatibility determined after different irradiation periods.

RESUM

Els mètodes biològics basats en fangs actius són els més utilitzats per al tractament d'aigües residuals a causa de la seua eficàcia i al seu baix cost. No obstant, alguns efluents presenten contaminants tòxics i/o no biodegradables que impedeixen l'acció dels fangs actius. Les tecnologies o processos avançats d'oxidació que utilitzen com a energia la radiació solar han demostrat ser eficaços en l'eliminació d'estos contaminants i podrien ser un bon pretractament per a millorar la biocompatibilitat de l'efluent.

L'avaluació de la toxicitat i la biodegradabilitat de l'efluent és molt necessària per a combinar ambdós processos, encara que en molts casos és difícil la seua mesura a causa de la utilització de bioassajos amb organismes vius, la qual cosa dificulta la interpretació i reproduïbilitat de les anàlisis.

S'han utilitzat tres mètodes de mesura de la toxicitat que es diferencien principalment en el tipus d'organisme viu i en el temps d'exposició al contaminant. Estos mètodes es basen en la inhibició de la bioluminescència de la *Vibrio fischeri* i de la taxa de respiració específica de fangs actius. El mètode bioluminescent ha demostrat una major sensibilitat que els respiromètrics, encara que estos podrien aportar una major informació sobre el comportament dels reactors biològics.

Per a la determinació de la biodegradabilitat d'un efluent també s'ha utilitzat tres paràmetres distints basats en fangs actius, encara que amb diferents nivells d'adaptació com la mesura de la biodegradabilitat intrínseca amb el test de Zahn-Wellens, la biodegradabilitat immediata amb una modificació del mètode de respirometria manomètrica i la biodegradabilitat directa, amb la mesura de la Demanda Bioquímica d'oxigen a curt temps (DBOst). Els tres mètodes mostren tendències semblants, encara que es poden detectar diferències quantitatives en el percentatge de biodegradabilitat estimat.

Per a este treball s'emplea tres tipus molt diferents d'efluents, que han segut sotmesos a processos de fotocàlisis solar: aigües riques en cianurs i metalls procedents del tractament de superfícies, dissolucions de pesticides comercials i finalment, contaminants fenòlics.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA

En septiembre del año 2003, apareció publicado el *1º Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo (The World Water Development Report)*, que reunió a 23 agencias del sistema de las Naciones Unidas y a otras entidades interesadas en la temática del agua dulce, y que contó con valiosas aportaciones de diversos gobiernos. En su análisis de la situación sobre los Recursos Hídricos del Mundo, los diferentes expertos consultados en esta ambiciosa tarea comenzaron su exposición con un capítulo muy significativo *“La crisis mundial del agua”* y expusieron su preocupación con el siguiente argumento:

“La Tierra, con sus diversas y abundantes formas de vida, que incluyen a más de 6.000 millones de seres humanos, se enfrenta en este comienzo del siglo veintiuno con una grave crisis del agua. Todas las señales parecen indicar que la crisis está empeorando y que continuará haciéndolo, a no ser que se emprenda una acción correctiva. Se trata de una crisis de gestión de los recursos hídricos, esencialmente causada por la utilización de métodos inadecuados. La verdadera tragedia de esta crisis, sin embargo, es su efecto sobre la vida cotidiana de la población. La crisis pesa asimismo sobre el entorno natural, que cruje bajo la montaña de desechos que se vierten a diario y por el exceso de uso o uso indebido que de él se hace, con aparente desinterés por las consecuencias y por las generaciones venideras. En realidad, se trata fundamentalmente de un problema de actitud y de comportamiento, problemas en su mayoría identificables (aunque no todos) y localizables.”

Resolver la crisis del agua es, sin embargo, sólo uno de los diversos desafíos con los que la humanidad se enfrenta en este tercer milenio y ha de considerarse en este contexto. Aún así, de todas las crisis, ya sean de orden social o relativo a los recursos naturales con las que nos enfrentamos los seres humanos, la crisis del agua es la que se encuentra en el corazón mismo de nuestra supervivencia y la de nuestro planeta.

Aunque el agua es el elemento más frecuente en la Tierra, únicamente el 2,53% del total es agua dulce y el resto es agua salada. Aproximadamente las dos terceras partes del agua dulce se encuentran inmovilizadas en glaciares y al abrigo de nieves perpetuas. A la cantidad natural de agua dulce existente en lagos, ríos y acuíferos se agregan los 8.000 kilómetros cúbicos (km³) almacenados en embalses.

El ser humano extrae un 8% del total anual de agua dulce renovable y se apropia del 26% de la evapotranspiración anual y del 54% de las aguas de escorrentía accesibles. El control que la humanidad ejerce sobre las aguas de escorrentía es ahora global y el hombre desempeña actualmente un papel importante en el ciclo hidrológico. Si se suman las variaciones espaciales y temporales del agua disponible, se puede decir que la cantidad de agua existente para todos los usos está comenzando a escasear y ello nos lleva a una crisis del agua.

Por otro lado, los recursos de agua dulce se ven reducidos por la contaminación. Unos 2 millones de toneladas de desechos son arrojados diariamente en aguas receptoras, incluyendo residuos industriales y químicos, vertidos humanos y desechos agrícolas (fertilizantes, plaguicidas y residuos de plaguicidas). Aunque los datos confiables sobre la extensión y gravedad de la contaminación son incompletos, se estima que la producción global de aguas residuales es de aproximadamente 1.500 km³. Asumiendo que un litro de aguas residuales contamina 8 litros de agua dulce, la carga mundial de contaminación puede ascender actualmente a 12.000 km³.

En el *2º Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo*, presentado en marzo de 2006, bajo el título “El agua, una responsabilidad compartida” se refleja el hecho de que la mala calidad del agua y un abastecimiento no sostenible frenan el desarrollo económico nacional, y pueden tener efectos negativos sobre la salud y los medios de vida. En la actualidad, somos relativamente capaces de reconocer los impactos de la contaminación y el uso excesivo de las aguas superficiales y subterráneas sobre la calidad y cantidad del recurso. Nos encontramos, por tanto, en el momento preciso para crear programas específicos con el fin de reducir dichos impactos en los países en desarrollo.

Se ha avanzado notablemente en la comprensión de la naturaleza del agua y de su interacción con el entorno. Actualmente se poseen mejores estimaciones sobre los efectos de la contaminación en los recursos hídricos. Sin embargo, las presiones sobre el sistema hidrológico continental aumentan al ritmo del crecimiento demográfico y del desarrollo económico y se plantean graves retos frente a la falta progresiva de agua y a su contaminación. A mediados del presente siglo, 7.000 millones de personas en 60 países sufrirán escasez de agua, en el peor de los casos, y en el mejor se tratará de 2.000 millones de personas en 48 países.

El agua constituye una parte esencial de todo ecosistema, tanto en términos cualitativos como cuantitativos. Una reducción del agua disponible ya sea en la cantidad, en la calidad, o en ambas, provoca efectos negativos graves sobre los ecosistemas. El medio ambiente tiene una capacidad natural de absorción y de autolimpieza. Sin embargo, si se la sobrepasa, la biodiversidad se pierde, los medios de subsistencia disminuyen, las fuentes naturales de alimentos (por ejemplo, los peces) se deterioran y se generan costos de limpieza extremadamente elevados. Para medir el estado de salud de los ecosistemas se utilizan indicadores de la calidad del agua físico-químicos y biológicos, datos hidrológicos y evaluación biológica, incluyendo el grado de biodiversidad.

Sin embargo, no todas las aguas tienen las mismas características sino que dependen en gran medida de la actividad que genera los efluentes contaminados. En esta tesis se va a estudiar diferentes aguas residuales provenientes de sectores de gran importancia en la Comunitat Valenciana, como son las aguas agrícolas (plaguicidas), las provenientes de la industria de recubrimientos metálicos y efluentes de la industria agroalimentaria (fenoles del alpechín).

Contaminación Agrícola

El agua subterránea poco profunda es una importante fuente de agua de regadío, pero el exceso de bombeo de los acuíferos, la contaminación debida a sustancias agroquímicas y la extracción excesiva de aguas subterráneas fósiles presentan numerosos problemas. Los productos químicos agrícolas (fertilizantes y plaguicidas) constituyen en general una causa principal de contaminación del agua, mientras que los nutrientes de los abonos causan graves problemas eutróficos en aguas superficiales de todo el mundo (Baird, C. 1999).

La contaminación química de las aguas superficiales, principalmente debido a vertidos industriales y agrícolas, constituye también un gran riesgo para la salud en algunos países en vías de desarrollo. La agricultura está, cada vez más, bajo la mira de todos debido a la merma de los recursos hídricos y se ha visto presionada a reducir el nivel de impactos negativos que causa, sobre todo, los asociados al uso de fertilizantes y plaguicidas, así como el despilfarro de agua.

La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos años. El uso indiscriminado que se ha dado a estos compuestos ha provocado que en la actualidad se detecten residuos en el ambiente y se asocien con

riesgo potencial a la salud pública (Bandala, E. R. 1998). Debido a sus características químicas, la mayoría de los plaguicidas son contaminantes orgánicos persistentes (COP) que resisten de forma variable la degradación química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada (Albert, L.A. 1998). Se ha demostrado su presencia en todos los medios receptores (aire, agua y suelo) así como en todos los niveles tróficos, desde el plancton hasta grandes mamíferos. Estos compuestos se bioacumulan en numerosas especies y aumentan su potencial tóxico y contaminante a medida que se desplazan a través de las redes tróficas (Organización Mundial de la Salud, 1998).

Los informes de Naciones Unidas anteriormente mencionados, estiman que de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 1% alcanza los cultivos, mientras el resto termina contaminando principalmente el agua. Como estos contaminantes son habitualmente no biodegradables y sólo una pequeña cantidad de los residuos son tratados actualmente (por la carencia de tecnologías de tratamiento apropiadas disponible), existe un gran problema de acumulación. No obstante todas las características nocivas de estos compuestos, la venta de plaguicidas en todo el mundo aumenta sustancialmente cada año, principalmente en los países en vías de desarrollo. En concreto, en 1999, se han alcanzado las 23300 toneladas, en volumen, de insecticidas preparados solamente para uso agrícola (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI, 2000).

Otro ejemplo importante de los problemas relacionados con los plaguicidas se encuentra en las actividades de la agricultura intensiva, invernaderos, propias de los países industrializados. En el año 2000 se contabilizaron hasta unas 150000 hectáreas de invernaderos (Blesa, M.A. 2004) y se debe de tener en cuenta que esta actividad necesita aproximadamente unas 200 veces más plaguicidas que la agricultura tradicional. Así pues los problemas medioambientales asociados son una de las amenazas más críticas para el futuro de este sector, de relevancia económica importante en el mundo actual debido a la problemática del agua que afecta a la agricultura tradicional.

Contaminación Industrial

La industria es uno de los principales motores del crecimiento económico, especialmente en los países en vías de desarrollo. La Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sostenible, celebrada en Johannesburgo en 2002, propuso un Plan de Acción que establece una estrecha relación entre los objetivos de desarrollo industrial,

la erradicación de la pobreza y la gestión sostenible de los recursos naturales. Frenar la contaminación industrial significa mejorar la gobernabilidad medioambiental. Es posible disociar el desarrollo industrial de la degradación del medio ambiente, reducir drásticamente el consumo de recursos naturales y de energía y, al mismo tiempo, contar con industrias limpias y rentables.

Para que dicho desarrollo sea sostenible, es importante contar con las disposiciones legales e institucionales necesarias. Ya existe un gran número de iniciativas de gobernabilidad de este tipo, tanto a nivel nacional e internacional, como en el sector industrial y en las empresas. Algunos de los convenios internacionales y acuerdos medioambientales multilaterales más recientes y fundamentales relativos al uso industrial del agua y a los impactos de la contaminación son:

- El Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de desechos peligrosos y su eliminación (Convenio de Basilea, 1989). Este convenio provee un mecanismo internacional regulador de la generación, traslado, gestión y eliminación de residuos.
- El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) (Convenio de Estocolmo, 2001), que regula la producción, manipulación, transporte y uso de ciertas sustancias químicas orgánicas de alta toxicidad que permanecen intactas en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo y que se dispersan por extensas áreas geográficas.
- La Directiva Marco del Agua de la Unión Europea (Directiva 2000/60/CE, 2000), relativa a la gestión integrada de cuencas hidrográficas en Europa. La Directiva coordina los objetivos de la política europea del agua y protege el agua en todas sus formas, ya se trate de aguas superficiales o subterráneas. La Directiva, basada en la gestión por cuenca hidrográfica, también incorpora la Directiva relativa a la Prevención y al Control Integrados de la Contaminación (IPPC, por sus siglas en inglés), destinada a aquellas plantas industriales que registran un elevado potencial de contaminación.

En vista de estos problemas y a fin de hacer frente a ellos, muchos países han adoptado el principio por el cual “el que contamina paga” o de precaución (Directiva 2004/35/CE, 2004), pero por otro lado suelen ser reticentes a obstaculizar el rendimiento industrial o económico o bien simplemente carecen de recursos para controlar y hacer cumplir los reglamentos.

Los acuerdos destinados a frenar la contaminación industrial del agua deben reflejarse en las políticas nacionales para que sean realmente efectivos. Las medidas reguladoras y económicas son necesarias para la gestión del agua a nivel local, regional y nacional. Éstas, son esenciales para seguir mejorando la productividad industrial del agua y reducir su contaminación. Dentro del propio sector industrial, se están haciendo esfuerzos para controlar la contaminación. En la última década, hubo un aumento exponencial en todo el mundo del número de empresas del sector industrial que trataron de obtener la certificación ISO 14001, norma medioambiental de carácter internacional, poniendo en marcha sistemas de gestión ambiental donde sus vertidos son gestionados mediante una evaluación del ciclo de vida.

Cuando está en juego la calidad del agua, el vertido cero de efluentes debería ser el objetivo último de las empresas y las municipalidades (Directiva 1999/31/CE, 1999). El vertido cero de efluentes implica el reciclado del agua y la recuperación de todos los residuos, evitando el vertido de sustancias contaminantes al medio ambiente acuático. En el caso de que no resulte ni técnica ni económicamente factible, existe toda una serie de buenas prácticas intermedias que se pueden aplicar en las fábricas para reducir el impacto industrial sobre la calidad del agua. Estas incluyen:

- .- la evaluación de procesos de producción menos contaminantes;
- .- la Transferencia de Tecnologías Ecológicamente Racionales (estrategia promovida por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, ONUDI);
- .- la separación de los distintos flujos de aguas residuales para evitar la mezcla de sustancias contaminantes;
- .- la recuperación de las materias primas y la energía a partir de los residuos;
- .- la selección de tecnologías óptimas para el tratamiento de las aguas residuales.

Las aguas residuales industriales presentan características muy diferentes, dependiendo no sólo de las diversas clases de industrias que las generan, sino que varían incluso dentro de la misma industria. También son muy distintas las características de estas aguas residuales comparadas con las de aguas residuales domésticas muy semejantes en su composición, tanto cualitativa como cuantitativamente, dependiendo únicamente de la alimentación y del nivel de vida, higiene, etc. Esto hace que exista el peligro de simplificar el problema, intentando generalizar, y aplicar a las aguas residuales industriales las técnicas que se utilizan y están estudiadas para las aguas residuales de las poblaciones. El tratamiento de

aguas industriales es, por tanto, un problema complejo, debido a la gran variedad de compuestos y posibles concentraciones de los mismos.

En particular, el sector metal-mecánico engloba una gran diversidad de actividades productivas, que van desde la fundición a las actividades de transformación y soldadura o el tratamiento químico de superficies. Según el Instituto Mediterráneo por el Desarrollo Sostenible (IMEDES) su peso en la economía de la Comunidad Valenciana tanto en términos de creación de valor añadido como de empleo, es muy significativo, situándose en porcentajes en torno al 5% en VAB y algo más respecto a su contribución a la generación de empleo. Durante los años 80 y principios de los 90, el sector ha asistido a un profundo proceso de reconversión como consecuencia del cambio en los parámetros competitivos y la mayor apertura exterior de la economía española (Imedes).

Los aspectos medioambientales significativos varían con los subsectores de actividad, si bien la problemática de las aguas residuales industriales y de los residuos, algunos de elevada peligrosidad, es un aspecto común a todos ellos.

Las empresas del sector de recubrimientos metálicos presentan una incidencia medioambiental por emisiones atmosféricas, vertidos de aguas residuales y generación de residuos peligrosos. Los principales problemas medioambientales de la industria de tratamiento de superficies son los altos consumos de agua y electricidad y la generación de altos volúmenes de efluentes y lodos de la depuración de las aguas residuales de proceso. La incidencia medioambiental de los talleres de recubrimientos metálicos, a pesar del reducido tamaño de la mayoría de ellos, se centra fundamentalmente, en el vertido de aguas residuales y la generación de residuos peligrosos.

Según se indica desde el Instituto Mediterráneo por el Desarrollo Sostenible (IMEDES) las principales materias primas utilizadas en las actividades de recubrimientos metálicos son las propias piezas a recubrir y los productos químicos empleados en la formulación de los baños de pretratamiento y recubrimiento de las piezas. La cantidad de productos químicos empleados en estas industrias es muy variable y dependen del material a recubrir, la tecnología utilizada y el producto final que se desea obtener. Los reactivos más frecuentes son:

- Ácidos: clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, bórico, nítrico, etc.
- Alcalis: hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoníaco, etc.
- Sales metálicas ácidas y alcalinas: sulfatos, carbonatos, fosfatos, cloruros, cianuros, etc.
- Óxidos metálicos
- Disolventes.
- Tensioactivos.
- Productos auxiliares: humectantes, enmascarantes, inhibidores, abrillantadores, etc.

La mayoría de estos productos son sustancias peligrosas, tóxicas, persistentes y bioacumulables, lo que supone unas estrictas medidas de Seguridad e Higiene en el trabajo, dada la cantidad de productos manipulados.

La contaminación de las aguas es el aspecto medioambiental más importante de las actividades de tratamiento y revestimiento de metales. Se debe fundamentalmente al vaciado de los baños de procesos agotados o contaminados y a las funciones de enjuague de las piezas entre baños de proceso consecutivos, dado que se produce un arrastre de los reactivos del baño al quedar depositados sobre la pieza.

Los procesos de recubrimiento metálico generan dos tipos de efluentes principales (Imedes, 2000. <http://www.ecoempleo.com/Estudios/SectoresIndustriales/capitulo4>):

- Efluentes discontinuos y muy concentrados (elevadas cargas contaminantes en volúmenes relativamente pequeños) procedentes del vaciado de baños de proceso agotados.
- Efluentes continuos y muy diluidos (poca carga contaminante en grandes caudales de agua) procedentes de los enjuagues o lavados de piezas entre etapas consecutivas.

Contaminación de la industria agroalimentaria (alpechin)

En este contexto de creciente preocupación por el tratamiento de los residuos industriales cabe situar el problema de los alpechines, esto es, las aguas procedentes de la producción de aceite de oliva. La almazara ha constituido una de las industrias tradicionales en la Comunidad Valenciana, si bien durante el último siglo ha disminuido fuertemente su importancia debido a la sustitución del cultivo del olivo por el naranjo

en las zonas costeras de esta comunidad. Así y todo, existen alrededor de 300 plantas, que producen alrededor de 12000 toneladas de aceite por año (Subirats Huerta S. y col., 1993). Esta producción está concentrada en las comarcas interiores, como son l'Alcoià y el Comtat. En la composición de los alpechines existe una elevada concentración de ácidos fenólicos, algunos de los cuales están considerados como residuos tóxicos y peligrosos (Callahan, M.A. y col., 1998).

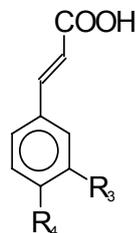
Los alpechines están constituidos por la fase acuosa formada en el proceso de obtención del aceite de oliva. Constan tanto de las aguas de vegetación de las aceitunas, como de las aguas empleadas en el lavado y en el proceso de extracción del aceite. En los países mediterráneos, la contaminación provocada por el alpechín destaca por su gravedad, siendo el volumen producido de hasta 10 millones de metros cúbicos por año (Fiestas Ros de Ursinos, J.A. y col., 1992). La composición es muy variable y depende mucho del sistema empleado en la obtención del aceite. Un análisis detallado de los distintos tipos de componentes orgánicos se muestra en la Tabla 1.1.

compuesto	Concentración (%)
Grasas	0.02-1.0
Proteínas	1.2-2.4
Azúcares	2-8
Polialcoholes	1-1.5
Pectinas	0.5-1.5
Taninos y polifenoles	0.5-1
Otros	0.5-1.5

Tabla 1.1. Principales componentes orgánicos del alpechín.

El contenido en fenoles es variable, con valores que oscilan entre los 3 y los 10 g/l. Estos valores dependen tanto del tipo de aceituna, como del periodo de maduración (disminuyen conforme avanza la campaña). El contenido en fenoles supera claramente los 500 ppm de polifenoles, cantidad a partir de la cual se considera que las aguas son difíciles de biodegradar (García García, P. y col., 1989), debido al carácter microbicida de los polifenoles.

Los fenoles presentes en las aceitunas se pueden dividir, según su estructura, en varios grupos (Vázquez Roncero, A. y col., 1974 y Ryan, D. y col., 1998); las estructuras de los principales se muestran a continuación (Tabla 1.2. y Figura 1.1).



R ₃	R ₄	ácido
H	H	cinámico
H	OH	p-cumárico
OH	OH	cafeico
OMe	OH	ferúlico

Figura 1.1 Estructura Química del
Ácido Cinámico

Tabla 1.2. Compuestos derivados del ácido
cinámico (estructura es C₆-C₃).

La reutilización de las aguas residuales es de vital importancia para el mantenimiento de los recursos hídricos. Las aguas residuales constituyen una importante fuente de agua de riego, ya que aproximadamente el 10% del total de las tierras de regadío de los países en desarrollo se utiliza este recurso. Esto beneficia directamente a los agricultores donde el agua es escasa, puede mejorar la fertilidad del suelo y reducir la contaminación de las aguas receptoras corriente abajo.

Aunque las aguas residuales deberían recibir tratamiento para ser utilizadas como agua de riego, en países de bajos ingresos se usan frecuentemente en forma directa, sin tratar, con los riesgos que ello comporta en términos de exposición de trabajadores y consumidores a parásitos bacterianos, amebidos, virales y nematodos, así como a contaminantes orgánicos, químicos y de metales pesados. Las cosechas cultivadas con aguas residuales sin tratar no pueden exportarse y su acceso a los mercados locales está restringido, al menos parcialmente.

1.2.- PROCESOS DE TRATAMIENTO CONVENCIONALES DE AGUAS RESIDUALES

Como se ha dicho en el apartado anterior, a principios del siglo XXI, el problema de agua se considera como una importante amenaza. La escasez o carencia del agua afecta a más del 40 por 100 de la población mundial debido a razones políticas,

económicas y climatológicas. Además, más del 25 por 100 de la población mundial sufre problemas de salud e higiénicos a causa del agua. A pesar de los planes llevados adelante por la ONU en recientes años, 1100 millones de personas no tienen aún acceso a una mejora en el abastecimiento de agua y en el sanitario, especialmente concentrados en países subdesarrollados de África, Asia y América Latina (Baird, C., 1999).

De otro lado, el uso doméstico y la actividad industrial, de gran impacto especialmente entre los países desarrollados, genera una gran producción de aguas residuales, las cuales causan un efecto directo sobre el medio ambiente de sus alrededores. Este hecho, unido a la necesidad de reutilizar el agua para nuevos usos, hace esencial proceder a la purificación de las aguas para conseguir el deseado grado de calidad. Debido al incremento de interés social y político por el respeto al medio ambiente, las líneas de investigación en la purificación del agua han tenido un gran crecimiento en las últimas décadas (Baird, C., 1999)

La eliminación de los contaminantes presentes en las aguas subterráneas de mares, ríos y lagos, el control de la calidad del agua y la regulación frente al riesgo que provoca la contaminación son controlados de forma estricta en muchos países. Más recientemente, una reflexión sobre una nueva conciencia del medio ambiente, la Directiva Europea 2000/60/CE, fuerza la necesidad de adoptar medidas contra la polución del agua, encaminadas a conseguir una reducción progresiva de los contaminantes.

Aunque la industria es el principal productor de agentes contaminantes, los consumidores también originan una degradación de medio ambiente: plaguicidas, fertilizantes, detergentes y otros son arrojados directamente sin depuración o a través de vertederos en algunas ocasiones incontrolados o elegidos inadecuadamente. Como consecuencia de todo esto más de 700 compuestos potencialmente peligrosos han sido identificados en efluentes y conducciones de agua. También hay que indicar que muchos compuestos pueden transformarse en sustancias potencialmente peligrosas durante el proceso de tratamiento de aguas, particularmente por halogenación, como es el caso de formación de organoclorados.

El proceso de gestión de un residuo industrial, desde el momento de su generación, consta de las siguientes fases (Figura 1.2):

- Recopilación de datos, consistente en una caracterización del residuo.
- Estudio de las alternativas de gestión posibles y tecnologías de tratamiento existentes. Determinación de cual es la más adecuada al caso que se esté tratando.
- Minimización. En muchas ocasiones suele ser posible realizar un proceso intermedio de minimización del problema previo al tratamiento, mediante alguna de los siguientes procedimientos:
 - Reducción de residuos en la industria o planta donde se producen.
 - Separación y caracterización de los residuos.
 - Recuperación de materia y energía.
- Tratamiento y eliminación. Finalmente, una vez analizado y minimizado el problema, así como elegida la tecnología o tecnologías idóneas para el tratamiento del residuo, se ha de proceder a eliminar completamente cualquier aspecto de toxicidad del mismo, logrando que el residuo final, exento de las características nocivas que tenía anteriormente, pueda entonces ser eliminado mediante vertido.

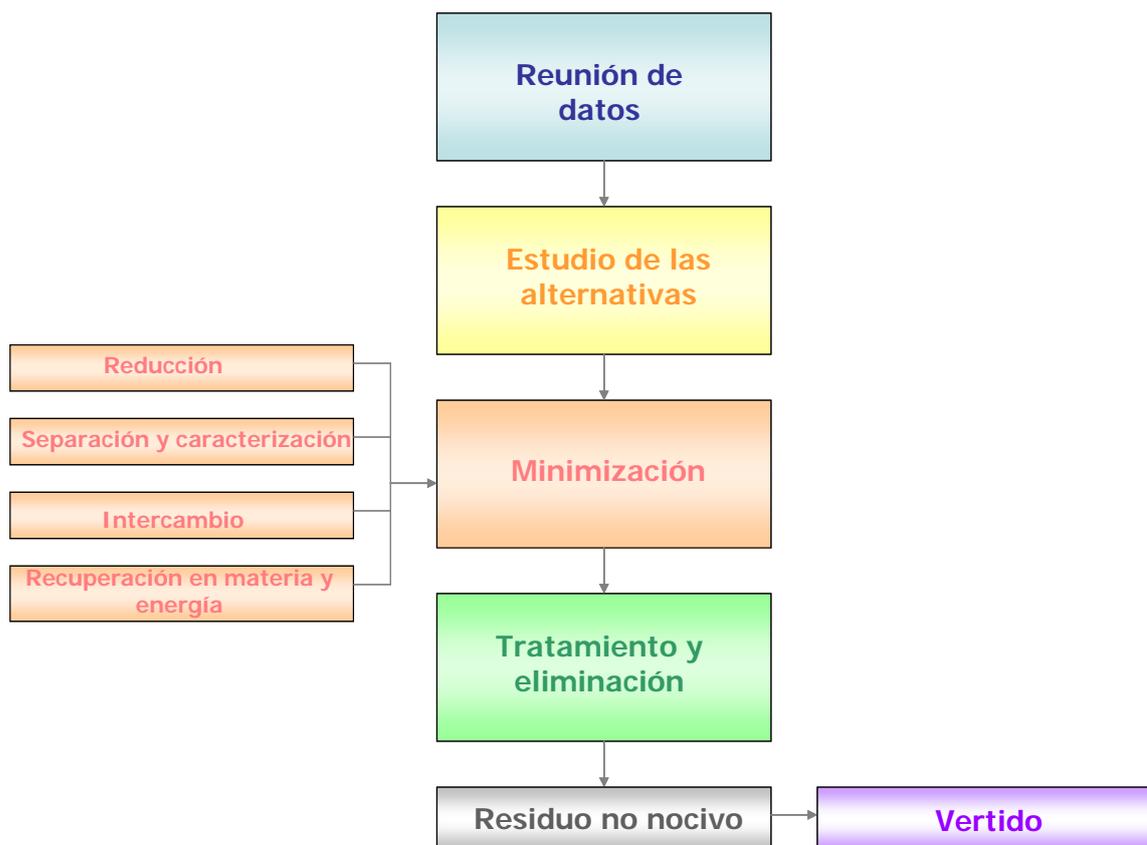


Figura 1.2. Gestión de un residuo industrial

Para llevar a cabo este último punto se dispone en la actualidad de una amplia gama de tecnologías denominadas tradicionales y/o convencionales que, sin embargo, muchas veces se muestran claramente insuficientes o dan lugar a un costo adicional elevado. En la práctica, la aplicación de los métodos de tratamiento debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes a tratar. Las aguas contaminadas por la actividad humana pueden, en general, ser procesadas eficientemente por plantas de tratamiento biológico, por adsorción con carbón activado u otros absorbentes, o por tratamientos químicos tradicionales.

Algunas de las diferentes técnicas tradicionales más empleadas hoy en día para el tratamiento de residuos son las que se detallan a continuación (Blesa, M.A., 2004).

- *Tratamientos Físicos* que se basan en provocar un cambio físico en las propiedades de los contaminantes, donde las técnicas que se utilizan son las siguientes:
 - Arrastre por aire
 - Adsorción por carbón
 - Centrifugación
 - Destilación
 - Electrodialisis
 - Evaporación
 - Filtración
 - Floculación
 - Flotación
 - Intercambio iónico
 - Destilación por vapor
 - Adsorción en resina
 - Osmosis inversa
 - Sedimentación
 - Extracción Líquido-Líquido
 - Arrastre por vapor.
 - Ultrafiltración
 - Cristalización por congelación

- *Tratamientos Químicos* que modifican las propiedades químicas de los contaminantes. Se intenta la destrucción química del contaminante o la conversión del mismo en otro producto que sea fácilmente separable, empleando las siguientes técnicas:
 - Clorólisis
 - Estabilización química
 - Hidrólisis
 - Neutralización
 - Ozonólisis
 - Precipitación
 - Electrólisis
 - Catálisis
 - Descarga de microondas
 - Oxidación
 - Fotólisis
 - Reducción

- *Tratamientos Biológicos.* Son los más económicos y son válidos para muchos compuestos y residuos industriales considerados como peligrosos, pero no son útiles para los que por su propia naturaleza son tóxicos para los microorganismos, ya que esta situación inutiliza totalmente el posible tratamiento. Estos tratamientos suelen ir precedidos por un tratamiento físico y/o químico.
 - Balsas de estabilización de residuos
 - Digestión anaeróbica
 - Lodos activados
 - Tratamiento enzimático
 - Compostaje
 - Lagunas aireadas
 - Filtros percoladores

En la actualidad estos tratamientos se han extendido en un gran número de empresas de muchos sectores industriales importantes en la Comunidad Valenciana, como por ejemplo en la Industria Textil (Crespi, M., 1994), y es la más recomendable para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales en general (Metcalf, E., 2003). Procesos como el Biorreactor de membrana (BRM) están mejorando considerablemente los tratamientos biológicos (Adham, S. y col. 2005). Incorporan membranas de microfiltración e ultrafiltración y eliminan el decantador secundario de un proceso biológico convencional, con lo que permiten mejorar el control de la actividad biológica y operar a mayores cargas orgánicas (Cicek, N. 2003). Otras tecnologías de tratamientos biológicos utilizadas como el Reactor Batch secuenciado (SBR) también está siendo ampliamente utilizado en la actualidad, ya que proporciona mayor flexibilidad en el proceso biológico (Fitzgerald, K. S., 2005).

Sin embargo, en algunos casos como aguas residuales de industrias de recubrimientos metálicos (con altos contenidos en cianuros), así como aquellas que contengan plaguicidas, estos procedimientos resultan inadecuados pues la toxicidad de esta agua es muy elevada, produciendo la eliminación total o parcial de la flora bacteriana y la inutilización del proceso biológico.

El empleo de tratamientos biológicos para la depuración de los alpechines se encuentra con el problema de la presencia de elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, tóxicos, inhibidores o refractarios a la acción de la mayoría de los microorganismos. Una posibilidad sería diluir los alpechines en una gran proporción de modo que la concentración de fenoles descienda. También se les puede someter a un tratamiento físico sencillo como puede ser la congelación, destilación, filtración o ultrafiltración (Hamdi, M. y col., 1992).

Se pueden utilizar también tratamientos aerobios utilizando fangos activos que han sido previamente aclimatados a los alpechines (Maestro Duran, R. y col., 1991), o bien empleando microorganismos especiales como el *Aspergillus terreus*, capaz de degradar los compuestos fenólicos del alpechín (Martínez Nieto, L. y col., 1992). Por último, es posible el empleo de tratamientos anaerobios con la producción de metano entre otros compuestos orgánicos (Beccari, M. y col., 1999).

En estos casos y cada vez más crecientemente, se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías Avanzadas de Oxidación (TAOs) o Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs), muchas veces nombradas por sus siglas en inglés AOPs (Advanced Oxidation Processes). La mayoría de estas tecnologías pueden aplicarse a la detoxificación de aguas con problemas de toxicidad y biodegradabilidad, generalmente en pequeña o mediana escala. Pueden usarse solas o combinadas entre ellas o como tratamientos previos a los métodos convencionales, pudiendo ser aplicadas además de a las aguas, también a contaminantes que se encuentran en el aire y en el suelo. Los Procesos Avanzados de Oxidación han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas, y han suscitado gran interés en la comunidad científica internacional. Se investigan tratamientos con todo tipo de oxidantes: ozono, peróxidos, procesos Fenton, fotocatalisis, etc.

1.3.- PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN APLICADOS AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Como se ha dicho en puntos anteriores, los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) son procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes (Legrini, O. y col., 1993; Bolton, J. R. y col., 1994; Gogate, P. R. y col., 2004a). El concepto fue inicialmente establecido por Glaze y sus colaboradores (Glaze, W. H y col., 1987), quienes los definieron como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo OH^{\bullet} . Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos, incluida la luz solar (Malato y col., 2003) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica.

Algunos PAOs, como la fotocatalisis heterogénea, la radiólisis y otras técnicas avanzadas, son también capaces de generar reductores químicos que permiten

realizar transformaciones en contaminantes tóxicos difíciles de oxidar, como iones metálicos o compuestos halogenados (Blesa, M. A. y col., 2004). Los PAOs pueden clasificarse en función de la necesidad de la participación de la luz como, procesos no fotoquímicos, y procesos fotoquímicos.

Procesos no fotoquímicos:

- Ozonización.
- Ozonización con H_2O_2/O_3 .
- Procesos Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) y relacionados.
- Oxidación electroquímica.
- Radiólisis y tratamiento con haces de electrones.
- Plasma no térmico.
- Descarga electrohidráulica y ultrasonidos.
- Oxidación en agua sub/y supercrítica.

Procesos fotoquímicos:

- Ultravioleta de vacío.
- UV/ H_2O_2 .
- UV/ O_3 .
- Foto-Fenton y relacionadas.
- Fotocatálisis heterogénea con semiconductores.
- Empleo de sensibilizadores orgánicos o complejos de metales de transición.

Además de los incluidos en la lista, otros métodos oxidativos, como la oxidación electroquímica (Flox C. y col., 2006), podría incluirse entre los PAOs, aunque generalmente se les considere un grupo aparte. Otras tecnologías que pueden incluirse también entre las PAOs son los tratamientos con barreras permeables reactivas de Fe metálico (Deng, B. y col., 1999; Deng, N. y col., 2000) y la Oxidación con K_2FeO_4 (Sharma, V. K. y col., 2004).

Algunas de las ventajas de estas nuevas tecnologías sobre los métodos convencionales se indican a continuación:

- Transforman químicamente el contaminante en otra especie menos tóxica y más biodegradable, llegando en algunos casos a su total mineralización.
- No hay generación de fangos que requieran tratamiento y/o eliminación.
- Emplean como reactivos unas sustancias baratas y no tóxicas.
- Permiten transformar los contaminantes recalcitrantes en productos tratables por métodos más económicos como el tratamiento biológico (Acher, A. y col., 1990).
- Generalmente mejoran las propiedades organolépticas del agua tratada.
- Son útiles para disminuir la concentración de compuestos formados por pre-tratamientos alternativos, como la desinfección (Milow, B. y col., 1999)

A partir de las características anteriores se puede deducir que los PAOs son especialmente útiles como pretratamiento antes de un tratamiento biológico para contaminantes resistentes a la biodegradación (Mantzavinos D. y col., 2004) o como proceso de postratamiento para mejorar las características de las aguas antes de su vertido a los cuerpos receptores (Scott, J. P. y col., 1995; Bandala, E. R. y col., 1998).

Como se ha indicado anteriormente, la eficiencia de estas técnicas es debida en gran medida a la participación de los radicales hidroxilos. Esto provoca que los procesos involucrados sean termodinámicamente más favorables y presenten una alta velocidad de oxidación; el radical hidroxilo es capaz de atacar prácticamente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar $10^6 - 10^{12}$ veces más rápido que oxidantes alternativos como el ozono (Vidal, A. y col., 1994). Para apoyar lo expuesto en el párrafo anterior se muestran algunos datos bibliográficos. La Tabla 1.3 presenta potenciales de oxidación de distintas especies (Baird, C., 1999), mostrando que después del flúor, el HO[•] es el oxidante más energético. De todas formas, hay que indicar que actualmente se sabe que no en todos los PAOs se generan radicales hidroxilo y que en otros casos, estos no son la única especie oxidante implicada en el proceso (Pignatello, J. J. y col., 1999).

Especie	E^0 (V,25°C)¹
Flúor	3,03
Radical hidroxilo	2,80
Oxígeno atómico	2,42
Ozono	2,07
Peróxido de hidrógeno	1,78
Radical perhidroxilo	1,70
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Yodo	0,54

Tabla 1.3- Potenciales redox de algunos oxidantes

¹ Potenciales expresados con relación al Electrodo Normal de Hidrógeno (ENH)

Los PAOs tienen actualmente un grado de desarrollo y comercialización variado y en constante cambio, motivo de estudio para esta tesis. Mientras que algunas técnicas como la ozonización en medio alcalino están total o parcialmente comercializadas (Masschelein, M.J., 1991), en cambio otros procesos potencialmente más interesantes por su economía de recursos energéticos como es la fotocatalisis solar se encuentran en una fase incipiente de comercialización (Blanco-Gálvez, J. y col., 2007)

1.3.1.- PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS

Las tecnologías avanzadas de oxidación no fotoquímicas originan especies muy reactivas, principalmente el radical hidroxilo, a través de la transformación de especies químicas o mediante la utilización de distintas formas de energía, a excepción de la irradiación luminosa. Como se ha indicado anteriormente, existen una gran variedad de métodos, entre los que cabe indicar aquellos que utilizan ultrasonidos (Adewuyi, Y.G., 2001), el uso de hierro cero-valente (Bremner y col., 2006) o radiaciones ionizantes (Drzewicz P. y col., 2004), que están empezando a ser utilizados ampliamente en la actualidad.

Los que utilizan Ozono como oxidante, bien en medio alcalino (Glaze y col., 1987) bien junto con el peróxido de hidrógeno (Staehelein J. y col., 1982), son bastante eficientes tanto para aguas potables (incluida la propia desinfección) como para tratar aguas residuales que contengan contaminantes recalcitrantes como los plaguicidas (Ikehata, K. y col., 2005). Sin embargo no siempre puede eliminarse totalmente la carga orgánica original y se ha detectado la formación de numerosos subproductos hidroxilados residuales (Langlais B., y col., 1991). Algunas desventajas evidentes de estos tratamientos son, desde el punto de vista operacional y de ingeniería, la necesidad de una buena transferencia de la fase gaseosa a la acuosa del oxidante a través de una eficiente agitación y una relación molar bastante alta (mayor que 5:1) (Ormad, P. y col., 1997).

Otro método muy empleado es el reactivo de Fenton y procesos similares ("Fenton-like" en inglés), consistente en el uso de sales de hierro y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, este método se ve fuertemente potenciado por la radiación en el UV e incluso el visible (foto-Fenton), por lo que se tratará en el apartado relacionado con los métodos fotoquímicos.

Finalmente, los otros procesos no fotoquímicos como la Radiólisis γ y procesos con haces de electrones, el Plasma no térmico, la Descarga electrohidráulica con Ultrasonido (Cavitación Electrohidráulica) y la Oxidación en agua sub/y supercrítica (WAO y CWAO) presentan un elevado coste de instalación y de mantenimiento, por lo que su uso se está aplicando preferentemente a residuos muy especiales.

1.3.2- PROCESOS FOTOQUÍMICOS

La excelente capacidad de los radicales hidroxilos para oxidar compuestos orgánicos sugiere también la utilidad de estudiar su generación fotoquímica. Los procesos fotoquímicos ofrecen muchas ventajas en el tratamiento de aguas y efluentes que no se limitan al aprovechamiento del HO^\bullet como oxidante (Gogate, P.R. y col., 2004 a; 2004b;).

Sin embargo la eficiencia de la eliminación fotoquímica de un determinado compuesto puede alterarse drásticamente en función del diseño del reactor (tipo de lámpara, geometría, hidrodinámica, etc.), lo que incide sobre el consumo de energía eléctrica y los costos (Blanco, J. y col., 1999). Los PAOs fotoquímicos no son adecuadas para procesar mezclas de sustancias de elevada absortividad, o con altos valores de sólidos en suspensión, pues la eficiencia cuántica disminuye por pérdida de luz, por dispersión y/o absorción competitiva (Gogate, P.R. y col., 2004a; 2004b).

La Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV) aprovecha la irradiación a longitudes de onda menores de 190 nm (UV-C) para obtener la mineralización de contaminantes resistentes como el plaguicida atrazina (González, M.C. y col., 1994 y 1995; Fung, P.C. y col., 1999; Braun y col., 2004). Sin embargo, requiere suministrar oxígeno, utilizar material de cuarzo y una fuente de alta potencia, lo que encarece los costes.

La radiación UV-C ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de aguas residuales (Legrini y col., 1993). Los procesos UV/ H_2O_2 así como los UV/ O_3 son procesos fotoquímicos muy útiles para la potabilización de aguas y el tratamiento de aguas altamente contaminadas (Pera-Titus y col., 2004; Gogate P. y col., 2004a). También puede utilizarse la combinación UV/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ (Glaze W.H. y col, 1987).

Algunos procesos fotoquímicos son capaces de actuar en la región UV-A y visible del espectro electromagnético; esto significa que pueden aprovechar de manera eficiente la luz solar que llega a la superficie terrestre, con las ventajas económicas y ecológicas que esto conlleva.

La radiación que proviene del sol posee una potencia de $1.7 \cdot 10^{14}$ kW, casi 30000 veces la potencia consumida en todo el mundo. El espectro de longitudes de onda que llegan a la alta atmósfera se encuentra entre 200 y 50000 nm, pero la absorción de los diversos compuestos presentes en la atmósfera como el dióxido de carbono, ozono, oxígeno y vapor de agua, reducen la radiación que llega a la superficie de la Tierra a un intervalo entre 290 y 3000 nm, según se puede ver en la Figura 1.3 (Malato, S. 1999).

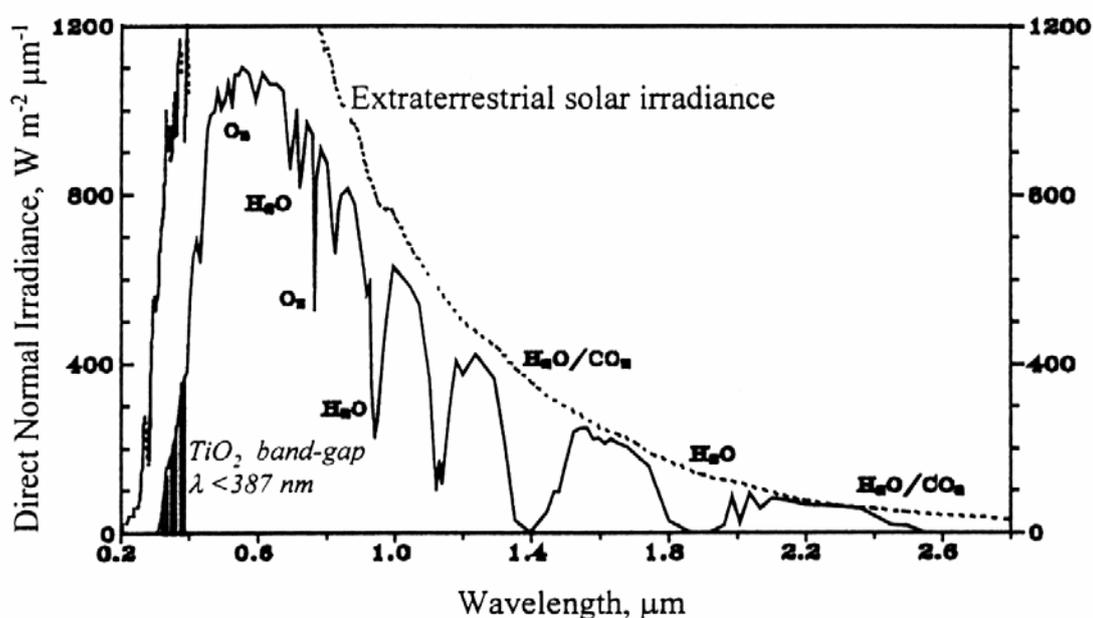


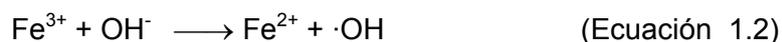
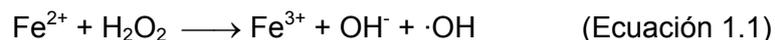
Figura 1.3. Espectro de la radiación solar en la superficie de la tierra

Entre los procesos de oxidación avanzada que son capaces de utilizar la luz solar, los más utilizados se pueden incluir dentro de 3 grandes grupos (Malato S. y col., 2003, Blanco-Gálvez J. y col., 2007):

- a) Proceso foto-Fenton y similares
- b) Sólidos semiconductores
- c) Fotosensibilizadores orgánicos

1.3.2.A.- REACTIVO DE FENTON Y PROCESOS FOTOFENTON

El reactivo de Fenton consiste en el uso de una mezcla de sales de hierro (II) y peróxido de hidrógeno (Pignatello J.J. y col., 1999 y 2006). Aunque el mecanismo no está completamente elucidado, se cree que las sales de hierro descomponen el agua oxigenada según un mecanismo catalítico, formando radicales hidroxilo (Ecuaciones 1.1 y 1.2)



La reacción de reducción del Fe(III) es muy lenta, lo que representa una pérdida de eficiencia del proceso. Para acelerar el proceso se puede irradiar la disolución (Ecuación 1.3), con lo que el proceso pasa a ser foto-Fenton (Kim, S.M. y col., 1998; Bossmann, S.H. y col., 1998). El pH óptimo de esta última reacción está próximo a 3 ya que es aquí donde se alcanza la mayor concentración de la principal especie fotoactiva, el $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ (Bossmann, S.H. y col., 1998); al absorber en el rango 290-410 nm, la radiación solar también puede ser empleada para acelerar el proceso.



Hay que mencionar que se han presentado algunos trabajos en donde se menciona la aparición de iones ferratos y ferrilos (+IV y +V respectivamente) formando complejos intermedios en las reacciones de los procesos foto-Fenton (Bossmann, S.H. y col., 1998; Pignatello, J.J. y col., 1999).

También cabe indicar que algunos autores han descrito importantes efectos negativos, en presencia de iones carbonato y fosfato, en la reacción Fenton aunque la presencia de otros iones como cloruros o sulfatos no afectan de modo tan significativo (Kiwi, J. y col., 2004; De Laat, J. y col., 2004; Maciel, R. y col., 2004).

La reacción foto-Fenton se introdujo a principio de los 90 como tecnología de tratamiento de aguas residuales (Lipczynska-Kochany, E. 1991; Sun, Y. y col., 1993b; Kiwi, J. y col., 2004). Más tarde fue aplicada en aguas que contenían diferentes contaminantes, como plaguicidas (Fallamann, H. y col., 1999; Huston, P.L. y col., 1999; Malato, S. y col., 2003; Hincapié, M.M. y col., 2005), clorofenoles (Pera-Titus, M. y col., 2004), contaminantes fenólicos (Herrera, F. y col., 1998; Gernjak, W. y col.,

2003), productos farmaceuticos (Pérez-Estrada, L. y col., 2005; Arslan-Alaton, I. y col., 2004), efluentes textiles (Yu, G. y col., 1998), industria papelera (Pérez M. y col., 2002; Yeber M.B. y col., 1999; Mansilla H. y col., 1997; Miranda M.A. y col., 2004) etc. También ha sido utilizada en aguas con elevados contenidos orgánicos, del orden de 10-20 g/L de carbono orgánico total (Sigman, M.E. y col., 1997).

Además del proceso de Fenton clásico, existen otros métodos muy relacionados, llamados procesos tipo Fenton (o Fenton-like en inglés). La modificación más simple consiste en cambiar el estado de oxidación del hierro (Miranda, M.A. y col., 2004) añadiendo a la disolución sales de Fe(III), pero en otros casos se puede cambiar también el catión empleado otros cationes como Cu^{2+} o Cr^{3+} , que son capaces de producir reacciones similares a las descritas para el hierro (Ciesla, P. y col., 2004)

1.3.2.B.- PROCESOS FOTOCATALÍTICOS CON SEMICONDUCTORES

La fotocatalisis heterogénea pertenece al grupo de los denominados procesos avanzados de oxidación, englobándose dentro del grupo de procesos fotoquímicos, siendo en la actualidad una de las más utilizadas para la eliminación de la práctica mayoría de contaminantes orgánicos que aparecen normalmente disueltos en agua.

Los primeros estudios acerca de la eliminación de contaminantes en fase acuosa y gaseosa, que utilizan estos procedimientos se deben al científico Carey y aparecen las primeras publicaciones en el año 1976 (Carey, J.H. y col., 1976). Durante los años posteriores, la comunidad científica no parece demostrar mucho interés debido a la falta de aplicaciones concretas. Es ya en 1988 cuando Al-Ekabi (Al-Ekabi, H. y col., 1988) plantea la posibilidad del empleo de estos procedimientos para la eliminación de contaminantes del agua, siendo un éxito estas primeras experiencias que se presentan.

El grupo de fotocatalizadores más empleados hasta el momento son los compuestos semiconductores (Hoffmann, M.R. y col., 1995). Estos compuestos, según la teoría de bandas, poseen una banda totalmente ocupada (banda de valencia) y otra banda vacía (banda de conducción) separadas por un salto energético del orden del electronvoltio (Figura 1.4), de modo que un pequeño aporte energético puede permitir el paso de un electrón desde la banda de valencia a la de conducción.

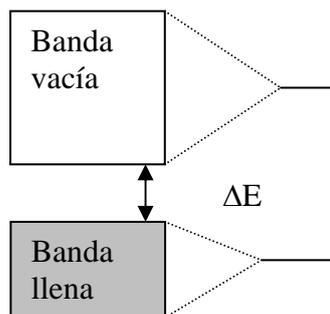
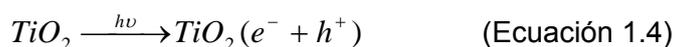


Figura 1.4. Teoría de bandas de un semiconductor

Aunque se han utilizado diferentes semiconductores como fotocatalizador, como el óxido de zinc o el sulfuro de cadmio (Yeber M.C. y col., 2000), entre ellos destaca especialmente el óxido de titanio, TiO_2 . Este es un sólido blanco insoluble en agua, presente en dos formas alotrópicas, anatasa y rutilo (Greenwood, N.N. y col., 1994), y capaz de absorber las longitudes de onda por debajo de los 385 nm; es decir, el TiO_2 absorbe la fracción UV de la radiación solar que llega a la superficie terrestre. Esta radiación solar es capaz de provocar un salto electrónico desde la banda llena a la vacía, ocasionándose de este modo un hueco en la banda de valencia capaz de aceptar un electrón (h^+) y un electrón en la banda de conducción (e^-) que puede ser fácilmente cedido (Ecuación 1.4), pudiendo participar tanto los electrones como los huecos en la oxidación o en la generación de especies activas como el anión superóxido o el radical hidroxilo, según las Ecuaciones 1.5, 1.6 y 1.7 (Chatterjee, D. y col., 2005):



Un gran número de parámetros influyen tanto cualitativa como cuantitativamente en el proceso de oxidación-reducción fotocatalizado y resultan determinantes en la eficiencia global de la reacción (Blesa, M.A. y col., 2004), de los cuales destacan el pH (óptimo entre 3 y 5), el área superficial, la intensidad de la radiación o la modificación por introducción de aditivos.

La fotocatalisis con dióxido de titanio ha sido ampliamente empleada en la degradación de diferentes contaminantes, entre los que destacan los textiles (Morrison C. y col., 1997, Zhao J. y col., 1998; Konstantinou I.K., y col., 2002; Lizama y col., 2002), plaguicidas (Konstantinou I.K., y col., 2003; Pizarro P. y col., 2005), clorofenoles (Pera-Titus y col., 2002), compuestos fenólicos (Bacsa, R.R. y col., 1998; Marques, P.A.S.S. y col., 1996) o aguas cianuradas (Bozzi, A. y col., 2004; Dabrowski, B. y col., 2002; Augugliano, V. y col., 1999).

1.3.2.C.- SENSIBILIZADORES ORGÁNICOS

Aunque tanto el reactivo de Fenton como el TiO_2 han demostrado ser buenos fotocatalizadores, empleando luz solar, es conveniente el estudio de otras sustancias que sean capaces de absorber de forma más eficiente la región visible del espectro solar. Algunas de las sustancias más prometedoras en este sentido son los fotosensibilizadores orgánicos, algunos de los cuales han sido ya estudiados en otros campos de la química o de la medicina (Miranda, M.A. y col., 1994, 2000 y 2001; Teuber, M. y col., 2001).

Existen dos principales grupos de fotosensibilizadores clasificados según su mecanismo de reacción como se explica seguidamente:

- Transferencia energética. En los que los fotosensibilizadores toman la energía luminosa y posteriormente la transfieren al sustrato facilitando de esta forma la reacción. Un ejemplo de estos compuestos es el azul de metileno o el rosa de bengala (Miller, J.S. 2005).
- Transferencia electrónica. Se produce una transferencia de electrones entre el catalizador y el sustrato (Miranda, M.A. y col., 1994); se trata de un proceso similar al descrito para el dióxido de titanio (Dionysiou, D.D. y col., 2000)

Este segundo grupo de fotosensibilizadores está demostrando ser el más eficaz, y entre ellos uno de los más utilizados actualmente es el catión 2,4,6-trifenilpirilio. El catión 2,4,6-trifenilpirilio (Figura 1.5) es un sensibilizador orgánico utilizado en química fina (Miranda M.A. y col., 1994) y que se puede utilizar como fotocatalizador ya que es capaz de absorber en la región UV-A del espectro electromagnético.

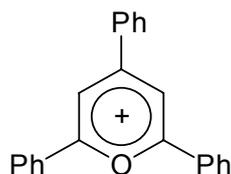
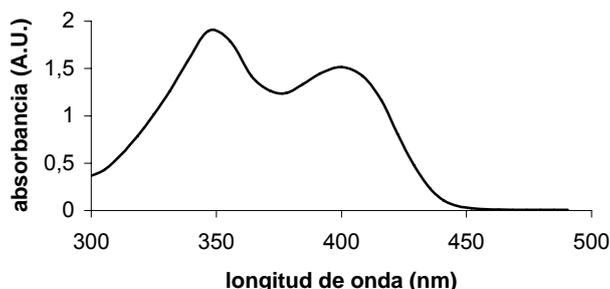


Figura 1.5. Cati3n 2,4,6-trifenilpirilio

Este cati3n presenta en disoluci3n acuosa un espectro de absorci3n con bandas muy intensas en la regi3n visible y ultravioleta cercano (Gr3fica 1.1) con m3ximo de absorbancia a 350 y 400 nm, llegando a absorber hasta los 450 nm. Esto indica que este compuesto puede absorber una parte importante de la radiaci3n solar y por lo tanto actuar como fotocatalizador solar.



Gr3fica 1.1. Relaci3n de la velocidad de reacci3n con la intensidad solar

El cati3n 2,4,6-trifenilpirilio (TPP⁺) no es un oxidante fuerte en su estado fundamental, pero s3 lo es en su estado excitado, de modo que actúa a trav3s de un mecanismo de transferencia electr3nica, gener3ndose el radical piranilo y un cati3n radical procedente del contaminante. La reacci3n de este intermedio con el oxigeno molecular produce la fragmentaci3n u oxidaci3n del sustrato contaminante (Miranda, M.A. y col., 1999, 2000, 2001 y 2004).

Una representaci3n del proceso en su conjunto se puede ver en la Figura 1.6, donde se puede observar el ciclo de reducci3n/oxidaci3n que sufre en TPP⁺ (Arques, A. 2001; Amat, A.M. y col., 2002).

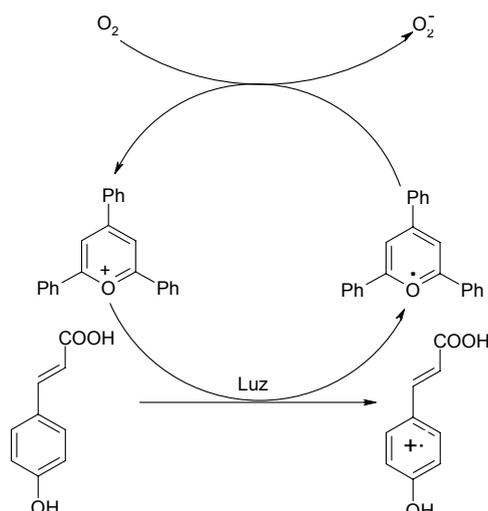


Figura 1.6. Mecanismo de la actuación del catión 2,4,6-trifenilpirilio como fotocatalizador solar.

El catión 2,4,6-trifenilpirilio ha sido probado con éxito como fotocatalizador solar en el tratamiento de algunos compuestos contaminantes, en concreto, derivados del ácido cinámico y del ácido benzoico (Miranda, M.A. y col., 2001). Estos compuestos se encuentran presentes en muchas aguas residuales industriales, como las agroalimentarias y son difíciles de tratar por métodos convencionales. También se ha mostrado eficaz en el tratamiento de algunos compuestos fenólicos presentes en aguas industriales. Sin embargo presenta algunos problemas como dificultad de recuperación de las aguas tras el tratamiento, baja estabilidad en disoluciones acuosa (Miranda M.A. y col., 2001), probable contaminación de las aguas por la presencia del catalizador solubilizado.

Una posible solución a los inconvenientes podría consistir en el empleo de la catálisis heterogénea para lo que necesitamos un soporte sólido donde depositar el catalizador. Entre los soportes a emplear se encuentran algunas materias inorgánicas como el gel de sílice (Miranda y col, 2002) o algunos silicatos que le permiten actuar como fotocatalizador y no intervienen en las reacciones fotodegradativas. Las zeolitas y las sepiolitas entre otros son algunos de estos materiales que hoy día se están utilizando (Amat, A.M. y col., 2003a, 2004 y 2005a).

Sin embargo, no solamente se han utilizado las sales de pirilio con fines ambientales, sino también existen ejemplos de otros sensibilizadores como las sales de tiopirilio

(Sanjuán, A. y col., 1999a y 1999b; Álvaro M. y col., 2004a, 2004b y 2004c), o el amarillo de acridina (Amat A.M. y col., 2007), cuya estructura se muestra en la Figura 1.7 y que han producido prometedores resultados.

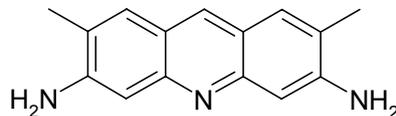


Figura 1.7. Estructura Química del amarillo de acridina

1.4.- EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS AGUAS RESIDUALES

Como hemos visto en los apartados anteriores, algunas características indeseables de las sustancias químicas como por ejemplo la toxicidad y la no biodegradabilidad, generan importantes problemas en los tratamientos convencionales aplicados a su eliminación en todo tipo de aguas. Las nuevas tecnologías aplicadas como por ejemplo los procesos avanzados de oxidación (PAOs) pretenden solucionar en parte esta problemática. Por lo tanto, una buena estrategia sería el poder combinar los PAOs con los tratamientos biológicos, de manera que los primeros aumentan la biocompatibilidad del efluente, y los segundos eliminan la materia orgánica biodegradable.

Existen ya numerosos ejemplos en los que se ha indicado una reducción de su toxicidad incluso antes de la total mineralización de un contaminante (Malato, S. y col., 2003; Hincapié, M.M. y col., 2005; Evgenidou, E. y col., 2005; Kim T.S. y col., 2006). En muchos casos esta disminución de la toxicidad ha ido acompañada de un considerable aumento de biodegradabilidad (Sarriá, V. y col., 2002 y 2003a y 2003b; Miranda M.A. y col., 2003). Como consecuencia, la combinación PAO-biológico se observa como una alternativa viable e interesante (Scott, J.P. y col., 1995; Esplugas, S. y col., 1997)

Para evaluar la eficacia de estos PAOs se necesita controlar la evolución de la toxicidad y la biodegradabilidad de las muestras tratadas. No es suficiente en muchos casos basarse exclusivamente en el seguimiento analítico de la desaparición del contaminante en cuestión, pues en muchos de los PAOs se generan intermedios que pueden ser iguales o más peligrosos que los del producto de partida.

Por otra parte, los PAOs son demasiado costosos para esperar una desmineralización total de la sustancia tratada, por lo que se debe pretender llegar a un punto intermedio, con unos valores adecuados de no toxicidad y de biodegradabilidad, tal que la sustancia tratada ya pueda incorporarse a una línea de tratamiento convencional, en la mayoría de los casos de tipo biológico debido a su elevada eficacia en estas condiciones y a su menor coste.

1.4.1. ESTADO ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUAS RESIDUALES

La *toxicidad* se define como la capacidad de una sustancia para producir daños en los tejidos vivos, lesiones en el sistema nervioso central, enfermedad grave o, en casos extremos, la muerte cuando se ingiere, inhala o se absorbe a través de los tejidos vivos o de la piel. La toxicidad es una característica no deseada de numerosas sustancias químicas. Algunas de estas sustancias son tóxicas por sí mismas, generalmente debido a su estructura química, y otras pueden llegar a ser tóxicas por efecto de la bioacumulación o la bioampliación en los propios medios receptores. También la persistencia o degradación que sufren estas sustancias en el medio pueden variar su toxicidad.

La administración de una dosis particular de una sustancia química a un animal de laboratorio, y la subsiguiente respuesta, pueden ayudar a predecir si dicho compuesto químico tendrá efectos tóxicos en el ser humano. La representación de dosis-respuesta demuestra que no todos los individuos responden de la misma manera a una dosis particular. Algunos individuos serán más sensibles que otros, y una dosis específica puede ser letal para unos pero no para otros. Así pues, la toxicidad es un “valor promedio”.

El control de los efluentes industriales ha sido tradicionalmente regulado usando métodos con respuestas no específicas y midiendo parámetros globales, como la medida del carbono orgánico disuelto (COD) o la demanda química de oxígeno (DQO). Sin embargo, estos métodos no proporcionan suficiente información sobre los efectos biológicos de estos efluentes en el medio ambiente. La tendencia a combinar aguas residuales industriales y municipales en las plantas de tratamientos de las ciudades ha aumentado la posibilidad de introducir sustancias tóxicas en los efluentes de las plantas depuradoras. Esto puede provocar un grave perjuicio económico y medio

ambiental, pues puede afectar por una parte a la biodegradación orgánica del agua residual, inhibiéndola, y por otra a la eficiencia de la reducción de la fase líquido-sólida, lo que modificará las propiedades de los fangos, afectando consecuentemente a la calidad del efluente final.

Como consecuencia se han desarrollado un amplio abanico de bioensayos de toxicidad para establecer estos niveles en efluentes acuosos. Se ha buscado en estos métodos la rapidez, sencillez, sensibilidad y, al mismo tiempo, un bajo coste. No siempre se ha conseguido todo lo propuesto, pero en algunos casos este planteamiento ha sido efectivo. En pos de identificar los principales componentes tóxicos en efluentes y fangos, se recomienda la combinación de ensayos biológicos de toxicidad con análisis químicos de los compuestos (Ruiz, M.J. y col. 1997).

La respuesta biológica inducida en diferentes organismos vivos por una sustancia química es muy diversa y depende de su sensibilidad frente a los contaminantes. Los bioensayos pueden proporcionar una medida general del impacto tóxico de efluentes consistentes en una mezcla compleja de sustancias químicas, integrando diferentes factores como el pH, la solubilidad, los procesos de antagonismo o sinergismo, la bioacumulación, etc. El uso de diversas bacterias en los bioensayos que engloban diferentes especies bioindicadoras y distintos niveles tróficos es una forma eficiente y esencial para detectar sustancias peligrosas en los ecosistemas acuosos. Algunos bioensayos usados comúnmente se han sustituido por otros microbianos y biosensores (Tothill, L.E. y col., 1996).

Los procesos analíticos clásicos de toxicidad directa son, en general, demasiado laboriosos para ser rápidamente aplicables; por lo que el uso de sistemas de test biológicos rápidos para evaluar la toxicidad, basados en células o microorganismos, abre nuevas expectativas (Reemtsma, T. y col., 2001). Estos nuevos test pueden medir la toxicidad por los efectos sobre las células vivas o directamente sobre órganos, de forma rápida, con bajo coste económico y sin los problemas éticos que conllevan la utilización de organismos superiores como los peces. Los bioensayos para medir la toxicidad pueden ser clasificados según la especie utilizada en el test. Los organismos normalmente utilizados en bioensayos de toxicidad se reflejan en la Tabla 1.4 (Farré, M. y col., 2003).

Principales organismos empleados en bioensayos de toxicidad											
Agua dulce											
Vertebrados						Invertebrados					
Agua templada			Agua fría			Agua templada			Agua fría		
Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.
<i>Ictalurus punctatus</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	30-90 días	(a) (b)	<i>Cambarus spp</i> <i>Procambarus spp</i>	juvenil	(a) (b)	<i>Pacifastus leniusculus</i>	juvenil	(a) (b)
<i>Pimephales promelas</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Salmo gairneri</i>	30-90 días	(a) (b) (c)	<i>Chironomus spp</i>	larva	(a) (b)	<i>Pteronarcys spp</i>	larva	(a) (b)
<i>Leopomis machrochirus</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	30-90 días	(a) (b)	<i>Hexagenia limbata</i> <i>Hexagenia Bilineata</i>	ninfa	(a) (b)	<i>Bateis spp</i>	ninfa	(a) (b)
						<i>Hyalalla spp</i> <i>Gammarus lacustris</i> <i>Gammarus fasciatus</i>	juvenil	(a) (b)			
						<i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia pulex</i> <i>Ceriodaphnia spp</i>	1-24 h	(b) (e) (f) (g)			
Agua marina y de estuario											
Vertebrados						Invertebrados					
Agua templada			Agua fría			Agua templada			Agua fría		
Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.	Especies	Etapas de la vida	Ref.
<i>Paralichthys dentatus</i> <i>Paralichthys lethostigma</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Citharichthys-stigmaeus</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Panaeus setiferus</i> <i>Panaeus Duorarum</i> <i>Panaeus</i>	Post-larva	(a) (b)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Gameto/embrión	(a) (b)
<i>Fundulus similis</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Pseudopleuronectes Smericanus</i>	Post-metamorfosis	(a) (b)	<i>Neomysis spp.</i>	1-5 días	(a) (b)	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Gameto/embrión	(a) (b)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Parophrys vetulus</i>	1-90 días	(a) (b)	<i>Callinectes sapidus</i>	juvenil	(a) (b)	<i>Pandalus jordani</i>	Juvenil	(a) (b)
<i>Langodon rhomboids</i>	1-90 días	(a) (b)				<i>Palaemonetes spp.</i>	1-10 días	(a) (b)	<i>Cancer magister</i>	Juvenil	(a) (b)
<i>Cyprinodon variegates</i>	1-90 días	(a) (b)				<i>Grangon spp.</i>	Post-larva	(a) (b)	<i>Dendraster exentricus</i>	Gameto/embrión	(a) (b)
<i>Mendia spp.</i>	1-90 días	(a) (b)				<i>Crassostrea gigas</i>	Post-larva	(a) (b)			
<i>Leiostomus xanthurus</i>	1-90 días	(a) (b)				<i>Crassostrea virginica</i>	Embrión/larva	(a) (b)			

- (a) Tothill, L.E. y col., 1996
 (b) EPA/600/4-90/027F, 1993
 (c) ISO 10229, 1994
 (e) Persoone, G. y col., 1994

- (f) Biesinger, K.E. y col., 1987
- (g) ISO 6341, 1996

Plantas y algas		
Especies	Parámetros de medida	Ref.
Algas		
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inhibición del crecimiento	(1), (2)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Inhibición del crecimiento	(2)
<i>Skeletonema costatum</i>	Inhibición del crecimiento	(3)
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Inhibición del crecimiento	(1)
Plantas		
<i>Brassica campestris</i>	Germinación	(1)
<i>Avena sativa</i>	Germinación	(1)
<i>Latuca sativa</i>	Longitud de raíz	(1)
Microorganismos		
Especies	Parámetros de medida	Ref.
<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	(4)
<i>Photobacterium Phosphoreum</i>	Bioluminiscencia	(4)
<i>Escherichia coli</i>	Estado Metabólico	(5)
<i>Pseudomonas putida</i>	Estado Metabólico	(5),(6)
<i>Pseudomonas fluorescens P-17</i>	Inhibición del crecimiento	(7)
	Bioluminiscencia	
<i>Spirillum volutanta</i>	Movilidad	(8)
<i>Cyanobacter synechicoccus</i>	Actividad fotosintética	(9)
<i>Fangos activos</i>	Crecimiento	(4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Crecimiento	(7)
<i>Sacharomysces cerevisiae</i>	Actividad Metabólica	(10)

- (1) Ferrari, B. y col., 1999
- (2) EPA-600/9-78-018, 1978
- (3) ISO 10253, 1995
- (4) ISO 11348-1, 2 y 3, 1998
- (5) Evans, M.R. y col., 1998
- (6) Farré, M. y co., 2003
- (7) Zhang, S. y col., 2001
- (8) Nomura, Y. y col., 1994
- (9) ISO 15522, 1999
- (10) Palmquist, E. y col., 1994

Tabla 1.4. Principales organismos empleados en bioensayos de toxicidad

Bioensayos con peces.

Usados de forma habitual, los ensayos de toxicidad con peces incluyen la exposición del organismo a la sustancia tóxica por un máximo de 96 horas. Los resultados se obtienen como el porcentaje en volumen que es letal para el 50% de los organismos (LC₅₀). Se utilizan preferentemente dos tipos de test de toxicidad acuática, estático o con flujo. La selección del tipo de test depende de los objetivos del test, de los recursos que se tienen, de los requerimientos del organismo test y de las características del efluente. Especies como *Salmo gairdneri* (ISO 10229, 1994) y *Pimephales promelas* se han utilizado tradicionalmente para los test de crecimiento y de letalidad aguda (EPA-600/4-90/027, 1993).

Otros bioensayos con peces se basan en el crecimiento de larvas, la supervivencia de larvas o la medida de la adenina trifosfato (ATP) como un indicador bioquímico de la tensión energética en los tejidos musculares del pez. Actualmente, se ha optado por reemplazar los test de toxicidad acuosa por los test de ensayo in vitro, usando cultivos de células de peces (Babich, H. y col., 1991) y biosensores redox incorporados al cultivo celular en peces (Polak, M.E. y col., 1996).

En general, los bioensayos con peces presentan buenas sensibilidades y permiten análisis a tiempo real, pero tienen algunos problemas de estandarización, como por ejemplo el tiempo de contacto, el equipamiento específico necesario y operadores de una adecuación específica.

Bioensayos con invertebrados.

El test de toxicidad crónica con macroinvertebrados se ha utilizado extensivamente en los estudios de riesgo de toxicidad acuática (Lewis, M.A., 1991). Uno de los más comunes test de toxicidad de invertebrados utiliza *Daphnia* y *Ceriodaphnia*, ambas especies de agua dulce pertenecientes a las *Cladoceras*. También existe un test basado en el crustáceo *Thamnocephalus platyurus*, llamado THAMNOTOXKIT F®, que mide la mortalidad del crustáceo en un tiempo entre 24-48 horas.

El uso de *Daphnia* es uno de los más extendidos en el campo del estudio de la ecotoxicidad (Goi, A. y col., 2004). Tiene algunas ventajas evidentes, como la alta sensibilidad y el corto ciclo reproductivo. Los parámetros que se miden son mortalidad o reproducción (Biesinger, K.E. y col., EPA 1987). Los tests se basan en la exposición del organismo del test a las sustancias tóxicas bajo condiciones controladas. El test de toxicidad aguda con *Daphnia* medido a los 21 días está bien establecido y estandarizado (ISO 6341, 1996). Comercialmente está en el mercado un kit llamado DAPHTOXKIT F®, que mide la mortalidad del crustáceo *Daphnia* en un tiempo de entre 24-48 horas.

Otros ensayos de toxicidad que usan invertebrados de agua dulce como organismos indicadores están basados en la supervivencia y/o crecimiento de libélulas, anfípodos, y ciertos tipos de insectos o especies marinas como quisquillas, gambas, ostras (Sarakinis, H.C. y col., 2000). Se han propuesto un gran número de tests alternativos, especialmente a nivel de evaluación, con el objetivo de facilitar y simplificar la parte experimental, la reproducibilidad, la rapidez de las operaciones y tiempos de

exposición más cortos. Este es el caso del test screening con *Daphnia* (Toussaint, M.W. y col., 1995) o el test con camarón en salmuera (Vanhaeke y col., 1981).

Bioensayos con plantas y algas.

Aunque muy poco utilizados, también se han desarrollado diversos bioensayos de toxicidad basados en plantas. Los biomarcadores en plantas ofrecen ventajas generales como un gran número de parámetros del punto final para analizar (germinación, tamaño de biomasa, actividad enzimática, etc.), bajos costes de mantenimiento y rápida activación del test, lo que es una ventaja especial para el análisis del potencial ecotóxico en residuos sólidos (Ferrari, B y col., 1999).

Se han empleado especies como la avena (*Avena sativa*) o la col china (*Brassica campestris*). Sin embargo, los tests basados en las respuestas al crecimiento de las plantas cuando son sometidas a un posible contaminante, requieren de más tiempo, generalmente entre 4-6 días para poder medir, por ejemplo la longitud de la raíz (desde un mínimo de 96 horas en la lechuga a, en algunos casos, hasta 21 días) (Wong, S.L. y col., 1995).

También se han desarrollado tests de biotoxicidad basados en algas. Entre éstas destacan las algas unicelulares marinas, como *Selenastrum capricornutum*, un alga verde que tiene un kit de medida de la inhibición del crecimiento llamado ALGALTOXKIT F®, con un tiempo de medida de 72 horas; o también *Dunaliella tertiolecta* (ISO 10253, 1995, EPA-600/9-78-018, 1978 y EPA-600/3-82-034, 1982).

Los tests que se basan en el crecimiento de algas en muestras de efluentes industriales o agua de mar, se miden entre 72-96 horas al final del tiempo de exposición al tóxico, en un contador de partículas. Las principales desventajas de los métodos con algas son la dificultad en su cultivo y, algunas veces, la falta de reproducibilidad entre ensayos sucesivos.

Bioensayos bacterianos.

Se han desarrollado variados métodos basados en bacterias para evaluar la toxicidad en medio acuoso. Los efectos de las sustancias tóxicas en la actividad microbiana metabólica constituyen un método directo, rápido, sensible y de bajo coste para el análisis químico. Estas técnicas se utilizan para monitorizar un gran número de muestras y evaluar su toxicidad.

Se han descrito varios bioensayos y se han estudiado diferentes métodos usando distintos microorganismos, que pueden ser clasificados dependiendo del parámetro de medida que se utilice. Hay tests basados en la inhibición del crecimiento celular como los que utilizan *Pseudomonas* (ISO 10712, 1995) o los que se basan en la inhibición de la respiración de una mezcla de microorganismos que utilizan fangos activos (ISO 15522, 1999 y OCDE 209).

Ensayos respirimétricos basados en la inhibición de la respiración de fangos activos.

La respirometría como medida de la inhibición de la respiración de fangos activos ha sido utilizada para medir la toxicidad de aguas residuales, tanto para bacterias heterotróficas como para bacterias nitrificantes (Riedel, K. y col., 2002). La respirometría de fangos activos es un método directo normalizado para analizar la actividad de los fangos y su toxicidad, estando bien documentado en la literatura científica (por ejemplo, Mrafkova y col., 2003). Se basa principalmente en que la tasa de respiración de un fango activado puede ser reducida en presencia de contaminantes. La medida más común de esa tasa de respiración es la tasa de respiración promedio. Con referencia a la inhibición de la respiración de fango activos, respirometría, la toxicidad se evalúa en términos de descenso de la tasa de respiración específica máxima (OUR máx, del inglés "oxygen uptake rate"), referida a un compuesto muy biodegradable como el acetato y su evolución detectada después de la adición de concentraciones conocidas de los compuestos tóxicos. El porcentaje de inhibición (%inh) se obtiene en forma de curva en función de la concentración del tóxico utilizada y a partir de ésta se puede obtener el valor de la CE₅₀. El fango activo suele ser obtenido a partir de una estación depuradora de aguas residuales, mantenido en aireación, y a poder ser que no esté preadaptado, es decir, que no esté en contacto con el contaminante objeto de estudio.

El método de toxicidad basado en la inhibición de la respiración de los fangos activos es un método de referencia ya que es simple, tiene una buena reproducibilidad y los microorganismos son representativos de la biomasa que se encuentra en una estación de tratamientos de aguas residuales. El intervalo de tiempo considerado para la detección de la inhibición de la respiración de los fangos activos utilizados en los procedimientos del test es muy corto (≤ 10 min) para evitar cualquier interferencia causada por la biodegradación de los compuestos utilizados.

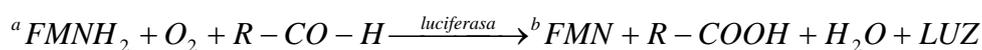
La concentración de biomasa del fango activo se debe medir para cada ensayo, utilizando para ello el test de sólidos volátiles en suspensión. La biomasa óptima y las concentraciones de acetato y oxígeno están establecidas de antemano (Ricco, G. y col., 2004), con el objetivo de evitar la reoxigenación de la muestra durante el test, evitar los efectos perjudiciales de una elevada concentración de oxígeno disuelto en la actividad de la biomasa, trabajar con una proporción sustrato/biomasa (S/X) baja para reducir la modificación del cultivo durante el test y asegurarse un consumo de oxígeno detectable.

La continua aireación en el respirómetro abierto causa problemas relacionados con compuestos orgánicos volátiles. Para evitar este problema, se han realizado una serie de cambios en el equipo experimental y en el procedimiento del test. Se ha utilizado un respirómetro cerrado con una muy pequeña cámara de aire en la parte superior, lo que hace posible suponer una casi nula transferencia de masa del gas a la fase líquida y hace innecesario evaluar el coeficiente de transferencia gas-líquido (K_{La}). Consecuentemente, la respiración de la biomasa puede evaluarse sólo con la concentración de oxígeno detectada en la fase líquida (Ricco, G. y col., 2004).

Bioluminiscencia

El más común de los tests de toxicidad que utilizan bacterias está basado en la inhibición de bacterias luminiscentes, sobre todo *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) (Boluda, R. y col. 2002, Abbondanzi, F. y col. 2003, Parvez, S. y col. 2006), aunque también existen algunos métodos basados en otra bacteria marina como *Vibrio harveyi* (Mariscal, A. y col. 2003) e incluso con cadenas manipuladas genéticamente de *Escherichia coli* (Kaiser, K.L.E. 1998a). Existen en el mercado diferentes equipos comerciales basados en la inhibición de la luminiscencia de ese tipo de bacterias como por ejemplo MICROTOX®, BIOTOX®, LUMISTOX® o TOXALERT®, que utilizan la metodología estandarizada según normas DIN o ISO, con un alto nivel de reproducibilidad y fácil manipulación (ISO 11348-1-2-3, 1998).

Estas bacterias marinas emiten luz de forma natural gracias a un enzima, la luciferasa bacteriana, cuya catálisis sigue la siguiente reacción general (Ecuación 1.8):



(Ecuación 1.8)

^aFMNH₂ (Flavinmononucleótido hidrogenado)

^bFMN (Flavinmononucleótido deshidrogenado)

La producción de luz es directamente proporcional al estado metabólico de la célula y cualquier inhibición de la actividad celular se refleja en un decrecimiento de la bioluminiscencia. El porcentaje de inhibición (%inh) se determina comparando la respuesta dada por una solución de control, en medio salino, con la correspondiente a la muestra después de añadir la sustancia tóxica. La inhibición de la bioluminiscencia se puede definir como muestra la Ecuación 1.9:

$$\%inh = \left(1 - \frac{\text{luz muestra}}{\text{luz control}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

Cualquier interferencia metabólica debida a una inhibición química modificará la cantidad de luz emitida. La toxicidad acuosa se expresa en EC_{50} , que consiste, en este caso concreto, en la concentración efectiva de una sustancia tóxica que produce una reducción de luz del 50%.

Las principales ventajas de los test de bioluminiscencia son la rapidez, sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos, aunque también presentan algunas desventajas. La más importante de ellas es que, puesto que *Vibrio fischeri* es una bacteria marina, se necesita una filtración previa de la muestra y trabajar con disoluciones salinas. Debido a esta salinidad, algunas sustancias orgánicas reducen su, ya de por sí baja, solubilidad en agua provocando importante turbiedad en la muestra lo que puede llevar a errores importantes en la medida de la luz emitida. Para evitar este problema, se puede añadir metanol, hasta un máximo de un 10%, a la disolución salina (Farré, M. y col., 2003). Cuando se ha utilizado el ensayo con *Vibrio fischeri* para analizar la toxicidad de las aguas residuales, se ha comprobado que es, en un gran número de casos, mucho más sensible que la inhibición de la respirometría de fangos activos, y esto dificulta la aplicación de esta técnica al control en las plantas de tratamientos de aguas municipales.

Por todo ello, en los últimos años se han propuesto algunas modificaciones para el ensayo con *Vibrio fischeri*, como por ejemplo utilizar, en el ensayo con Microtox®, la suspensión de células de la bacteria marina acoplada a una matriz de fangos activos (Hoffmann, C. y col., 2001). Los autores encontraron que esta modificación reducía la sensibilidad del ensayo, haciéndola comparativa a la respirometría de fangos activos, debido sobre todo a los fenómenos de adsorción de contaminantes que se producían en la superficie de la matriz de fangos. También Lappalainen, J. y col., 2001

desarrollaron una corrección en la metodología para el ensayo de *Vibrio fischeri* para muestras que tuvieran color, ya que éste interfería con los ensayos bioluminiscentes.

Como complemento de los ensayos toxicológicos con *Vibrio fischeri*, han aparecido otros métodos para evaluar la toxicidad de aguas residuales, que se basan en la presencia o no de bioluminiscencia. Son los microorganismos genéticamente modificados (GEM en su abreviación en inglés), en particular los GEMs bioluminiscentes. Una lista de los GEMs bioluminiscentes más utilizados aparece en la Tabla 1.5, según Gu, M.B. y co., 2001:

GEM	Cepa origen	Fuente de luz CDABE ^a	Modo de respuesta ^b	Tipo de tóxicos detectados	Referencia (creación del GEM)	Referencia (aplicación del GEM)
DPD 2511	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	On	Oxidantes	Belkin y col. (1996)	Choi y Gu (2000)
DPD 2540	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	On	Químicos que dañan membrana	Belkin y col. (1996)	Gu y Gil (2001)
DPD 2794	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	On	Químicos que dañan el ADN	Vollmer y col. (1997)	Gu y Gil (2001)
TV 1061	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	On	Químicos que dañan proteínas	Van Dyk y col. (1994)	Gu y Gil (2001)
GC2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Xemorhabdus luminescens</i>	Off	Tóxicos en general	Gil y col. (2000)	Gu y Gil (2001)
Snk1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^c	<i>Vibrio fischeri</i>	Off	Tóxicos en general	Nelly y col. (1999)	Ren y Fymier (2003 _a)
BS 530	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Off	Tóxicos en general	Whiteley y col. (2001)	Wiles y col. (2003)
BS 566	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Off	Tóxicos en general	Whiteley y col. (2001)	Wiles y col. (2003)
BS 675	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Off	Tóxicos en general	Whiteley y col. (2001)	Wiles y col. (2003)
BS 678	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Off	Tóxicos en general	Whiteley y col. (2001)	Wiles y col. (2003)

^a *Vibrio fischeri* es una bacteria marina; *Photorhabdus luminescens* es una bacteria terrestre

^b On= emite; Off= no emite

^c La cepa origen procedente de Shk1 era de origen desconocido hasta que fue caracterizada como *Pseudomonas fluorescens* por Lajoie y col. 2003

Tabla 1.5. Listado de GEMs bioluminiscentes

Como se puede observar en la tabla, la mayoría de los GEMs provienen de modificaciones genéticas de *Escherichia coli*, aunque algunos provienen de *Pseudomonas*. Como destacan los autores, estos sistemas se pueden aplicar para monitorizar la evolución de la toxicidad en continuo, y constan en general de dos biorreactores: uno utilizado para el crecimiento celular, el cual genera de forma continuada células GEM para el segundo biorreactor que está expuesto a las sustancias contaminantes.

En algunos casos, la respuesta a la toxicidad de las muestras estudiadas puede generar una activación de la emisión de bioluminiscencia en los GEMs, denominada “light-on” (es decir, todo lo contrario al fundamento de *Vibrio fischeri*), o para algunos casos todo lo contrario, es decir una desactivación de la producción de bioluminiscencia (denominada “Light-off”, con idéntico comportamiento que *Vibrio fischeri*).

Uno de los GEMs más utilizados, es el Shk1, cuyo huésped fue aislado de fangos activos de una estación de tratamiento de aguas residuales industriales (Kelly, C.J. y col., 1999) y caracterizado más tarde como *Pseudomonas Fluorescens* (Lajoie, C.A. y col., 2003). Este GEM bioluminiscente, desarrollado por Ren, S. y col., 2003 a,b, puede ser utilizado para evaluar la toxicidad en continuo (tiene una respuesta similar a la de *Vibrio*, es decir “light-off”) con la ventaja añadida de su propio origen, los fangos activos, que lo hace especialmente útil para evaluar la toxicidad de estos.

También se han desarrollado ensayos de bioluminiscencia in vitro (Dalzell, D.J.B. y col., 2002) que se basan en la dependencia de la bioluminiscencia con la cantidad de Adenosin Trifosfato (ATP) medido en los fangos activos. La bioluminiscencia en este caso es producida por un sistema enzimático luciferín-luciferasa, que es sensible a los contaminantes. El origen de los fangos activos utilizados no afectaba a los resultados en este tipo de ensayo.

Biosensores.

Los biosensores son equipos analíticos compactos que combinan elementos sensibles biológicamente como enzimas (Argese, E. y col., 1998), DNA (Chiti, G. y col., 2001), o un microorganismo (Zhang, S. y col., 2001) con un transductor, el cual convierte la señal biológica en una señal medible.

El interés por desarrollar biosensores para analizar la toxicidad acuática ha aumentado recientemente debido a la fabricación en serie, al fácil uso de estos equipos, su rápida respuesta y la gran adaptabilidad para la monitorización en línea de los equipos. En la célula del biosensor el organismo vivo, por ejemplo una bacteria, está inmovilizada. Los parámetros que se miden para detectar la toxicidad son muy variados desde cambios en la absorción UV por la bacteria (Baumstark-Khan, C. y col., 1999), inhibición de la conductividad de un polímero cubierto de una capa de agarosa para mantener inmovilizado la *Saccharomyces cerevisiae* (Palmqvist, E. y col., 1994) o un

sistema amperométrico (Evans, M.R. y col., 1998). Este último test utiliza un medidor químico para desviar electrones del sistema respiratorio de la bacteria inmovilizada físicamente en el biosensor, a un electrodo amperométrico de carbono a 550 mV con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl.

Las medidas realizadas con biosensores no son distorsionadas por la turbidez de la muestra, siendo una ventaja importante sobre todo a la hora de realizar ensayos in situ en aguas residuales. Como desventaja hay que decir que las muestras deben de estar libres de sustancias que puedan precipitar o ensuciar el electrodo (aceites y grasas por ejemplo), así como no contener sustancias abrasivas que puedan dañar o eliminar la membrana que contiene inmovilizado el organismo utilizado en el biosensor. También es de destacar la escasa reproducibilidad y sensibilidad de los biosensores para determinadas sustancias tóxicas.

En la actualidad, se ha comprobado que la combinación de algunas de estos métodos de ensayo es más eficaz para evaluar la toxicidad. En los casos en los que es conveniente monitorizar y controlar la evolución de la toxicidad, por ejemplo en el caso de producirse procesos de biodegradación que puedan dar lugar a intermedios de reacción tóxicos, es muy conveniente utilizar técnicas complementarias para determinar este parámetro tan crítico.

Algunos ensayos usan biosensores para medir la inhibición de la tasa de respiración y detectar la toxicidad en aguas residuales. Liao, J.D. y col., 2001, describen un biosensor basado en la inhibición de la respiración de bacterias sensibles al oxígeno (cadenas no especificadas) en fangos activos. Cuando la respiración de la bacteria es inhibida debido a los contaminantes, más oxígeno es capaz de atravesar la membrana del biosensor provocando un cambio en el potencial redox de la membrana. El tiempo de respuesta es muy corto, de aproximadamente 8 minutos. Los autores encontraron que existe una buena correlación entre las señales del biosensor (cambio en el potencial redox) con la medida de la tasa de respiración.

Otro biosensor similar al anterior ha sido descrito por Tzoris, A. y col., 2002, el Baroxymeter. En este biosensor la inhibición de la respiración de la bacteria, en este caso *Pseudomona putida*, es cuantificada indirectamente midiendo la concentración de oxígeno disuelto presente en los fangos activos. Así los cambios producidos en la respiración bacteriana, debidos a la contaminación, están relacionados con cambios

en la presión en el cabezal superior del equipo. La respuesta se obtiene muy rápidamente, a los 5 minutos.

También Farré, M. y col., 2003, utilizaron un biosensor, el CellSense para estudiar la toxicidad de contaminantes orgánicos en aguas residuales. En su caso utilizaron células inmovilizadas de *Escherichia coli* sobre un electrodo que contiene un aceptor de electrones, en concreto el ferricianuro, capaz de captar electrones desde la cadena respiratoria de *E. coli* y transferirlos a un detector. La señal eléctrica resultante, obtenida al cabo de unos 30 minutos, nos indicará la variación en la respiración bacteriana.

Existen otros ensayos para evaluar la toxicidad basados en ensayos respirométricos sobre fangos activos que combinan esta metodología con otros parámetros de medida, como espectrofotometría visible, variación de parámetros globales como COT y DBO, valoración ácido-base, etc. Por ejemplo, Freitas dos Santos, L.F. y col., 2002, combinan la medida de la respiración de fangos activos con la decoloración de un colorante (violeta tetraazolio) aunque el tiempo de respuesta es excesivamente largo (alrededor de 24 horas).

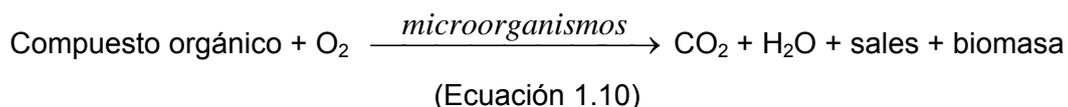
Archibald, F. y col., 2001, han desarrollado una batería de cuatro ensayos para informar sobre la toxicidad de contaminantes midiendo la respiración de fangos. Tres de ellos se basa en la medida de la tasa de respiración específica del fango midiendo la DBO eliminada en la actividad bacteriana, comparándola con la actividad de la biomasa, medida en el cuarto ensayo por medida del contenido en Adenosin Fosfato (ATP) del fango. El tiempo de respuesta es demasiado largo, aproximadamente 10 días. También Perneti, M. y col., 2003, realizaron ensayos de inhibición de la respiración en fangos activos midiendo la tasa de respiración y el carbono orgánico total (COT). Encontraron que las medidas obtenidas en los ensayos respirométricos estaban directamente relacionadas con el descenso del COT que se produce en la actividad bacteriana, con un tiempo de respuesta relativamente corto, entre 1-3 horas.

Por último, es interesante destacar que Gernaey, A.K. y col., 2001, combinaron el uso de la respirometría de fangos activos con una técnica química, la valoración ácido-base, para monitorizar la evolución de la toxicidad en fangos activos. La producción o consumo de protones debido a la actividad biológica del fango puede medirse por valoración química y relacionarla con la inhibición de la respiración de los fangos.

1.4.2. ESTADO ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE BIODEGRADABILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUAS RESIDUALES

La biodegradabilidad ha sido definida como la capacidad intrínseca de una sustancia a ser transformada en una estructura química más simple por vía microbiana (Ottenbrite, R.M. y col., 1992). Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales. La biodegradabilidad es un parámetro determinante en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas y una propiedad deseable de los productos que se liberan en grandes cantidades al medio natural.

La biodegradación puede ser “primaria” y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina “biodegradación última” o “mineralización” (OCDE, 1992) como se puede observar en la Ecuación 1.10.



Para su evaluación se han diseñado una serie de pruebas, las cuales buscan cuantificar el grado de persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales o industriales. Algunas de estas pruebas han sido normalizadas para garantizar que sus resultados son confiables y válidos independientemente del laboratorio en el que sean obtenidos. A continuación se hace una revisión de los métodos para la evaluación de la biodegradabilidad que han sido normalizados o que están en proceso de normalización por parte de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Éstas son las pruebas de biodegradabilidad más utilizadas a nivel internacional y de ellas se deriva la mayoría de los métodos estandarizados por la Organización Internacional de Normalización (ISO), por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) y por la Oficina Europea de Sustancias Químicas (ECB). Así mismo, se presenta la estrategia de evaluación de la biodegradabilidad más comúnmente utilizada, las principales ventajas y limitaciones de las pruebas, así como algunas tendencias de investigación futura.

En el esquema establecido por el Programa de Evaluación de Productos Químicos de la OCDE, la biodegradabilidad de una sustancia se determina utilizando tres niveles sucesivos de ensayo: las pruebas de biodegradabilidad inmediata, de

biodegradabilidad intrínseca y de simulación (OCDE, 1992). En la Tabla 1.6 se muestran las pruebas que la OCDE ha propuesto para cada nivel de evaluación, así como las pruebas ISO, US-EPA y ECB correspondientes.

PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD NORMALIZADAS O EN CURSO DE NORMALIZACIÓN POR PARTE DE LA OCDE Y SU CORRESPONDENCIA CON PRUEBAS ISO, US-EPA, y ECB

Descripción	OCDE ^a	ISO ^b	US-EPA ^c	ECB ^d
<u>Pruebas de biodegradabilidad inmediata</u>				
Prueba AFNOR modificada-pérdida de COD	301 A	7827	835.3110	C.4-A
Prueba de STURN modificada-desprendimiento de CO ₂	301 B	9439	835.3110	C.4-C
Prueba MIT I modificada	301 C	-	835.3110	C.4-F
Prueba en frasco cerrado	301 D	10707	835.3110	C.4-E
Prueba de detección de la OCDE -pérdida de COD	301 E	7827	835.3110	C.4-B
Prueba de respirometría manométrica	301 F	9408	835.3110	C.4-D
Prueba de desprendimiento de CO ₂ en recipientes cerrados	310 ^e	14593	835.3120	-
<u>Pruebas de biodegradabilidad intrínseca</u>				
Prueba SCAS (<i>Semi-Continuos Activated Shudge</i>) modificada	302 A	9887	835.3210	C.12
Prueba de Zahn-Wellens modificada	302 B	9888	835.3200	C.9
Prueba MIT II modificada	302 C	-	-	-
Prueba CONCAWE	302 D ^e	-	-	-
<u>Pruebas de simulación</u>				
Pruebas de simulación de tratam. aerobio con unidades de lodos activados	303 A	11733	-	C.10
Pruebas de simulación de tratamiento aerobio con biomasa fija	303 B	-	-	-
Pruebas de biodegradabilidad intrínseca en suelos	304 A	14239	835.3300	-
Pruebas de biodegradabilidad en agua marina	306	-	835.3160	-
Pruebas de transformación aerobia y anaerobia en suelos	307	-	-	C.23 ^e
Pruebas de transformación aerobia y anaerobia en sedimentos acuáticos	308	-	-	C.24 ^e
Prueba de mineralización aerobia en agua superficial	309 ^e	14592-1	-	-
Pruebas de producción de biogás a partir de lodo anaerobio diluido	311 ^e	11734	-	-

^aOCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.

^bISO: Organización Internacional de Normalización.

^cUS-EPA: Agencia de Protección Animal de los Estados Unidos.

^dECB: Oficina Europea de sustancias Químicas.

^e Prueba de proceso de normalización.

Tabla 1.6. Normas de biodegradabilidad según la OCDE

Inicialmente se lleva a cabo una prueba de biodegradabilidad inmediata, con la finalidad de clasificar las moléculas en la categoría “fácilmente biodegradable” con medios analíticos simples. Las condiciones experimentales de las pruebas inmediatas restringen al máximo las posibilidades de que se produzca la biodegradación, razón por la cual se considera que un resultado positivo indica la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento (Nyholm, N., 1991). Si el resultado de la prueba de biodegradabilidad inmediata es negativo, se procede a realizar una prueba intrínseca.

Estas pruebas utilizan condiciones experimentales más favorables a la degradación, por lo que un resultado positivo implica que la sustancia es “intrínsecamente biodegradable” bajo las condiciones empleadas, aunque no necesariamente en el medio natural. Por otra parte, un resultado negativo indica muy probablemente la persistencia ambiental de la sustancia.

Finalmente, si la sustancia mostró una biodegradabilidad mediocre en una prueba intrínseca, se llevan a cabo pruebas de simulación. Tales pruebas tienen como objetivo estudiar su comportamiento en sistemas de tratamiento o medios naturales relevantes, para lo cual debe contarse con un cierto conocimiento de la distribución de la sustancia en los diferentes compartimientos ambientales (agua, suelos, etc.). Si el resultado de la prueba de simulación pertinente es a su vez negativo, se presume que la sustancia persiste en el ambiente y que puede considerársele sujeta a restricciones en cuanto a su esquema de producción o comercialización; así mismo, suele exigirse la búsqueda de compuestos sustitutos para un cierto uso (Kaiser, K.L.E., 1998b).

Pruebas de biodegradabilidad inmediata

La OCDE ha normalizado varias pruebas de biodegradabilidad inmediata, cuyas condiciones experimentales se resumen en la Tabla 1.7.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD INMEDIATA DE LA OCDE (1992)

Prueba	Fuente de inóculo	Inóculo (células/l)	Compuesto de prueba (mg/L)	Descripción
301 A	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados.	10^7 - 10^8	10 - 40 (mgCOD/L)	Prueba en matraz agitado con seguimiento de la pérdida de COD.
301 B	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados.	10^7 - 10^8	10 - 20 (mgCOD/L)	Prueba respirométrica en un dispositivo que capta el CO ₂ producido.
301 C	Lodos ^a precultivados con peptona y glucosa.	10^7 - 10^8	100	Prueba respirométrica en un medidor de DBO.
301 D	Efluente secundario, agua superficial	10^4 - 10^6	2 - 10	Prueba respirométrica en un medidor de DBO.
301 E	Efluente secundario.	10^5	10 - 40 (mgCOD/L)	Prueba en matraz agitado con seguimiento de la pérdida de COD.
301 F	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados.	10^7 - 10^8	100	Prueba de respirometría manométrica
310 ^b	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados.	10^5 - 10^8 (UFC/l)	10 - 20 (mgCOD/L)	Prueba respirométrica en recipientes cerrados con seguimiento del C inorgánico producido en la fase líquida o gaseosa.

^a Obtenidos a partir de 10 muestras naturales diferentes; ^b Prueba en proceso de normalización (OCDE, 2001 c).

COD: Carbono Orgánico disuelto; DBO: Demanda bioquímica de Oxígeno.

Tabla 1.7 Condiciones experimentales de las normas de biodegradabilidad inmediata de la OCDE

El principio general de estas pruebas es la incubación aerobia estática, o por lote, de una cantidad reducida de biomasa en un medio mineral, a pH neutro y a una temperatura entre 20 y 25°C. La sustancia en estudio se añade a una concentración definida, como única fuente de carbono y energía. El inóculo consiste en una población microbiana natural que no haya sido expuesta al compuesto de prueba. Estas pruebas pueden aplicarse a una gran variedad de compuestos, debido a que se basan en el seguimiento de parámetros directos y no específicos a la molécula que se estudia, como el Carbono Orgánico Disuelto (COD), o bien de parámetros indirectos correlacionados con la mineralización de la molécula, como la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) o la producción de CO₂.

Simultáneamente a la prueba se utilizan varios testigos, que aseguran que los resultados no se deben a una degradación abiótica, a la eliminación física de la molécula por adsorción, a la toxicidad de la sustancia o a una actividad deficiente del inóculo; ésta última se evalúa con moléculas de referencia fácilmente biodegradables, tales como la anilina o el acetato de sodio. Los resultados de los ensayos respirométricos se corrigen con la respiración endógena del inóculo, la cual se mide en ausencia de la sustancia de prueba.

El nivel límite de biodegradación exigido por estas pruebas es una disminución del 70% cuando se mide el COD, y del 60% de la Demanda Teórica de O₂ (ThO₂) o de la Producción Teórica de CO₂ (ThCO₂) cuando se trata de pruebas respirométricas, valores que deben alcanzarse en un período de 28 días. ThO₂ y ThCO₂ se calculan a partir de la estructura química de la molécula considerando una biodegradación total de la misma (OCDE, 1992).

Para un resultado positivo, y a excepción de la prueba MITI I (OCDE 301 C), los niveles límite de biodegradación deben además alcanzarse en los diez días que se suceden al final de la fase de latencia, la cual se define arbitrariamente como el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación del 10%. A este criterio se le conoce como “la ventana de los 10 días”. El nivel máximo de biodegradación presentado al cabo de 28 días, la duración de la fase de latencia (t_L) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), definido como el tiempo transcurrido para obtener una biodegradación del 50%, se informan como resultado de las pruebas. La obtención de estos parámetros está representada en la Figura 1.8.

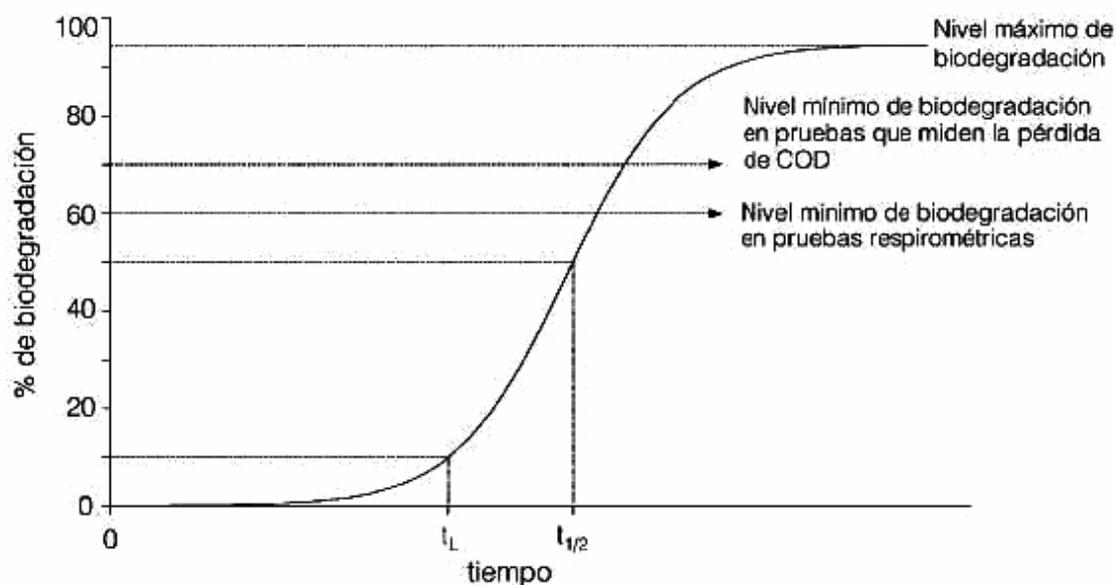


Figura 1.8. Representación esquemática de un proceso de biodegradación. COD: carbono orgánico disuelto; t_L tiempo de latencia; $t_{1/2}$ tiempo de vida media

La selección de una prueba se lleva a cabo considerando las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Los compuestos volátiles deben evaluarse en sistemas cerrados y preferiblemente mediante la concentración de O_2 disuelto (por ejemplo la prueba OCDE 301 D). La biodegradación de los compuestos poco solubles en agua no deberá cuantificarse mediante el consumo de COD (evitar las pruebas OCDE 301 A y OCDE 301 E), mientras que deberán preferirse los ensayos respirométricos para los compuestos adsorbibles.

Sin embargo, la sola elección de un método puede afectar el resultado de la prueba. Por la reducida concentración de biomasa que estipulan, las pruebas OCDE 301 D y OCDE 301 E proporcionan más resultados negativos, ya que frecuentemente necesitan largos períodos para que los microorganismos puedan reproducirse suficientemente. Por otra parte, dado que un resultado positivo en alguna de estas pruebas “restrictivas” garantiza que el compuesto se biodegradará rápidamente, son las más indicadas para los compuestos que se encontrarán en grandes cantidades en el medio ambiente.

Se ha comprobado que la cinética de biodegradación de un compuesto determinado depende de la prueba que se seleccione. Reuschenbach, P. y col. (2003) encontraron que la anilina se biodegrada más rápidamente en la prueba OCDE 301 A, basada en

el seguimiento del COD, que en la prueba OCDE 301 F y más aún que en la OCDE 301 B, basadas en el consumo de O_2 y en la producción de CO_2 , respectivamente. La prueba OCDE 301 B mide el CO_2 producido, el cual es capturado por un álcali en un dispositivo externo al recipiente en el que se lleva a cabo la biodegradación. Si éste no cuenta con aireación y agitación suficientes, se producirá una acumulación de HCO_3^- que modificará la cinética de biodegradación. Además, el método de cuantificación del CO_2 capturado es impreciso por si mismo, ya que éste se calcula a partir de la diferencia entre los valores de titulación del álcali del recipiente de prueba y del testigo, que son relativamente elevados.

En virtud de que la prueba OCDE 301 B no es muy confiable desde el punto de vista cinético, es recomendable que el criterio de “la ventana de los 10 días” se elimine cuando se utiliza dicho método. De hecho, se ha mostrado que en el caso de tensioactivos este criterio produce falsos resultados negativos (Richterich, K. y Steber, J., 2001), aun cuando se utilicen otras pruebas de biodegradabilidad inmediata.

La prueba OCDE 310 fue propuesta para solventar algunas de las limitaciones de la prueba 301 B. Esta prueba, que permite probar compuestos volátiles, poco solubles en agua y adsorbibles, se lleva a cabo en recipientes cerrados, en los que se deja un volumen determinado de aire. Durante y al final de la incubación, se sacrifican botellas de réplica para determinar el carbono inorgánico presente en el aire o en el líquido después de añadir un ácido o una base, respectivamente. Considerando la relación de volúmenes de líquido y de aire, es posible determinar la totalidad de CO_2 producido. Mediante un ensayo interlaboratorio se mostró que esta prueba es la más adecuada para la determinación de la biodegradabilidad inmediata de surfactantes (Painter, H. A. y col., 2003).

Pruebas de biodegradabilidad intrínseca

Las pruebas de biodegradabilidad intrínseca se desarrollan bajo condiciones ambientales más favorables a la biodegradación, sobre todo en lo que concierne a la duración del ensayo y al mantenimiento de una viabilidad elevada del inóculo. Lo anterior se logra mediante la adaptación previa del inóculo a la sustancia y la adición de una fuente adicional de carbono. A la fecha, la OCDE ha normalizado tres pruebas de biodegradabilidad intrínseca en medio aerobio: los ensayos SCAS (Semi-Continuous Activated Sludge), Zahn-Wellens y MITI II, descritos en las líneas directrices OCDE 302 A, B y C, respectivamente (Tabla 1.8).

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD INTRÍNSECA DE LA OCDE (1992)

Prueba	Fuente de inóculo	Inóculo (gSST/L)	Compuesto de prueba (mg/L)	Descripción
302 A	Lodos activados y aguas residuales urbanas.	1 -4	20 (mgCOD/L)	Prueba semicontinua con seguimiento del COD.
302 B	Lodos activados lavados	0.2-1	50 -4000 (mgCOD/L)	Prueba discontinua con seguimiento del COD.
302 C	Lodos ^a precultivados con peptona y glucosa.	0.1	30	Prueba respirométrica en un medidor de DBO.
302 D ^b	Suelo y lodos activados	0.05 ^c	20 (mgCOD/L)	Prueba en recipientes cerrados con seguimiento del C inorgánico producido.

^a Obtenidos a partir de 10 muestras naturales diferentes; ^b Prueba en proceso de normalización (OCDE, 2001 a).

^c Valor estimado.

Tabla 1.8. Condiciones experimentales de las normas de biodegradabilidad intrínseca según la OCDE

En la prueba SCAS, una muestra de lodos activados se expone tanto a la sustancia como a un efluente doméstico durante 23 horas, al cabo de las cuales se obtiene el sobrenadante para su análisis en términos de COD. El sobrenadante se reemplaza por un volumen equivalente de efluente doméstico y se añade nuevamente la sustancia de prueba (20 mg COD/L), para reiniciar el ciclo. Debido a su prolongada duración (hasta de 6 meses) y al contacto continuo con el efluente, que funge a la vez como inóculo y fuente alterna de carbono, ésta es una prueba muy adecuada para la determinación de la biodegradabilidad intrínseca.

La prueba Zahn-Wellens se lleva a cabo en modo discontinuo, y se basa también en el seguimiento de la pérdida de COD; sin embargo, utiliza altas concentraciones de la sustancia de prueba (50-400 mg COD/L), que pueden ser tóxicas para los microorganismos.

La prueba MITI II permite evaluar la biodegradabilidad de sustancias insolubles en agua. Sin embargo, al igual que la prueba inmediata MITI I, especifica un protocolo de preparación del inóculo sumamente complicado, que precisa la mezcla de 10 muestras naturales (por ejemplo suelo, agua superficial, lodos activados) y su posterior precultivo con peptona y glucosa en modo semidiscontinuo durante al menos 30 días (OCDE, 1992). Varios autores han descrito que este procedimiento, lejos de aumentar el potencial de biodegradación del inóculo, produce más resultados negativos que otras pruebas con igual concentración de biomasa (Painter, H.A.. 1995).

Recientemente se propuso la prueba CONCAWE (OCDE 302 D) para la determinación de la biodegradabilidad intrínseca de productos derivados del petróleo, y en general de sustancias volátiles y poco solubles. Este ensayo utiliza la misma metodología que la prueba inmediata OCDE 310, pero a diferencia de ésta, utiliza una población microbiana mixta previamente adaptada a la sustancia de prueba y un período de incubación de 8 semanas (OCDE 303 A). Dado que Battersby, N.S. y col. (1999) encontraron que la prueba proporciona resultados con reproducibilidad semejante a la de otras pruebas inherentes, constituye una mejor alternativa que el ensayo MITI II para el estudio de la biodegradabilidad de sustancias insolubles en agua.

Pruebas de simulación

El ensayo OCDE 303 A, que reproduce una planta de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, es la prueba de simulación más utilizada. En esta prueba se determina la velocidad de eliminación de la sustancia (10-20 mgCOD/L), contenida en un agua residual sintética a base de peptona, en un módulo de lodos activados, compuesto básicamente de un reactor agitado con un tiempo de retención de lodos de 6 días y un decantador que separa el agua tratada. La biodegradabilidad de la sustancia se calcula a partir del COD eliminado en un tiempo de residencia hidráulica de 3-6 horas y considerando los resultados de una prueba testigo realizada simultáneamente sin la sustancia.

Un inconveniente de la prueba es que utiliza concentraciones muy elevadas con respecto a las que suelen encontrarse en la mayoría de las plantas de tratamiento, lo que conduce a cinéticas y mecanismos de biodegradación distintos a los que suceden en la realidad. Por tal motivo, Painter, H.A. (1995) sugirió realizar estas pruebas a una concentración aproximada de 10µg/L, lo cual necesita una técnica analítica específica o la sustancia marcada con ¹⁴C. La OCDE también propone una variante de esta prueba, en la cual se simula un sistema de tratamiento de aguas residuales por biomasa fija (OCDE 303 B).

La prueba OCDE 304 A, o pruebas de biodegradabilidad en suelos, fue normalizada por la OCDE en 1981 para determinar la biodegradabilidad intrínseca de sustancias químicas en suelos. Una versión más completa de esta prueba ha sido normalizada recientemente (OCDE 307), que permite estudiar la transformación aerobia y anaerobia en suelos de compuestos para los cuales exista un método analítico de sensibilidad suficiente. Este ensayo implica la adición de la sustancia de prueba, la

cual puede ser o no marcada radiactivamente, a muestras de suelo y su posterior incubación en un biómetro a temperatura y humedad constantes y en ausencia de luz.

A diferentes períodos de incubación se realiza una extracción de las muestras y se determinan los contenidos de la sustancia de prueba y de los principales productos de degradación. Los productos volátiles deben ser colectados absorbiéndolos en los medios apropiados para su posterior cuantificación. Cuando se usa la sustancia marcada con ^{14}C es posible medir su velocidad de mineralización mediante el $^{14}\text{CO}_2$ producido. Para el estudio de las rutas de biodegradación de una sustancia es suficiente realizar la evaluación con un solo tipo de suelo por un período no mayor de 120 días.

Para la determinación de velocidades de biodegradación se aconseja realizar las pruebas con al menos tres tipos de suelo diferentes en su contenido de C orgánico, pH, contenido de arcilla y concentración de biomasa; estos tipos de suelo deben ser representativos del medio receptor de la molécula que se evalúa y en este caso la duración del estudio puede alargarse hasta 6 o 12 meses.

Se ha encontrado que la adición de una sustancia fácilmente biodegradable estimula la degradación de la materia orgánica nativa del suelo, lo que se conoce con el nombre de imprimación (Alexander, M., 1977). El uso de sustancias marcadas al ^{14}C permite eliminar este error, al evaluar únicamente el CO_2 producto de la degradación de la sustancia.

En virtud de las particularidades del medio marino, sobre todo en lo que respecta a las características de las bacterias responsables de los procesos de biodegradación, la OCDE propone una prueba de simulación de este compartimiento ambiental (OCDE 306). Esta prueba estática usa agua marina como medio e inóculo a la vez, y existe en dos variantes: el ensayo en matraz agitado que mide el consumo de COD durante 60 días, y la prueba de DBO en botella cerrada, con una duración de 28 días. Dado que se utiliza el compuesto de prueba como única fuente de carbono y de energía, así como una cantidad muy reducida de biomasa, frecuentemente se considera este método como una prueba de biodegradabilidad inmediata (Nyholm, N., 1991).

Los sedimentos naturales son el receptáculo final de un gran número de sustancias químicas descargadas al medio acuático, principalmente de aquellas que por su hidrofobicidad se adsorben a la materia particulada. La prueba OCDE 309, diseñada para evaluar la biodegradabilidad aerobia de compuestos a bajas concentraciones

(<100 µg/L) en aguas superficiales, es un ensayo en matraz agitado que contempla la adición de sedimento (1 g/L) para simular la interfase sedimento/agua.

La biodegradación se mide mediante el seguimiento de la molécula de prueba marcada con ^{14}C o del $^{14}\text{CO}_2$ producido, o utilizando técnicas analíticas lo suficientemente sensibles, durante un máximo de 60 días. En función del medio que se pretenda estudiar, el sedimento puede caracterizarse por un elevado contenido en carbono orgánico (2,5-7,5%) y una textura fina (contenido de arcillas >50%), o bien por un contenido en C orgánico reducido (0,5-2,5%) y una textura gruesa (contenido de arcillas <50%).

En un ensayo más complejo (OCDE 308), la OCDE propone la simulación de las diferentes condiciones que pueden prevalecer en un sistema sedimentario. En una de sus dos variantes, la prueba simula una columna de agua aerobia con una capa subyacente de sedimento sujeta a un gradiente de O_2 . En la otra variante, se simula un sistema agua-sedimento completamente anaerobio. Esta prueba permite, si se utiliza la molécula marcada con ^{14}C , la identificación y cuantificación de los productos de transformación, así como su distribución en las fases sólida y líquida. Los sedimentos deben caracterizarse en función del pH, contenido en carbono orgánico, potencial redox y concentración de biomasa.

En estudios anteriores (OCDE, 1981) se ha encontrado que algunos ambientes anaerobios (por ejemplo en sedimentos) están sujetos a concentraciones de contaminantes mayores que los ambientes aerobios. Además se ha evidenciado que los microorganismos anaerobios son metabólicamente más versátiles de lo que se creía (Caldwell, M.F. y col., 1998; Anderson, R.T. y Lovley, R.D., 2000), lo cual ha incentivado el estudio y la aplicación de sistemas anaerobios para el tratamiento y la evaluación de la biodegradabilidad de una gran variedad de contaminantes.

Para tal efecto la OCDE propuso el método OCDE 311. El método consiste en incubar en recipientes herméticos, durante 60 días a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, lodos provenientes de un digestor anaerobio (1-3gSST/L; SST: sólidos suspendidos totales) en presencia de una concentración de 20 a 100 mgC/L de la sustancia de prueba. La cuantificación de la presión ejercida por los gases producto de la biodegradación anaerobia (como el CO_2 y CH_4) permite calcular el grado y la velocidad de degradación de la sustancia. Como control se emplean sustancias de referencia fácilmente biodegradables, tales como fenol o benzoato de sodio.

Cuando se desconoce si la sustancia es tóxica para los microorganismos anaerobios, se recomienda un control adicional en el que se adicionan la sustancia de prueba y la de referencia en la misma concentración; así mismo, cuando se trabaja con una sustancia poco soluble y se emplea un disolvente, debe incluirse un control en el que se adicionan el disolvente, el medio de cultivo y el inóculo. Este método también considera el empleo de un inóculo preadaptado a la sustancia de estudio, cuando se sospecha que ésta no es fácilmente biodegradable.

El método OCDE 311 está limitado a la evaluación de un sistema metanogénico; sin embargo los microorganismos anaerobios pueden utilizar una variedad de aceptores finales de electrones (por ejemplo nitratos, sulfatos, Mn y Fe), los cuales están presentes en ambientes naturales y en aguas residuales industriales. Además, no puede asumirse que el potencial metabólico en un ambiente anaerobio es el mismo con los diferentes aceptores finales de electrones (Strevett, K. y col., 2002). Por ejemplo, Hee-Sung, B. y col. (2002), al estudiar la biodegradación de pirrolidina y piperidina en ambientes desnitrificantes, sulfatorreductores y metanogénicos, observaron una degradación completa en el ambiente desnitrificante y ninguna degradación en los otros dos ambientes después de seis meses. Otra limitante del método OCDE 311 es en relación al medio de cultivo, el cual carece de compuestos orgánicos (por ejemplo vitaminas y aminoácidos), los cuales pueden ser requeridos por los microorganismos anaerobios para su óptimo crecimiento (Colleran, E. y Pender, S., 2002).

Sin duda, el inóculo es el factor que más afecta la reproducibilidad de las pruebas de biodegradabilidad, especialmente en el caso de las pruebas inmediatas. Estas pruebas sólo hacen tres especificaciones respecto al inóculo: (OCDE, 1993).

- debe ser de origen natural,
- su densidad no debe ser mayor a 30mgSST/L
- no debe tener contacto previo con el compuesto de prueba.

Lo anterior permite la inoculación con aguas superficiales, lodos activados, aguas residuales domésticas, lixiviados de suelo e incluso con una mezcla de éstos (Tabla II), con la única reserva de que los lodos activados se aconsejan para las pruebas con concentraciones de biomasa elevadas (OCDE 301 A, B y F), y las aguas residuales para las pruebas a baja densidad microbiana (OCDE 301 D y E). Por otra parte, el nivel de inoculación se especifica únicamente en términos de relación volumétrica, mientras que no se exige una verificación de la masa celular introducida al ensayo. Tal

falta de control del inóculo se refleja en los resultados de las pruebas, ya que la concentración microbiana inicial define la cinética de biodegradación (Simkins, S. y Alexander, M., 1984), el grado de mineralización de la sustancia (Vázquez-Rodríguez, G. y col., 1999) y, por ende, la obtención de un resultado positivo en la prueba.

Para mitigar este problema, se ha sugerido el uso de inóculos preadaptados a la sustancia que se evalúa (Thouand, G. y col., 1996). Por tal motivo, la prueba inmediata OCDE 310 contempla la utilización de inóculos preadaptados, a condición de que esto se especifique en el informe de los resultados. Una sustancia que presenta un resultado positivo en tales condiciones se considera “intrínsecamente biodegradable”, ya que es posible que se biodegrade rápidamente sólo en los medios que reciban aportes continuos de dicha sustancia.

En conjunto las pruebas de biodegradación presentan una serie de dificultades que se deben tener en cuenta:

- El control del inóculo de las pruebas de biodegradabilidad inmediata implica conciliar dos requisitos aparentemente opuestos que son la presencia de un espectro amplio de microorganismos y el “comportamiento reproducible” del inóculo, al menos respecto a las moléculas de referencia positiva, lo que hasta la fecha no se ha conseguido. Aunque la variabilidad de los resultados de las pruebas inmediatas es posiblemente un reflejo de lo que sucede en el medio natural, deben conducirse más estudios que apoyen o refuten el poder predictivo de estas pruebas a escala ambiental.

- La normalización de las pruebas de biodegradabilidad enfrenta un problema que es inherente a cualquier intento de simulación ambiental in vitro. Cuando se pretende integrar en el laboratorio el mayor número de variables, buscando reflejar la complejidad real de los fenómenos naturales, disminuye también la posibilidad de construir métodos reproducibles y por lo tanto susceptibles de normalización. Así, las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza.

- No obstante, es posible cambiar ciertas prácticas que en un principio tuvieron como propósito la fácil implementación de las pruebas y que ahora limitan el uso de los datos que proporcionan. Por ejemplo, es necesario modificar la expresión de los resultados cinéticos de las pruebas (usualmente en términos de tiempo de latencia y nivel máximo de biodegradación), de modo que éstos puedan usarse en la predicción

cuantitativa del comportamiento de las sustancias. La aplicación de modelos cinéticos y su validación a distintas concentraciones de la sustancia sería de gran utilidad para el análisis cuantitativo del riesgo ambiental asociado a su dispersión.

- Otro aspecto importante que debe considerarse es el uso de la sustancia de prueba como única fuente de carbono. Lo anterior conduce a una subestimación de su potencial de degradación, ya que en el medio natural son frecuentes los procesos cometabólicos. La adición de una fuente de carbono fácilmente asimilable (por ejemplo glucosa) podría aumentar la relevancia de los resultados de las pruebas, aunque por otra parte haría indispensable el uso de una técnica analítica específica para el seguimiento de la molécula de interés.

Todas las pruebas normalizadas han sido diseñadas para considerar la sustancia de prueba como fuente de C. Sin embargo, ciertos compuestos orgánicos pueden también constituir fuentes de N, P o S. Con algunas modificaciones a los métodos, sobre todo en lo que respecta al medio de cultivo, podría conocerse más acerca de la biodegradabilidad de dichos compuestos.

Las pruebas de biodegradabilidad inmediata, por su simplicidad, son las más utilizadas y referenciadas en la literatura especializada. Por ello, sus principales inconvenientes ya han sido detectados y revisados, y se ha normalizado un método (OCDE 310) como alternativa a la limitada prueba OCDE 301 B. Aunque han sido menos aplicadas, la situación de las pruebas inherentes es semejante. Con la normalización de la prueba CONCAWE se superarán las desventajas de la prueba MITI II, y se dispondrá de un método confiable para el ensayo de compuestos volátiles y poco solubles.

En contraste, a excepción de las pruebas OCDE 306 y OCDE 311, las pruebas de simulación implican un alto costo que limita su aplicación y por ende su optimización por parte de los usuarios. No obstante, es de importancia que se mejoren las pruebas de simulación disponibles, y que se propongan nuevos métodos que reproduzcan de manera realista, y más económica, los medios receptores de sustancias químicas. Entre los medios susceptibles de ser normalizados destacan los anaerobios en presencia de distintos aceptores finales de electrones (como nitratos, sulfatos, Mn o Fe).

Una mayor aplicación de las pruebas de biodegradabilidad en general, y de las de simulación en particular, contribuirá sin duda a aumentar el conocimiento acerca del comportamiento ambiental de las sustancias químicas.

2.- OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo se centra en el estudio y comparación de diferentes métodos de análisis de la toxicidad y la biodegradabilidad de compuestos recalcitrantes en aguas residuales.

Se evaluará la eficacia de los procesos avanzados de oxidación (PAO_s), fotocátalisis heterogénea con TiO₂ y procesos fotoFenton, sobre disoluciones de algunos compuestos caracterizados por su elevada toxicidad y baja biodegradabilidad, como son algunos plaguicidas y aguas industriales de recubrimiento de metales con elevado contenido en cianuros.

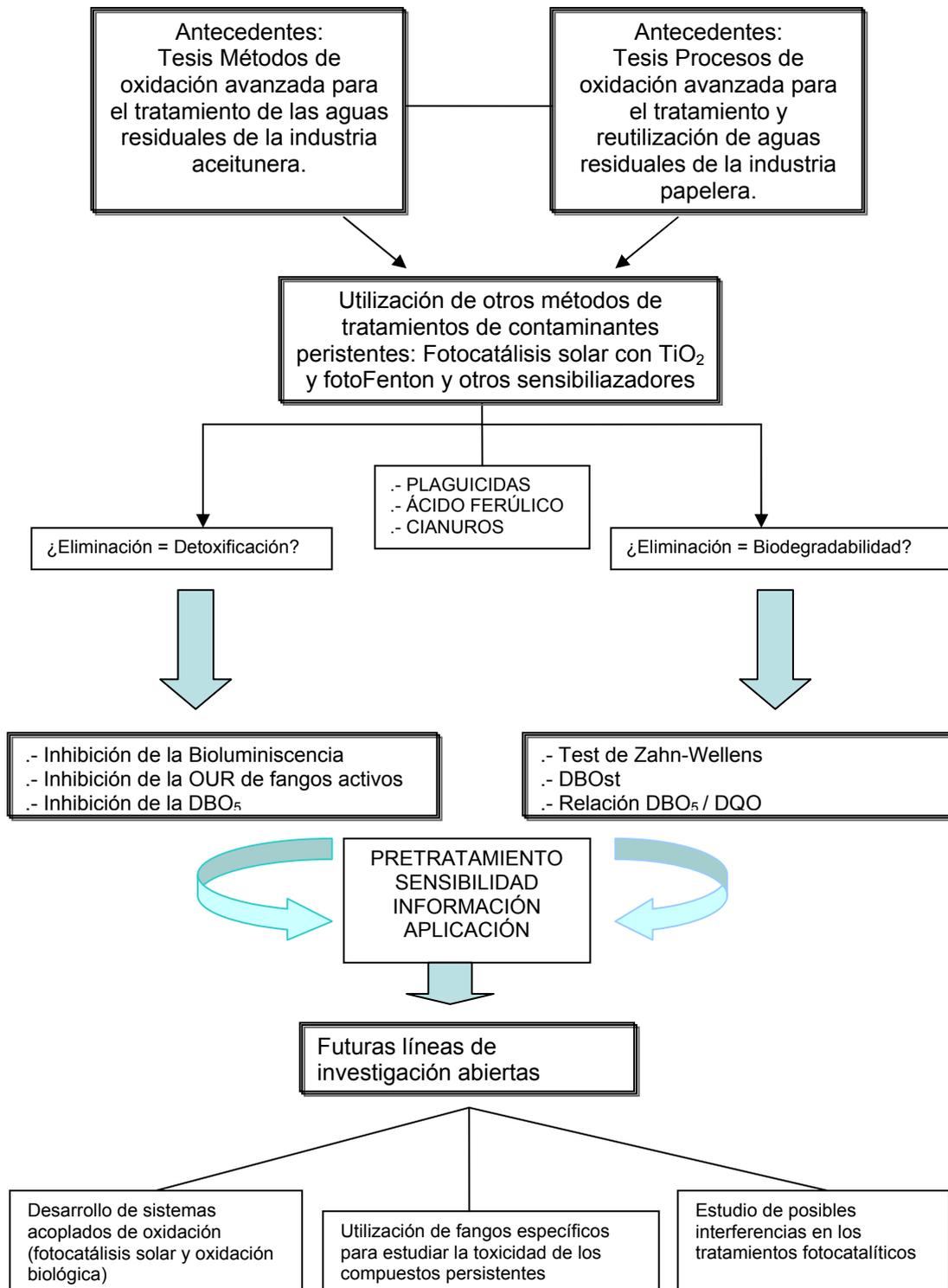
Para ello se desarrollaran los siguientes objetivos específicos en cada uno de los procesos experimentales:

- 1.- Caracterización de la toxicidad y de la biodegradabilidad del contaminante estudiado.
- 2.- Control del proceso de detoxificación y obtención de las muestras.
- 3.- Estudio de la toxicidad de las diferentes muestras obtenidas por fotocátalisis y proceso fotoFenton.
- 4.- Estudio de la biodegradabilidad de las distintas muestras obtenidas en los procesos de fotocátalisis y fotoFenton.
- 5.- Comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos de medida de la toxicidad.
- 6.- Comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos de medida de la biodegradabilidad.

3.- PLANIFICACIÓN DE LA **INVESTIGACIÓN**

3.- PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio de la evolución de la toxicidad y biodegradabilidad de contaminantes persistentes en medios acuosos durante un proceso de fotocátalisis solar empleando diferentes técnicas analíticas



4.- METODOLOGÍA **EXPERIMENTAL**

4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1.- REACTIVOS

Se han utilizado tres tipos de contaminantes en disolución acuosa para comprobar la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada (en concreto la fotocatalisis solar con TiO₂ y los procesos fotoFenton) y poder comparar los diferentes métodos de análisis de la toxicidad y la biodegradabilidad:

- Plaguicidas, comerciales y sus principios activos
- Aguas residuales de la industria de recubrimientos metálicos
- Compuestos fenólicos, como el ácido ferúlico

Plaguicidas

Se han utilizado varios tipos de plaguicidas organofosforados como el dimetoato, metidation o el metil-oxidemeton y otros del tipo de los carbamatos como el carbaril. En la Tabla 4.1 aparece resumido, el nombre del plaguicida comercial, el del principio activo que contiene, en qué porcentaje está presente este principio activo en el plaguicida comercial, y la procedencia:

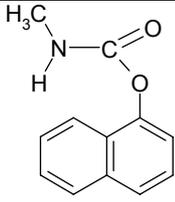
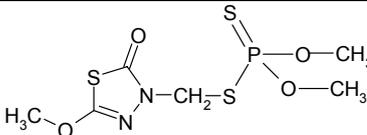
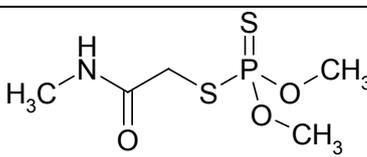
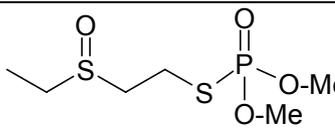
PRODUCTO COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	ESTRUCTURA QUÍMICA	RIQUEZA	PROCEDENCIA
SEVNOL	CARBARIL		85% (p/p)	MAFA
ULTRACID®	METIDATION		40% (v/v)	SYNGENTA
LAITON	DIMETOATO		40% (v/v)	LAINCO S.A.
METASYSTOX	METIL- OXIDEMETON		25% (p/v)	BAYER

Tabla 4.1. Plaguicidas utilizados

Efluentes de aguas residuales industriales de recubrimientos metálicos

Los efluentes de aguas residuales obtenidos de una industria de recubrimientos metálicos, presentan como características específicas un elevado contenido en cianuros, junto con elevados contenidos de metales como cobre, níquel, zinc, etc. En general presentan fuerte coloración, un valor de pH alto y con un contenido bajo de materia orgánica (menos de 30 mg COD/L). Las aguas fueron obtenidas de una empresa de la zona, sus características son: un contenido en CN^- entre 500-800 mg/L, CN^- libre entre 100-150 mg/L, entre 150-250 mg/L de Cu^{2+} , trazas de otros metales (como Zn^{2+} , Ni^{2+}), un pH entre 10,5-11 y una conductividad elevada con valores entre 2,2-2,5 mS/cm.

Compuestos Fenólicos (Ácido Ferúlico)

El ácido ferúlico (ácido 3-hidroxi-4-metoxicinámico, ver Figura 4.1) es un compuesto fenólico, comúnmente encontrado en las aguas residuales de la industria agroalimentaria (por ejemplo en alpechines). Se ha obtenido de Aldrich (isómero trans con un 99% pureza).

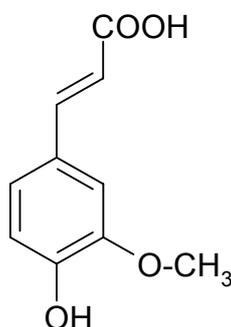


Figura 4.1. Estructura Química del Ácido Ferúlico

Fotocatalizador (Dióxido de Titanio y Acridine Yellow G)

El dióxido de titanio utilizado como fotocatalizador es el Aeroxide® TiO₂ P-25 (CAS n° 13463/67/7), obtenido de la empresa Degussa, con las siguientes características:

- superficie específica (BET) 50±15 m²/g
- densidad aparente 130 g/L
- porcentaje de humedad < 1.5%
- pH (4% en agua) 3.5-4.5

El colorante orgánico utilizado como fotocatalizador es el Acridine Yellow G (AYG), cuya estructura química es la siguiente (Figura 4.2):

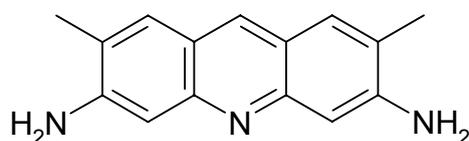


Figura 4.2. Estructura Química del Acridine Yellow G (AYG)

Reactivos Químicos

La mayoría de reactivos químicos generales que se utilizan en este trabajo tienen una pureza analítica, incluso en algunos casos, de grado cromatográfico, dependiendo de la necesidad de la técnica analítica utilizada. En la Tabla 4.2 se presentan estos productos, indicando su fórmula química, su procedencia, su grado de pureza así como su utilización en los distintos métodos analíticos utilizados:

PRODUCTO	FÓRMULA QUÍMICA	ORIGEN	TIPO	UTILIZACIÓN
Hidróxido sódico	NaOH	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Dihidrogenofosfato potásico	KH ₂ PO ₄	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Monohidrogenofosfato potásico	K ₂ HPO ₄	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Monohidrogenofosfato sódico	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Cloruro amónico	NH ₄ Cl	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Sulfato magnésico	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Cloruro cálcico	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
Cloruro férrico	FeCl ₃ · 6H ₂ O	Prolabo	99% pureza	Ensayos Biológicos
N-Aliltiurea	C ₄ H ₈ N ₂ S	Merck	98% pureza	DBO ₅
D+ Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Panreac	Anhidra Pura	DBO ₅

L- Ácido Glutámico	$C_5H_9NO_4$	Merck	P.A. Bioquímica	DBO ₅
Monohidrogenoftalato potásico	$C_6H_5O_4K$	Prolabo	99,5% pureza	DQO
Acetato sódico	$NaC_2O_2H_3$	Panreac	99% pureza	Respirometría
Dietilenglicol	$C_4O_3H_{10}$	Panreac	99% pureza	Test Zahn-Wellen
Metanol	CH_3OH	Sigma – Aldrich	Grado Cromatográfico	HPLC
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	Sigma – Aldrich	Grado Cromatográfico	HPLC
Ácido clorhídrico	HCl	Prolabo	37% pureza y d=1,19 kg/L	Control pH
Cloruro potásico	KCl	CRISON	0,01 M (1413 μ S/cm a 25°C)	Conductividad
Disolución estándar de pH	pH 7	Crison	Estándar	pH
Disolución estándar de pH	pH 4	Crison	Estándar	pH
Kit para DQO: Dicromato potásico Ácido sulfúrico Sulfato de plata Sulfato mercúrico	$K_2Cr_2O_7$ H_2SO_4 Ag_2SO_4 $HgSO_4$	Merck	Rango de medida: 25-1500 mgO ₂ /L	DQO
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Prolabo	99% pureza	fotoFenton
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Panreac	30% (v/v)	fotoFenton
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Prolabo	99% pureza	<i>Vibrio fischeri</i>
Cloruro sódico	NaCl	Prolabo	Disolución	<i>Vibrio fischeri</i>

Tabla 4.2. Reactivos Generales utilizados

Fangos Activos

Los fangos activos utilizados proceden del reactor biológico de la estación depuradora de aguas residuales de Els Algars, de tipo doméstico e industrial. En el laboratorio fueron mantenidos con aireación continua y alimentados ocasionalmente con acetato

sódico. Se utilizaron preferentemente entre 24-48 horas después de su recogida. Presentaban un valor de sólidos sedimentados totales de entre 2-4 g/L.

Bacterias Luminiscentes

Las cepas de bacterias luminiscentes utilizadas en el ensayo de inhibición de luminiscencia, para determinar la toxicidad de las muestras, pertenecen a la especie marina *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, suministradas por Macherey-Nagel GMBH & Co. KG. Se encuentran en forma de reactivos comerciales liofilizados, siendo conservadas en un congelador entre -18°C y -20°C. *Vibrio fischeri* ha sido clasificada, según la hoja informativa B006 1/92 ZH 1/346 de la Asociación profesional de la industria química, en el grupo de riesgo 1, es decir que no supone ningún riesgo para las personas y para los animales vertebrados.

Gases

El oxígeno utilizado para la combustión en el ensayo de determinación del carbono orgánico disuelto (COD), suministrado por Praxair, presenta una pureza del 99% y contiene menos de 1 mg/L de CO₂, CO e HC y previamente humedecido.

Agua Ultrapura

El agua ultrapura (grado Mili Q) utilizada para todas las disoluciones necesarias para las determinaciones analíticas, fue obtenida de un equipo Millipore Elix 3510, y sus principales características son:

- COT menor de 30 µg/L
- Resistividad de entre 10-15 MΩ·cm

Filtros de membrana de polipropileno

Las muestras tratadas son filtradas para su posterior análisis según los diferentes métodos analíticos utilizados. Los filtros que se utilizan son proporcionados por WTW y son filtros de membrana de propileno, con un tamaño de poro de 0,45 µm y un diámetro de 25 mm.

4.2.- EQUIPOS DE ANÁLISIS

Los equipos de análisis utilizados en todo este trabajo se encuentran ubicados en los laboratorios que el Departamento de Ingeniería Textil y Papelera tiene en la Escuela

Politécnica Superior de Alcoy, tanto en los laboratorios docentes de química general e instrumental, como en el laboratorio de investigación del grupo de oxidación avanzada.

Balanza Analítica

La balanza electrónica (Figura 4.3), de tipo analítico, empleada para la medida de todas las sustancias sólidas utilizadas en este trabajo, han sido de la marca comercial SARTORIUS, con un rango de medida de hasta 200 g y una sensibilidad de 0,1 mg.



Figura 4.3. Balanza Analítica

Estufa

La estufa (Figura 4.4) utilizada para la caracterización de los fangos, midiendo los sólidos en suspensión totales (SST) según Standard Methods 2540-D, ha sido de la marca BINDER modelo ED23. Es una estufa de circulación de aire natural, con posibilidad de rampa de temperatura, con una T^a máxima de $300 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Figura 4.4. Estufa para determinación de SST

Bomba de vacío

La bomba de vacío empleada en la medida de los sólidos en suspensión totales de fangos activos ha sido de la marca DINKO, modelo D-95, con una rampa de vacío de WTW con placa de filtro de 90 mm de diámetro (Figura 4.5). Los filtros utilizados se describieron en el apartado anterior, y las medidas de peso se realizaron, después de dejar reposar los filtros en un desecador hasta alcanzar un peso constante, con la balanza analítica arriba descrita.



Figura 4.5 Trampa de vacío para determinación de SST

La norma estandarizada empleada ha sido Standard Methods 2540-D.

pHmetro

El equipo empleado ha sido un pHmetro CRISON modelo micropH 2002 (Figura 4.6), como el de la figura, con electrodos de pH de vidrio, electrodo de referencia y compensador de temperatura:



Figura 4.6. pHmetro

La norma estandarizada empleada ha sido Standard Methods 4500-H.

Conductímetro

El conductímetro empleado ha sido de la marca CRISON, modelo microCM 2101 (Figura 4.7), con célula de conductividad en electrodo de platino y con compensador automático de la temperatura.



Figura 4.7. Conductímetro

La norma estandarizada empleada ha sido Standard Methods 2510-B

Electrodo de cianuros

El electrodo de cianuro está compuesto de un electrodo selectivo de cianuros y un electrodo de referencia. La medida se realiza según Standard Methods 4500-F.



Figura 4.8. Electrodo de CN^-

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

La determinación analítica de los plaguicidas y del ácido ferúlico se realizó por cromatografía líquida (Perkin Elmer Hitachi XL Autosystem, modelo D-7000, equipado con un detector diode-array y automuestreador) (Figura 4.9). Se utilizó una columna de fase reversa (LiChrosphere 100 RP-18). Con objeto de evitar adsorciones sobre el dióxido de titanio, las muestras se diluyeron con metanol (1:1) y antes de ser inyectadas se filtraron a través de filtros de propileno (0,45 μm). Como fase móvil se emplearon diferentes mezclas isocráticas de ácido sulfúrico 0,01M (A) y metanol (B). 50% de A y 50% de B, para Metasystox y Laition, 60% de A y 40% de B para Ultracid y 48% de A y 52 % de B para Sevnol. En todos los casos, el flujo fue de 1 mL/min.

Para el análisis del ácido ferúlico se utilizó el mismo equipo de análisis y columna. En este caso el eluyente consistió en el siguiente gradiente de ácido sulfúrico 0,01M (A) y metanol (B): 100% de A hasta los 5 min, un gradiente lineal hasta llegar a 20% de A y 80% de B hasta los 20 min y manteniendo esta proporción hasta el final del análisis. El flujo fue de 1 mL/min durante todo el análisis. La absorbancia se midió a 280 nm



Figura 4.9. Equipo de Cromatografía de Alta Presión (HPLC)

En todos los casos la identificación y cuantificación de los compuestos se realizó por comparación de tiempos de retención y áreas, tras inyección de patrones de concentración conocida.

Analizador de Carbono Orgánico Total (COT)

Los análisis se realizaron en un equipo Shimadzu modelo TOC-VCSH (Figura 4.10) que permite cuantificar la materia orgánica presente en una muestra líquida o sólida. Consta de una válvula de inyección automática, un horno que puede calentar hasta 950°C, un catalizador de platino sobre un soporte de alúmina, una trampa (scrubber) para halógenos y un deshumidificador, un recipiente para ácido fosfórico (necesario para acidificar la muestra y medir el carbono inorgánico, CI), entrada y salida del gas para la combustión catalítica, oxígeno, y un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR) conectado a un registrador y analizador automático.



Figura 4.10. Analizador de Carbono Orgánico Total (COT)

El analizador de carbono contiene un generador de ozono (y un equipo térmico de destrucción del ozono), para poder medir la cantidad de nitrógeno total, por la reacción del ozono con los compuestos nitrogenados, y posterior quimioluminiscencia que se detecta en el IR con un pico a 1200 nm.

Respirómetro

Para realizar las medidas de respiración de los fangos activos se utilizó Respirómetro NEURTEK Medio Ambiente S.A., modelo BM3-LAB (Figura 4.12). El modo de trabajo fue en automático y en discontinuo en circuito hidráulico cerrado. Ello significa que el fluido circula de forma repetitiva sobre un mismo circuito, que consta de:

- depósito aireado (ida)
- celda de flujo con sensor de oxígeno disuelto
- cámara de reacción no aireada

- sistema de conmutación
- depósito aireado (vuelta)

Después de que las muestras pasen por cada uno de los ciclos y por un mismo sistema de análisis, se llevan a cabo las medidas que darán lugar a los correspondientes cálculos o determinaciones. Un esquema de este ciclo está representado en la Figura 4.11.

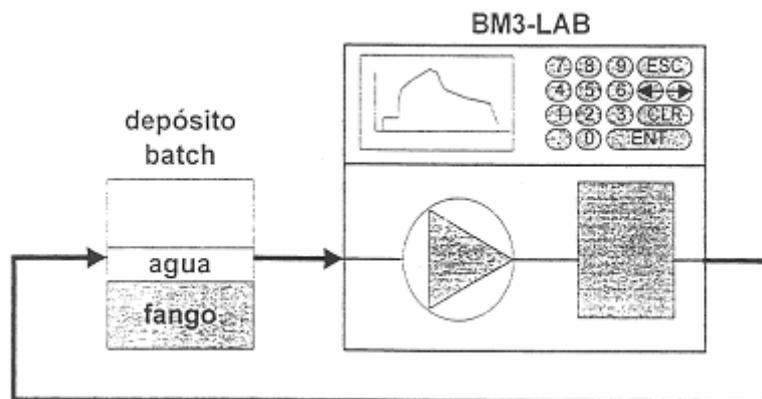


Figura 4.11. Esquema de funcionamiento del respirómetro (cortesía de NeurteK Medio Ambiente S.A.)

El funcionamiento del respirómetro está basado en la medida automática y continua de la tasa de respiración de los fangos activos ($\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$). Para ello se llevan a cabo de forma secuencial las medidas de oxígeno disuelto (ISO 5814, 1990) a la entrada de la cámara de reacción (OD1) y oxígeno disuelto a la salida de la cámara de reacción (OD2). El oxímetro utilizado es de tipo polarográfico, con un electrodo de membrana donde el elemento sensor está protegido por una membrana plástica de polietileno y fluorocarbono. La corriente difusora es linealmente proporcional a la concentración de oxígeno; esta corriente se transforma linealmente en unidades de concentración, por medio de varios procedimientos de calibración. Un cátodo inerte de oro como soporte, facilita la reducción del oxígeno disuelto de la muestra, mientras el ánodo de plomo se utiliza como fuente de electrones, puesto en contacto todo ello con una disolución fuertemente alcalina de KOH. El oxímetro tiene un método de compensación automática de la T^a y de la salinidad.



Figura 4.12. Respirómetro de laboratorio BM3-LAB

Analizador de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

Para medir la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) utilizamos unos recipientes de incubación de vidrio borosilicatado opacos (botellas para la DBO). Las botellas tienen hasta 500 mL de capacidad, cerradas en la parte superior de forma hermética. En este caso para medir la presión del interior se utilizó OXITOP[®] (Figura 4.13).



Figura 4.13. Equipo para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno

Las botellas de DBO de la marca WTW, están calibradas y en ellas se puede colocar, en la parte superior, un recipiente de plástico con una trampa alcalina (NaOH o KOH sólidos) que permite que se produzca la depresión en el interior de la botella debido al

consumo de oxígeno por los microorganismos y posterior absorción del dióxido de carbono producido. Estos recipientes deben de colocarse en un refrigerador termostataado para mantener la temperatura a 20°C, y sobre unos agitadores magnéticos que mantengan la agitación homogénea en el interior de las botellas.

El OXITOP® consiste en un sensor de presión piezoresistivo electrónico, que registra automáticamente los datos de presión de modo continuo, registrando valores cada 24 horas durante cinco días.

Analizador de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) se ha utilizado unos tubos Corning de vidrio Pirex (Figura 4.14. a), de 16x100 mm con 10 mL de capacidad, de calidad óptica, donde se produce la digestión de la muestra a analizar. Estos tubos, cerrados con tapón de rosca hermético y junta de teflón, se colocan en un bloque termorreactor MERCK modelo TR 300 (Figura 4.14. b), con controlador automático de la temperatura.



Figura 4.14.a Tubos Corning



Figura 4.14.b Termoreactor

Para analizar los resultados obtenidos en la digestión de la muestra se utiliza un fotómetro, modelo SPECTROQUANT® PHOTOMETER NOVA 60 (Figura 4.15), que contiene 12 filtros a 340, 410, 445, 500, 525, 550, 565, 605, 620, 665, 690 y 820 nm. Su reproducibilidad oscila entre 0,001 UA y 1'000 UA y una resolución de 0,001 UA. Está equipado con unas celdas para cubetas rectangulares de 10, 20 y 50 mm y para cubetas redondeadas de 16 mm.



Figura. 4.15. Fotómetro

El fotómetro NOVA 60 mide las absorbancias o transmitancias de las muestras, y utilizando el software correspondiente (basados en la ley de Lamber-Beer y la resolución de un ajuste por mínimos cuadrados de la relación entre la medida obtenida y unos patrones previamente utilizados) puede dar los resultados en mgO_2 / L de forma directa.

Luminómetro

El equipo utilizado para la medida de la intensidad de la bioluminiscencia emitida por *Vibrio fischeri* es un fotomultiplicador, BioFix[®] Lumi-10 Macherey-Nagel GMBH & Co. KG (Figura 4.16), con un detector de fotones de alta sensibilidad (ultra fase single photon counter) que trabaja a una longitud de onda entre 380-630 nm. El equipo, que presenta un display gráfico y puede ser conectado a un ordenador a través de un cable RS232.



Figura 4.16. Luminómetro

El equipo puede efectuar una serie de ensayos de toxicidad, mutagenicidad e incluso ensayos de biología molecular y bioquímicos, gracias al software integrado que presenta. Los resultados se pueden mostrar opcionalmente en forma de % de inhibición, % de estimulación o unidades relativas de luz (RLU, siglas debido a la forma en inglés, relative Light units). Las cubetas de medida pueden ser de 50x12 mm o también de 75x15 mm. Las que nosotros utilizamos en nuestros ensayos son las de 50x12 mm.

4.3.- PLANTAS PILOTO DE TRATAMIENTO

Para este trabajo se han utilizado tres plantas piloto para realizar la fotocatalisis solar y los procesos de fotoFenton:

- dos de ellas situadas en la azotea de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy, se han utilizado para la eliminación de los plaguicidas y el ácido ferúlico
- la otra situada en una empresa de recubrimientos metálicos, en el término municipal de Ibi (Alicante), se ha utilizado para la eliminación de cianuros de sus aguas residuales.

Planta piloto de fotocatalisis solar de 4L

La planta solar de 4L SOLARDETOX[®] ACADUS-2005/0.25 (Figura 4.17) es una pequeña planta de fotocatalisis, realizada totalmente en aluminio anodizado, lo que asegura una gran resistencia a la corrosión. Tiene acoplado un radiómetro ACADUS 85, que consta de un sensor ultravioleta de teflón, de tipo fotométrico (fotodiodos tipo Ga-As-P, de difusión, con filtro incorporado, rango de respuesta entre 300-400 nm con un pico de medición a 370 nm). La radiación solar se mide en unidades de potencia/superficie (W/m^2) y se integra automáticamente por el LS-3300 para indicar la energía recibida ($W\cdot h/m^2$), en el rango ultravioleta cercano. La planta solar de 4L presenta una bomba centrífuga impulsora PanWorld 5PX-Z de propileno reforzado con fibra de vidrio con rotor cerrado y de escasa potencia (11W), que requiere un volumen mínimo de 3,5L para evitar problemas de burbujas de aire. Tiene 4 tubos de borosilicato, de 750 mm de longitud y 32 mm de diámetro, con un volumen de 2L cada tubo, siendo el volumen irradiado de 1,8L. Los tubos están sobre una superficie de espejos de aluminio tipo CPC de 1 (un) sol de concentración y presentan una inclinación de 30°. La superficie útil irradiada es de 0,257 m² y el rango de volumen de trabajo varía entre 3,5-4,3 L siendo la temperatura máxima de trabajo de 55°C.



Figura 4.17. Planta piloto de fotocátalisis solar de 4L.

Planta piloto de fotocátalisis solar de 24L

La planta solar de 24L es una SOLARDETOX[®] ACADUS-2001 (Figura 4.18), proporcionada por Ecosystem, es una planta solar de fotocátalisis que presenta características similares a la anterior. El radiómetro utilizado para medir la intensidad solar es idéntico a la de planta de 4 L, pero la bomba es un poco diferente, ya que es una bomba centrífuga impulsora PanWorld 100PX-X de propileno reforzado con fibra de vidrio y arrastre magnético y de mayor potencia que la anterior (140 W), que requiere un volumen mínimo de 22L para evitar problemas de burbujas de aire. Tiene 16 tubos de borosilicato, de 1500 mm de longitud y 32 mm de diámetro, con un volumen de 16L cada tubo, siendo el volumen irradiado de 15,1L. Los tubos están sobre una serie de espejos de aluminio tipo CPC de 1 (un) sol de concentración y presentan una inclinación de 30°. La superficie útil irradiada es de 2,15 m² y el rango de volumen de trabajo varía entre 22-32L.



Figura 4.18. Planta piloto de fotocátalisis solar de 24L

Planta piloto de fotocátalisis solar de 50L

La planta solar de 50L es una SOLARDETOX® ACADUS-2006 (Figura 4.19), también fabricada por Ecosystem, es una planta solar de fotocátalisis con características similares a las de la planta de 24L, ya que está formada por dos mitades de 24L acopladas. Tiene el mismo radiómetro para medir la intensidad solar y la misma bomba. En este caso requiere un volumen mínimo de 40L para evitar problemas de burbujas de aire. Tiene 24 tubos de borosilicato, de 1500 mm de longitud y 32 mm de diámetro, con un volumen de 16L cada tubo, siendo el volumen irradiado de 15,1L. Los tubos están cubiertos con espejos de aluminio tipo CPC de 1 (un) sol de concentración y presentan una inclinación de 45°. La superficie útil irradiada es de 3 m² y el rango de volumen de trabajo varía entre 40-50L.



Figura 4.19 Planta piloto de fotocátalisis solar de 50L

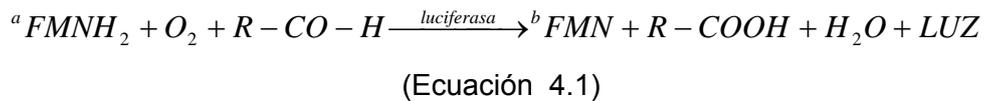
4.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD

4.4.1. DETERMINACION DE LA INHIBICIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE *Vibrio fischeri*

Basado en la norma ISO 11348-3, 1998. Hay que destacar que se dictó esta tercera sección de la norma debido a la diferente sensibilidad que demuestran los ensayos con *Vibrio fischeri* según sea su procedencia. Está dedicada al estudio de éste método de análisis de toxicidad utilizando bacterias liofilizadas, para diferenciar la metodología con bacterias deshidratadas (ISO 11348-2 1998) y con bacterias de preparación reciente (ISO 11348-1, 1998).

El fundamento de este método es determinar la inhibición de la luminiscencia producida por cultivos de *Vibrio fischeri* mediante un ensayo de lotes, mezclando en una cubeta volúmenes iguales de la muestra a analizar, o de sucesivas diluciones, con una suspensión de bacterias luminiscentes. La medida de la intensidad de la luminiscencia se realiza en el Luminómetro BioFix[®] descrito en el apartado anterior 4.2.

La luminiscencia de este tipo de bacterias se puede explicar según la Ecuación 4.1



^aFMNH₂ (Flavinmononucleótido hidrogenado)

^bFMN (Flavinmononucleótido deshidrogenado)

El criterio para la evaluación del ensayo es la disminución de la luminiscencia, medida tras unos tiempos de contacto de 15 min y 30 min (opcionalmente se puede medir a los 5 min). Los valores de la toxicidad de la muestra pueden expresarse en forma de valores de CE₅₀ (concentración del tóxico que produce una inhibición, calculada o interpolada, de la bioluminiscencia del 50% comparada con la de un ensayo en blanco) o en forma de unidades de toxicidad (TU, del inglés toxicity units) que según la EPA se calcula como 100/EC₅₀. El porcentaje de inhibición (%inh), se calcula como la inversa de la CE₅₀.

Las sustancias insolubles, débilmente solubles o volátiles pueden afectar al resultado del ensayo o alterar su reproducibilidad. También las muestras coloreadas pueden producir pérdida de la luminiscencia por absorción o dispersión. Baja concentración de OD disuelto (las bacterias necesitan un mínimo de 0'5 mgO₂/L para emitir luminiscencia) o elevada concentración de materia orgánica de rápida biodegradación pueden provocar también alteraciones en el resultado.

La concentración salina es muy importante en este ensayo, para evitar problemas de hipo o hiperosmoticidad de las bacterias. Puesto que en la regeneración de las bacterias se utiliza un medio salino, es conveniente analizar previamente el contenido en sal de las muestras a analizar, para que en las muestras de ensayo ya mezcladas

muestras más bacterias) no sobrepase las concentración de una solución de NaCl de 35 g/L.

Como ya se ha mencionado en el apartado 4.1 Reactivos, la cepa de bacterias luminiscentes utilizadas es la especie *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Las bacterias se presentan comercialmente liofilizadas y se pueden mantener a una temperatura de entre -18°C a -20°C.

Para la regeneración de las bacterias, se saca el cultivo liofilizado del congelador inmediatamente antes de su utilización. En primer lugar, se añade 1 mL de agua ultrapura a 3°C en el recipiente que contiene las bacterias liofilizadas (en nuestro caso tubo BioFix[®] Lumi), para evitar el deterioro de las células durante la rehidratación. Es importante añadir el agua rápidamente para que las bacterias entren en contacto rápidamente con el agua, no siendo crítica la exactitud del volumen añadido.

A continuación se prepara la suspensión de cultivo, añadiendo 11 mL de la solución regeneradora (primero unos 6 mL con posterior agitación del tubo y, seguidamente, los otros 5 mL restantes siguiendo las instrucciones del fabricante). Esta solución regeneradora está compuesta por: 20 g de NaCl, 2,035 g de MgCl₂·6H₂O y 0,30 g de KCl todo disuelto en 1L de agua ultrapura. Esta suspensión de bacterias ya regeneradas debe conservarse en el refrigerador a 3°C. Transcurridos unos 5 min de reposo, se pueden preparar ya las disoluciones de ensayo.

Para preparar las distintas muestras de ensayo, se utilizan los tubos proporcionados por el fabricante y se reparten 500 µL de la solución regenerada de bacterias en los respectivos tubos según el número de análisis (generalmente 20). A continuación, y manteniendo estos tubos en un frigotermostato a 15°C, a intervalos de tiempo equivalentes a los que se utilizarán posteriormente para la medida de la luminiscencia, se añade a cada tubo 500 µL de las muestras a analizar o de diluciones de ellas.

En el lote de tubos preparado debe de haber al menos dos tubos que no contengan muestra a analizar (se añaden 500 µL de agua destilada) para tener un dato de la pérdida de la luminosidad por otros factores ajenos a la muestra a analizar, y también dos tubos con sustancia de referencia de la inhibición (en nuestro caso 2,2 mg/L de ZnSO₄·7H₂O produce un 31,29% de inhibición según certificado de calidad del fabricante).

Tras un tiempo de aproximadamente 1 minuto se mide la intensidad de la luminiscencia de todos los tubos para determinar la intensidad inicial de la suspensión de bacterias. Transcurridos al menos 15 minutos se mide la intensidad de todos los tubos y se anota (en nuestro caso el equipo convertía directamente la medida en %I). A los 30 minutos de mezclar la suspensión de bacterias con la muestra se vuelve a medir la intensidad anotándose el valor correspondiente a ese intervalo de tiempo. De esta manera se da por concluido el ensayo.

El porcentaje de inhibición (%inh) se calcula por la Ecuación 4.2:

$$\% inh = \left(\frac{I_0 - I_i}{I_0} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

donde

I_0 es la intensidad de luminiscencia inicial de la suspensión de bacterias.

I_i es la intensidad de luminiscencia de cada muestra medida después de transcurridos 15 min o 30 min de contacto con la muestra analizada.

Para determinar la CE_{50} se calcula la relación concentración/efecto para cada tiempo de exposición utilizando un análisis por regresión lineal. De esa ecuación lineal se calcula de forma directa o interpolando aquel valor que suponga el 50% del efecto inhibitorio sobre la bioluminiscencia inicial. Si la relación concentración/efecto no se puede ajustar a una recta, se puede estimar gráficamente el valor de la CE_{50} utilizando un sistema con dobles coordenadas logarítmicas.

4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN DE FANGOS ACTIVOS

Este método está basado en la norma internacional estandarizada ISO 8192, 1986 y el test de la OCDE 209.

En este método, los fangos activos vienen a ejercer el papel de reactivo en el funcionamiento del sistema de análisis respirométrico. La medida de la respirometría se basa precisamente en el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos contenidos en los fangos activos. A este consumo de oxígeno lo designamos como “respiración” y a la velocidad de consumo de oxígeno la llamaremos “tasa de

respiración” (OUR, oxygen uptake rate, y se mide en $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$). Esta tasa, como ya hemos indicado en el apartado 4.2, se mide con una sonda de membrana para la medida del oxígeno disuelto según norma ISO 5814 de 1990 en el respirómetro.

Los propios fangos activos presentan un consumo de oxígeno cuando se lleva a cabo la oxidación del sustrato intercelular en ausencia de sustrato extracelular. A este consumo se le denomina “tasa de respiración endógena” (OUR_{end}). A tiempos relativamente cortos (inferiores a una hora), los fangos también presentan un consumo de oxígeno debido a la conversión de la materia orgánica lentamente biodegradable (adherida al flóculo) a materia orgánica fácilmente biodegradable. La suma de ambos consumos es la llamada “tasa de respiración básica” (OUR_b) y se puede considerar, a efectos prácticos, constante.

Tanto la tasa de respiración endógena como la básica son directamente proporcionales a la concentración de sólidos en suspensión totales específica del fango activo. El utilizado, proveniente del reactor biológico secundario de una estación depuradora de aguas residuales, presenta una cantidad de sólidos en suspensión totales que varía entre 2 y 4 g/L. Normalmente presenta una respiración de tipo básica. Es importante destacar que el fango activo que se utiliza para este ensayo de toxicidad no está preadaptado a las diferentes muestras residuales que van a ser analizadas.

Nuestro equipo mide también la tasa de respiración debida a la metabolización de la materia orgánica proveniente de un muestra externa, denominada “tasa de respiración del sustrato en exceso” (OUR_s). El equipo BM3-LAB utilizado crea un respirograma para OUR, que representa el consumo de oxígeno frente al tiempo y a partir del respirograma calcula algunos parámetros útiles para el estudio de la toxicidad y la biodegradabilidad.

Para el ensayo de la inhibición de la respiración de fangos activos, introducimos 1L de fangos activos no preadaptados (aireados durante un mínimo de 24 horas) en el reactor del equipo. A continuación se ceba el equipo según el procedimiento que describe el manual de funcionamiento. Cuando se estabiliza la línea base (OUR_{end}) en aproximadamente 5-10 min, provocamos en el fango activo una tasa de respiración máxima (OUR_{max}) por medio de la adición de un compuesto orgánico fácilmente asimilable por los fangos (para ello utilizamos 1g de acetato sódico).

El propósito es establecer que en el momento de la medida de la muestra a analizar, las bacterias se encuentren totalmente activas y establecer una referencia proporcional a la concentración de la biomasa. Esta OUR_{max} es suficientemente estable y su valor es proporcional al 100% de la actividad de la biomasa.

Una vez alcanzada la OUR_{max} y estabilizada, en el caso de los plaguicidas y el ácido ferúlico añadimos unos 250 mL de la muestra a analizar (para los cianuros los volúmenes son variables, aunque mucho menores). En el caso de que la muestra presente un cierto grado de toxicidad, la tasa de respiración empezará a descender a lo largo del tiempo hasta alcanzar una respiración básica otra vez estable (OUR_f) (Figura 4.20).

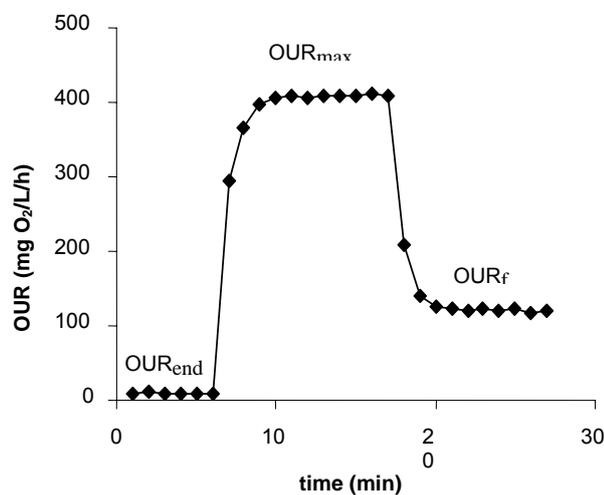


Figura 4.20. Diagrama OUR/t para la inhibición de la respiración de fangos activos

Para calcular el porcentaje de inhibición (%inh) se utiliza el descenso del consumo de oxígeno de los fangos activos, con la Ecuación 4.3.

$$\% inh = \left(\frac{OUR_{max} - OUR_f}{OUR_{max}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

La dilución de los fangos por la adición de los volúmenes de muestra provoca un descenso en el OUR, que se determinó inicialmente en un experimento control (inh_B); Por este motivo, se calculó una inhibición corregida ($\%inh_c$) a través de la Ecuación 4.4.

$$\%inh_c = \left(\frac{inh - inh_B}{100 - inh_B} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

El procedimiento para calcular la CE_{50} a partir del porcentaje de inhibición calculado con la Ecuación 4.4, representa una alternativa al test de la OCDE 209. La única diferencia con el procedimiento de la OCDE radica en que en éste último se toma como referencia la respiración básica, mientras que nosotros tomamos como referencia la respiración máxima. Ambas respiraciones son proporcionales a la actividad del 100% de la biomasa, aunque la respiración máxima nos amplía el rango de medida ganando en fiabilidad y resolución (en el test de la OCDE 209, la ventana queda establecida en un intervalo más pequeño como es el de la respiración básica y la respiración cero, el cual puede ser relativamente pequeño y falta de resolución).

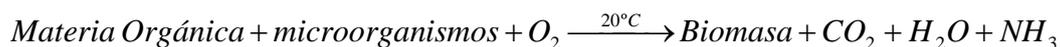
Así pues, para calcular la CE_{50} (concentración específica de muestra que provoca una inhibición del 50% en la respiración de los fangos activos), se procede a realizar distintos experimentos como el expresado anteriormente, modificando en cada uno de ellos la concentración de la muestra a evaluar. Al representar gráficamente el $\%inh$ obtenido en cada experimento, en función de la concentración de la muestra evaluada, se puede obtener una relación lineal que permita calcular el valor de la CE_{50} de forma directa, por regresión lineal o interpolando gráficamente. Cada vez que se realizan distintos experimentos para el cálculo del $\%inh$ o de la CE_{50} se debe de renovar el volumen de fango activo (incluyendo un proceso de vaciado, lavado y nuevamente cebado del equipo respirométrico), siempre procedente del mismo lote (edad, aireación, nutrientes, etc..), ya que se ha comprobado que si se realizan los sucesivos ensayos sin cambiar los fangos (una vez alcanzada su nueva respiración básica, Rs_1), se produce una disminución en el $\%inh$ debido posiblemente a un proceso de adaptación de las bacterias del fango activo a la muestra tóxica.

4.4.3. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅)

Basado en la misma norma internacional estandarizada ISO 8192, 1986 del procedimiento anterior y en el método estandarizado para la medida de la determinación bioquímica de oxígeno (DBO), por el método manométrico Standard Methods 5010-D.

Este método también se basa en la inhibición de la respiración bacteriana, en este caso en un recipiente cerrado y en la oscuridad, y midiendo el consumo de oxígeno de forma manométrica (no midiendo el oxígeno disuelto como en el caso anterior). Otra de las diferencias esenciales con el método anterior, es el volumen de fango utilizado, muy inferior en este caso, en concreto 1 mL de fango (inóculo). Además se añaden al fango sales minerales y una disolución de nutrientes tamponada a pH 7,2, y se controla temperatura del ensayo.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) se define (según la norma UNE 77003:1989) como la concentración en masa de oxígeno disuelto consumido, en condiciones definidas, por la oxidación biológica de las materias orgánicas y/o inorgánicas contenidas en el agua. Es decir, en este caso se mide la cantidad de oxígeno necesaria para degradar la materia orgánica por medio de un sistema vivo. La reacción se puede esquematizar en la Ecuación 4.5.



(Ecuación 4.5)

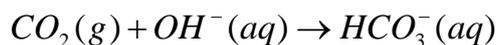
y se lleva a cabo en completa oscuridad, evitando así las posibles reacciones fotocatalíticas acopladas.

Las dificultades de aplicación, de interpretación de los resultados y de reproducibilidad, se deben al carácter biológico del método. La curva de consumo de oxígeno es al principio débil y después se eleva rápidamente hasta un máximo sostenido, aproximadamente a los cinco días, bajo la acción de la fase logarítmica de crecimiento microbiano. La oxidación de las materias orgánicas no es sólo la única causa del fenómeno; también intervienen la oxidación de los nitritos y de las sales amoniacales, así como las necesidades originadas por los fenómenos de asimilación y de formación de nuevas células. De igual modo, las variaciones se producen según las especies de

gérmenes, su concentración y su edad, la presencia de bacterias nitrificantes y la de protozoos consumidores propios de oxígeno que se nutren de bacterias.

En el método manométrico se mide la depresión generada en el interior de un recipiente herméticamente cerrado cuando se produce la degradación o biodegradación de la materia orgánica presente mediante el consumo de O₂. Para ello, se utiliza una botella de digestión opaca unida a un Oxitop[®] descrito en el apartado 4.2 (ver Figura 4.13), que registra automáticamente los datos de presión hasta cinco días, por eso se denomina más genéricamente DBO₅.

En el interior de las botellas, se coloca un volumen de muestra distinto según la cantidad de materia orgánica estimada (se puede hacer una estimación midiendo la DQO, demanda química de oxígeno, que siempre es mayor que la DBO) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra ha de estar continuamente agitada, para homogeneizarla. Seguidamente, se sitúa en la boca de la botella un digestor en el cual se coloca una trampa alcalina (KOH o NaOH en pastillas sólidas). Este último paso es necesario para que se produzca la depresión en el interior del recipiente, ya que al consumir el oxígeno los microorganismos, producen CO₂ impidiendo que disminuya la presión. Al colocar hidróxido sódico o lítico, lo hacemos reaccionar el CO₂ resultante de la reacción bioquímica, según la reacción (Ecuación 4.6):



(Ecuación 4.6)

En este método aparece una interferencia principal: los compuestos nitrogenados. Éstos consumen oxígeno para dar lugar al ion nitrato, debido a la presencia en el fango de bacterias nitrificantes, dando lugar a valores erróneos de DBO₅. Para evitar esta interferencia positiva se debe colocar en el interior de la botella un inhibidor de la nitrificación: la N-Aliltiurea. La cantidad a añadir es proporcional al volumen de muestra colocado.

Para evaluar la toxicidad de las muestras tratadas con este procedimiento, es necesario medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de una sustancia patrón para poder compararla con la DBO de la misma sustancia patrón junto a la de la sustancia contaminante a evaluar. Si se produce un descenso en la DBO indicará una inhibición del consumo de oxígeno por parte de las bacterias. En este caso utilizamos

una mezcla de 150 mg de glucosa más 150 mg de ácido glutámico disueltos en 1L de disolución, que presenta una DBO₅ de entre 280-300 mgO₂/L. La glucosa tiene una velocidad de oxidación excepcionalmente alta y variable, pero cuando es empleada con ácido glutámico se estabiliza, y es similar a la obtenida con aguas residuales municipales

El experimento consiste en medir la DBO₅ de diferentes frascos que contengan un volumen de disolución patrón adecuado, normalmente del 1% con respecto a la muestra evaluada, junto al volumen adecuado de muestra evaluada (164 mL). A estos frascos se añaden una serie de disoluciones necesarias para que se produzca la degradación de la materia orgánica por las bacterias:

Disolución de nutrientes tamponada: se añade a cada frasco 1 mL

- Solución tampón de fosfato: Disolver 8,5 g de KH₂PO₄, 21,75 g de K₂HPO₄, 33,4 g de Na₂HPO₄·7H₂O, y 1,7 g de NH₄Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y diluir a 1 L. El pH debe ser 7,2 sin posteriores ajustes. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descartar este o cualquiera de los otros reactivos.

Salas minerales: se añade a cada frasco 1 mL de cada una de ellas

- Solución de sulfato de magnesio: Disolver 22,5 g de MgSO₄·7H₂O en agua destilada y diluir a 1 L.
- Solución de cloruro de calcio: Disolver 27,5 g de CaCl₂ en agua destilada y diluir a 1L.
- Solución de cloruro férrico: Disolver 0,25g de FeCl₃·6H₂O en agua destilada, diluir a 1L

Inóculo: se añade 1 mL a cada frasco

- El inóculo procede de los fangos activos de un proceso de tratamiento biológico. En este caso es recomendable añadir un inhibidor de la nitrificación.

Inhibidor de la nitrificación: se añade 1'64 mL a cada frasco (1% del volumen)

- Disolución al 0'5 % en peso: se disuelven 0'5 g de N-Aliltiurea (C₄H₈N₂S)

Con el objeto de verificar la calidad del agua de dilución sin inóculo y la limpieza de los materiales, se debe utilizar un blanco de agua de dilución (DBO_{5B}) con las mismas cantidades y reactivos que todos los demás frascos, a excepción del patrón y las muestras a evaluar.

El cálculo del porcentaje de inhibición (%inh) se obtiene al cabo de 5 días relacionando el valor de la DBO_5 del control de glucosa-glutámico (DBO_{5C}), con la medida de la DBO_5 de las muestras evaluadas que contienen también el patrón (DBO_{5M}), según la Ecuación 4.7.

$$\% inh = \left(\frac{(DBO_{5C} - DBO_{5B}) - (DBO_{5M} - DBO_{5B})}{(DBO_{5C} - DBO_{5B})} \right) \times 100$$

(Ecuación 4.7)

De la misma forma que en los casos anteriores, se puede calcular la CE_{50} , en este caso como la concentración específica de muestra que provoca una inhibición del 50% en la demanda bioquímica de oxígeno. Para ello se realizan distintos experimentos como el expresado anteriormente, modificando en cada uno de ellos la concentración de la muestra a evaluar. Al representar gráficamente el %inh obtenido en cada experimento, con la concentración de la muestra evaluada, se puede obtener una relación lineal que permita calcular de forma directa, por regresión lineal o interpolando gráficamente, el valor de la CE_{50} .

4.5.- MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA BIODEGRADABILIDAD

4.5.1. MÉTODO DE ZAHN-WELLENS

Esta basado en la norma ISO 9888, 1999 y OCDE 302-B, que evalúa la calidad del agua, estudiando la biodegradabilidad aerobia final de compuestos orgánicos en medio acuoso por acción de microorganismos.

En primer lugar debemos de tener en cuenta la definición de biodegradabilidad como la descomposición de un compuesto químico o de la materia orgánica, en presencia de oxígeno, para formar dióxido de carbono, agua y sales minerales (mineralización) y producir nueva biomasa. Las condiciones del método son las óptimas que permiten la obtención del valor máximo de biodegradación con el inóculo seleccionado durante el

período de ensayo; pueden ser, en muchos casos, más favorables que las que se dan en realidad en las plantas de tratamiento de agua residual.

El método se fundamenta en la medida de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) a lo largo de un periodo de 28 días. Este método es aplicable a compuestos orgánicos solubles en agua (y que no sean susceptibles de transformarse en metabolitos insolubles), no volátiles o con baja presión de vapor en las condiciones del ensayo y que no presenten acción inhibitoria sobre los microorganismos del ensayo (si así fuera se podría diluir la muestra o utilizar un inóculo pre-adaptado al tóxico).

En este ensayo, considerado estático, la mezcla acuosa contiene un medio inorgánico, un fango activado como inóculo y un compuesto orgánico patrón como única fuente de carbono y energía, aparte del fango. La cantidad de muestra a evaluar se selecciona de modo que tenga un valor de COD entre 50-400 mg/L (dependiendo de su solubilidad en agua). La medida del COD se realiza al principio y al final del ensayo (normalmente a los 28 días) y a intervalos regulares en el transcurso del mismo. Es importante tomar una muestra 3 horas después del inicio, para permitir una adsorción significativa del compuesto a medir sobre el lodo activado. El método debe realizarse en la oscuridad y a una temperatura comprendida entre 20-25°C.

El medio inorgánico es el mismo que el utilizado en el apartado 4.4.3. pero aquí se añade 10mL/L de las disoluciones de nutrientes tamponada y 1 mL/L de cada una de las disoluciones de sales minerales. Si a lo largo del experimento variara el pH de la mezcla podría ser necesario un aumento de la capacidad amortiguadora del medio, aumentando hasta 100 mL/L la disolución tamponada.

Se ha preparado suficientes recipientes de vidrio para que exista al menos un recipiente para el compuesto a evaluar, uno para el compuesto de referencia (en este caso dietilenglicol en una concentración de unos 300 mg COD/L) y otro para el ensayo en blanco. El volumen final establecido en el procedimiento es de 2L, con 2/3 de agua ultrapura y añadiendo 20 mL de disolución de nutrientes tamponada, 1 mL de cada uno de las disoluciones de sales minerales, inóculo hasta alcanzar una concentración de 1 g/L, y compuesto a ensayar hasta obtener una concentración de COD entre 50-400 mg/L. El montaje de ensayo se puede apreciar en la Figura 4.21.



Figura 4.21. Montaje para el método de Zahn-Wellens

Es importante controlar el pH de la mezcla en un valor de 7. Para comenzar el experimento los recipientes con agitación magnética se airean y se incuban a la temperatura adecuada. Hay que asegurarse de que durante el proceso, el fango esté bien aireado y de que no decante. Con objeto de compensar las pérdidas de agua por evaporación, se verifica el volumen del medio en los recipientes antes de cada toma de muestras y, si fuera necesario, se completa con agua ultrapura.

El cálculo de la biodegradación (D) se obtiene a partir de la Ecuación 4.8.

$$D = \left(1 - \frac{COD_t - COD_b}{COD_i - COD_{bi}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

tal que

COD_t es el carbono orgánico disuelto, en mg/L, de la muestra a tiempo t

COD_b es el carbono orgánico disuelto, en mg/L, del blanco a tiempo t

COD_i es el carbono orgánico disuelto, en mg/L, de la muestra a tiempo t_1 , 3 horas

COD_{bi} es el carbono orgánico disuelto, en mg/L, del blanco a tiempo t_1 , 3 horas

Si el valor de la primera muestra (transcurridas unas 3 h) difiere significativamente (> 20%) que el medido para la muestra antes del inicio del experimento, se debe reflejar que se ha producido una adsorción por los fangos activados en el ensayo estático. Si es menor a ese 20%, se toma la pérdida de COD al cabo de 28 días, como valor válido para obtener el porcentaje de biodegradación del compuesto. Se considerará válido si el porcentaje de degradación de la muestra de referencia es mayor del 70% a los 14 días, si no es el caso, es conveniente repetir el análisis utilizando, por ejemplo, otro inóculo.

4.5.2. MEDIDA DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO A TIEMPO CORTO (DBO_{st})

Basado en la norma internacional estandarizada ISO 9408, 1999 y el test de la OCDE 209, pero con pequeñas modificaciones como son el equipo respirométrico utilizado, el BM3-LAB y el tiempo de ensayo más corto.

En este método los fangos activos vuelven a ejercer el papel de reactivo en el procedimiento, como ocurría en la medida de la toxicidad descrita en el apartado 4.4.2. En este caso, el principio de respirometría utilizado por el equipo se basa en el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos contenidos en los fangos activos cuando degradan un compuesto orgánico, supuesto como única fuente de carbono y de energía, a excepción de los propios fangos. A este consumo de oxígeno lo designamos como “respiración” y a la velocidad de consumo de oxígeno la llamaremos “tasa de respiración” (OUR) y se mide en $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$). Este consumo de oxígeno, como ya hemos indicado en el apartado 4.2, se mide en el BM3-LAB con una sonda de membrana para la medida del oxígeno disuelto según norma ISO 5814, 1990. Para este ensayo necesitamos calcular, al igual que en el caso de la medida de la toxicidad, algunos parámetros propios del fango activo utilizado como tasa de respiración endógena (OUR_{end}) y la tasa de respiración básica (OUR_b) como se describieron en el apartado 4.4.2. El equipo BM3-LAB utilizado crea un respirograma para OUR, que representa el consumo de oxígeno frente al tiempo y a partir del respirograma calcula la biodegradabilidad (Figura 4.22).

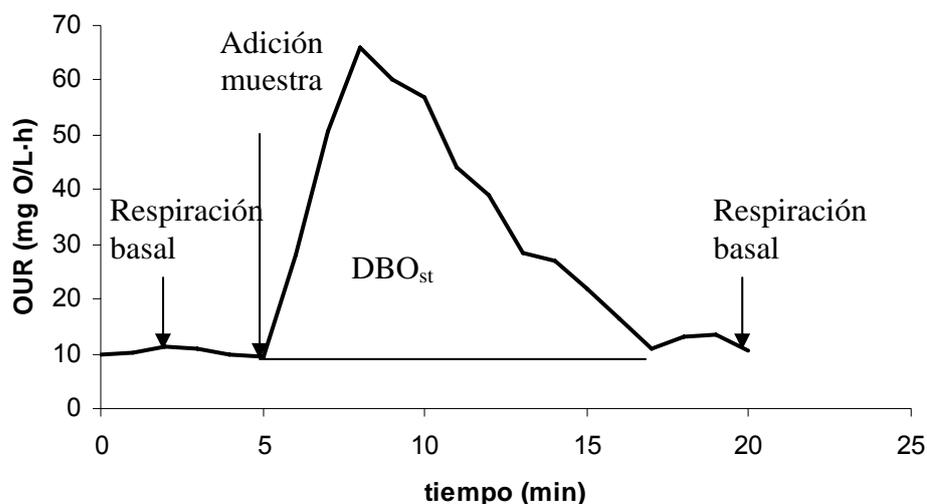


Figura 4.22. Respirograma para el cálculo de la DBO_{st}

Para el ensayo de la biodegradabilidad por la medida de la demanda bioquímica de oxígeno a tiempo corto (DBO_{st}), introducimos 500 mL de fangos activos (aireados durante un mínimo de 24 horas) en el reactor batch del equipo. A continuación se ceba el equipo. Después de esperar que el fango se sitúe a un nivel constante de respiración básica añadimos 5 mL de la muestra a evaluar, provocando un aumento brusco del consumo de oxígeno por el fango activo y un progresivo descenso de éste durante un tiempo, que dependerá de la biodegradabilidad de la muestra añadida.

Una vez oxidada la muestra a evaluar, el consumo de oxígeno volverá a estabilizarse en una respiración básica (que puede ser o no la misma que la inicial). El equipo en ese momento, detiene el experimento y calcula de forma directa la DBO_{st}, integrando el área que representa la relación respiración/tiempo, desde que se añade la muestra a evaluar hasta que se considera que los fangos activos han vuelto a una respiración básica estable. Si esta nueva respiración básica se estabiliza y permanece relativamente cercana a la respiración básica de los fangos activos original (alrededor de un 10%) el equipo detecta de forma automática el fin del ensayo.

El respirómetro dispone de un sistema de calibración interna de forma que corrige el efecto de la dilución de la muestra (5:500) y el valor de la DBO_{st} ofrecido es ya la de la muestra problema. En experimentos anteriores se ha comprobado que los datos sufren una gran variabilidad, principalmente debido a determinar la vuelta a la respiración basal y por lo tanto el fin del ensayo, por eso los datos se deben de interpretar de una manera cualitativa (Amat, A.M. y col., 2003 a)

Por último es importante destacar que al realizar distintos experimentos para el cálculo de la DBO_{st}, se debe de renovar el volumen de fango activo (incluyendo un proceso de vaciado, lavado y nuevamente cebado del equipo respirométrico) por otro procedente del mismo lote (edad, aireación, nutrientes, etc.). De este modo se evita que los restos del ensayo realizado interfieran en los experimentos posteriores.

4.5.3. RELACIÓN ENTRE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO Y LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅/DQO)

Basado en la norma ISO 10707, 1998, OCDE 301-D e ISO 6060, 1989, se fundamenta en la relación entre la medida de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y la demanda química de oxígeno (DQO).

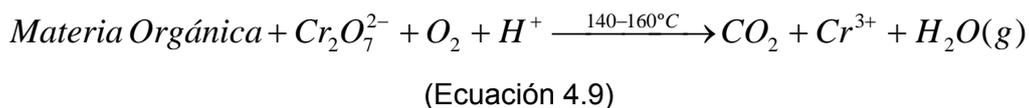
Este método mide la biodegradabilidad final de compuestos orgánicos, a una concentración dada, mediante la acción de los microorganismos, utilizando un ensayo biológico y un ensayo de tipo químico. Las condiciones descritas en este método no se corresponden necesariamente con las condiciones óptimas para que se produzca una biodegradación máxima. Es aplicable a todo compuesto orgánico suficientemente soluble en disolución acuosa y teniendo en cuenta la baja concentración del compuesto a ensayar al comienzo del ensayo, no resulta necesario tomar precauciones excesivas relativas a la toxicidad de la muestra.

El fundamento es muy similar al establecido para la medida de la toxicidad del apartado 4.4.3 y se basa en la medida manométrica en un recipiente cerrado y en la oscuridad, del consumo de oxígeno de un inóculo cuando degrada los compuestos orgánicos presentes en la muestra (como única fuente de carbono y energía, a excepción del propio inóculo). Además se añaden al fango sales minerales y una disolución de nutrientes tamponada a pH 7,2, y se controla estrictamente la temperatura del ensayo.

Para la medida de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), que ya hemos definido anteriormente (según la norma UNE 77003:1989) en el apartado 4.4.3, utilizamos en este caso diferentes frascos que contengan el volumen adecuado de muestra ensayo (164 mL). A estos frascos se añaden las disoluciones necesarias para que se produzca la degradación de la materia orgánica por las bacterias: 1 mL de la disolución tamponada de nutrientes (ver apartado 4.4.3.) y 1 mL de las diferentes disoluciones de sales minerales (ver apartado 4.4.3.). También se añade 1 mL de inóculo procedentes de los fangos activos de un proceso de tratamiento biológico. En este caso es recomendable añadir un inhibidor de la nitrificación (aproximadamente 0,1% de volumen), como la N-Aliltiurea. Con el objeto de verificar la calidad del agua de dilución sin inóculo y la limpieza de los materiales, se debe utilizar un blanco de agua de dilución con las mismas cantidades y reactivos que todos los demás frascos, a excepción del patrón y las muestras a evaluar. Se obtienen los valores de forma directa por el Oxitop[®], al cabo de cinco días.

Al mismo tiempo se mide la demanda química de oxígeno (DQO), según Standard Methods 5220-D, de todas las muestras a evaluar. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se define como la cantidad de oxígeno consumido en la oxidación del compuesto a ensayar por acción del dicromato potásico en caliente (UNE 77004:2002). Permite medir la cantidad de materia oxidable existente y se expresa, en

este caso, en miligramos de oxígeno consumido por litro. La DQO está en función de las características de las materias presentes, de sus proporciones respectivas, de las posibilidades de oxidación, etc., por lo que es evidente que la reproducibilidad de los resultados y su interpretación no podrán ser adecuadas más que en las condiciones de metodología bien definidas y estrictamente respetadas. La reacción que tiene lugar se puede representar en la Ecuación 4.9.



La digestión de la muestra se lleva a cabo en tubos Corning (ver Figura 4.14. a), utilizando como condiciones de operación una temperatura de 423K y un tiempo de 150 minutos. Una vez homogeneizada la muestra, se introduce en el tubo de digestión 3 mL de ésta sobre una disolución presente en los tubos que contiene dicromato potásico, ácido sulfúrico y sulfato mercúrico, con proporciones distintas según el contenido en cloruros y el intervalo de medida deseado (en nuestro caso de 25-1500 mgO₂/L); y por último, sulfato de plata. En el caso del intervalo de medida que utilizamos (entre 25-1500 mgO₂/L) se puede preparar la disolución oxidante de la siguiente forma: 10,216 g de K₂Cr₂O₇, 167 mL de H₂SO₄ conc. y 33,3 g de HgSO₄; diluir a 1L con agua ultrapura. La concentración de K₂Cr₂O₇ de esta disolución es 0,208N. A la disolución anterior se le añadirá el catalizador preparado disolviendo 6,6 g de Ag₂SO₄ en 1L de H₂SO₄.

Se tapa el tubo para evitar pérdidas por volatilidad de sustancias con baja presión de vapor, y se agitan los reactivos utilizados debido a las variadas densidades de origen. Transcurrido el tiempo de digestión, las muestras se extraen de la placa calefactora y se enfrían a temperatura ambiente.

La determinación del Cr (III) se realiza por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. En este caso, indica que hay presente en la muestra bastante materia orgánica, y la disolución toma un color verde-azulado debido al ion Cr (III)). Utilizando cubetas con un paso óptico de 10 mm, el método presenta linealidad hasta valores de DQO iguales a 1000 mg O₂/l, siendo necesario proceder a dilución de la muestra cuando su DQO supera este valor

Las principales interferencias del método son los compuestos alifáticos volátiles de

cadena lineal que no se oxidan en cantidad apreciable, debido a que están presentes en la fase de vapor y no entran en contacto con el líquido oxidante, constituyendo interferencias negativas. Tales compuestos se oxidan más efectivamente cuando se agrega Ag_2SO_4 como catalizador. Los iones cloruro, bromuro y yoduro también son oxidados parcialmente en las condiciones del ensayo. Las dificultades causadas por la presencia de los haluros pueden superarse en buena parte, aunque no completamente, por formación de complejos antes del proceso de reflujo con sulfato de mercurio (HgSO_4), que forma cloruro mercúrico (HgCl_2) y cloromercuriato ($[\text{HgCl}_4]^{2-}$) ambos solubles y resistentes a la oxidación con dicromato. Es necesario añadir una cantidad suficiente de HgSO_4 , ya que en caso de que no reaccione con todos los haluros presentes, éstos podrían reaccionar a su vez con el catalizador (Ag_2SO_4), dando valores erróneos de la DQO.

La medida de la biodegradabilidad se obtiene relacionando los valores de la DBO_5 y la DQO obtenidos, para las diferentes muestras de ensayo, tal que un valor inferior a 0,4 en la relación DBO_5/DQO podría ser considerado como resultado no positivo para el compuesto, es decir no biodegradable. Cuanto mayor sea el valor de este cociente mayor será la biodegradabilidad de la muestra evaluada. De forma análoga, y si los valores de la DBO_{st} son suficiente elevados, se podría relacionar la $\text{DBO}_{\text{st}}/\text{DQO}$ (Amat, A.M. y col., 2003; Goi, A. y col., 2004; Mantzavinos, D. y col., 2004)) para determinar la biodegradabilidad de las muestras. Con esta relación se podría corregir el efecto del distinto estado de oxidación de la materia orgánica tiene sobre la DBO_5 .

4.6.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LOS TRATAMIENTOS FOTOCATALÍTICOS

En este apartado vamos a describir cómo se obtuvieron las diferentes muestras que fueron evaluadas para comprobar su toxicidad y su biodegradabilidad. Para ello dividiremos, como hemos hecho anteriormente en el apartado 4.1 (Reactivos), las muestras según su origen y finalmente según el tratamiento fotocatalítico y la planta piloto utilizada para su eliminación.

La radiación solar instantánea y acumulada se midió en el radiómetro Acadus 85 que describimos en el apartado 4.3 integrado en las propias plantas piloto, y se expresa como t_{30W} , que es una forma de normalizar el periodo de irradiación. Esto se hace

convirtiendo la radiación UV que llega a la planta en tiempo, considerando una intensidad promedio de 30 W/m^2 y utilizando la Ecuación 4.10, que expresa el t_{30W} en segundos, UV es la radiación solar acumulada (en J/m^2), V_i es el volumen irradiado (L) y V_t es el volumen total (L) (Hincapié, M. y col., 2005).

$$t_{30W} = \frac{UV_{ac} \cdot V_i}{30 \cdot V_T} \quad (\text{Ecuación 4.10})$$

Para poder comparar posteriormente distintos métodos de medida de toxicidad y de biodegradabilidad, se han seleccionado tres tipos de compuestos contaminantes de naturaleza muy distinta:

- .- Disoluciones de diferentes plaguicidas con distintas toxicidades y biodegradabilidades iniciales
- .- Aguas residuales que contienen cianuros y metales de elevada toxicidad
- .- Contaminantes fenólicos abundantes en diferentes aguas de industrias agroalimentarias que si bien no se manifiestan especialmente tóxicos, si causan problemas por su falta de biodegradabilidad

Obtención de muestras de plaguicidas

Se han preparado por separado disoluciones acuosas de cada plaguicida, empleando las formulaciones comerciales (Metasystox, Ultracid, Sevnol y Laition) y dosificándolos de modo que contuvieran 50 mg/L del principio activo correspondiente (metiloxidemeton, metidation, carbaril y dimetoato). Para los ensayos con la planta piloto pequeña se prepararon 4L de disoluciones de estos plaguicidas por separado y 30L para los ensayos con la planta piloto de 24L .

En los tratamientos de fotocatalisis solar con TiO_2 , se añadieron a las disoluciones de los plaguicidas 200 mg/L de TiO_2 considerada en bibliografía la concentración óptima en muchos casos (Jacobk L. y col., 1993); en los tratamientos con foto-Fenton se añadió una cantidad de sulfato de hierro (II) tal que la concentración del catión metálico fue de 20 mg/L y la concentración de agua oxigenada fue el 200% de la cantidad estequiométrica estimada para el contaminante; estas son condiciones habitualmente utilizada en este tipo de procesos (Hincapié M. y col., 2005)

Obtención de muestras de ácido ferúlico

Se ha preparado una disolución que contiene una concentración inicial de ácido ferúlico de 0,001M. La cantidad de Acridine Yellow G empleada en el tratamiento fotocatalítico del ácido ferúlico ha sido 10 mg/L de disolución, que es una concentración típica del fotosensibilizador (Amat A.M. y col., 1999 y 2007). El volumen de muestra tratada fue de 4 L.

Obtención de muestras de efluentes de la industria de recubrimientos metálicos

El volumen empleado de este tipo de contaminantes ha sido de 55L, tomados directamente del baño de metalizado y cuyas características se han descrito en el apartado 4.1. El agua oxigenada (200% de la cantidad estequiométrica) se añadió de forma progresiva. No fue necesaria la adición de cantidad extra de catión metálico, actuando el que contienen las aguas como fotocatalizador. Los metales precipitados se separaron por filtración.

5.- RESULTADOS
EXPERIMENTALES
Y
DISCUSIÓN

5.- RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

5.1.- TRATAMIENTOS FOTOCATALÍTICOS: ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES

En este apartado vamos a exponer brevemente los resultados experimentales obtenidos en los diferentes tratamientos fotocatalíticos, de cada uno de los contaminantes por separado. En el análisis de los contaminantes, la evolución de su concentración se representa en las tablas en mg/L y en las gráficas en forma de concentración relativa (C/C_0 , tal que C es la concentración a tiempo t y C_0 es la concentración inicial o a tiempo $t=0$). La radiación, como ya hemos descrito en el apartado 4.6., está normalizada en el término t_{30w} .

El objetivo de este apartado es mostrar las características principales de las muestras que van a ser sometidas a diferentes análisis en los apartados posteriores, con el fin de buscar el momento óptimo de acoplamiento con un proceso biológico.

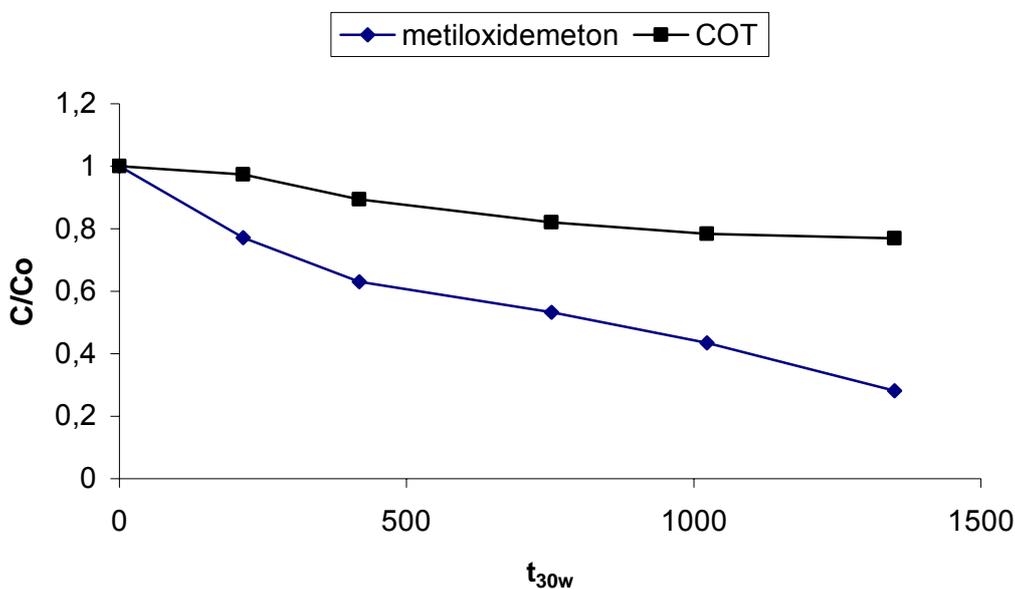
TRATAMIENTOS DE FOTOCÁTISIS SOLAR CON TiO_2 DE PLAGUICIDAS

En las tablas de resultados, también se presenta la variación de la materia orgánica en forma de COT, carbono orgánico total (asimilable a la fracción disuelta COD, carbono orgánico disuelto, después de filtrar las muestras ya que las diferencias medidas entre COT y COD no sobrepasan el 0,5%).

Metasystox

Se prepararon disoluciones iniciales del plaguicida Metasystox, con una concentración inicial de 50 mg/L de metiloxidemeton su principio activo (plaguicida de tipo tiofosforado), con un COT de 131,7 mgC/L, y fueron tratadas con una concentración de TiO_2 de 200 mg/L consideradas óptimas para este tipo de compuestos (Arques, A. y col., 2007). Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla 5.1 y en la Gráfica 5.1, apreciándose que al final del experimento ($t_{30w} = 1350$ min) se ha eliminado el 72% del principio activo aunque no se ha producido la mineralización de la muestra (el COT ha disminuido sólo un 23%).

t_{30w} (min)	Metiloxidemeton (mg/L)	COT(mgC/L)
0	50,0	131
216	38,5	128
417	31,5	117
752	26,6	108
1022	21,7	103
1350	14,1	101

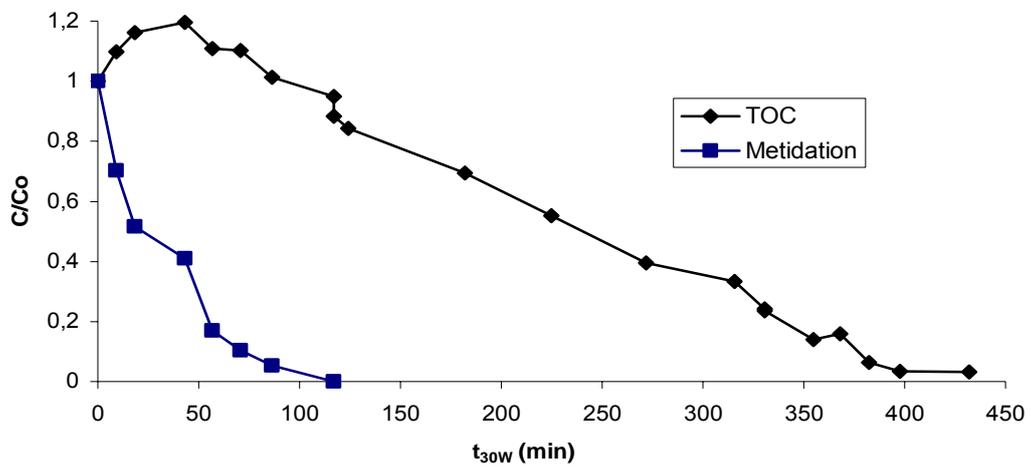
Tabla 5.1. Fotodegradación del Metasystox con TiO_2 Gráfica 5.1. Fotodegradación del Metasystox con TiO_2

Ultracid

Se prepararon disoluciones iniciales del plaguicida Ultracid con una concentración inicial de metidation (principio activo del plaguicida y también del tipo tiofosforado) de 50 mg/L, con un COT de 35 mgC/L, y han sido tratadas con una concentración de TiO_2 de 200 mg/L consideradas óptimas (García-Ripoll, A. y col., 2007). Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla 5.2 y en la Gráfica 5.2, apreciándose que con un $t_{30w} = 102$ min. Se ha eliminado el 100% del metidation, aunque en ese momento el descenso del COT de la muestra es mínima, y sólo se consigue la total mineralización al final del experimento cuando el t_{30w} alcanza valores de 355 min.

t_{30w} (min)	Metidation (mg/L)	COT(mgC/L)
0	41,0	31
9	28,8	34
19	21,2	36
43	16,8	37
57	7,0	34
71	4,3	34
86	2,2	31
102	0,0	34
117	0,0	29
124	0,0	26
182	0,0	21
225	0,0	17
272	0,0	12
316	0,0	10
331	0,0	7
355	0,0	4

Tabla 5.2. Fotodegradación del Ultracid con TiO_2



Gráfica 5.2 Fotodegradación del Ultracid con TiO_2

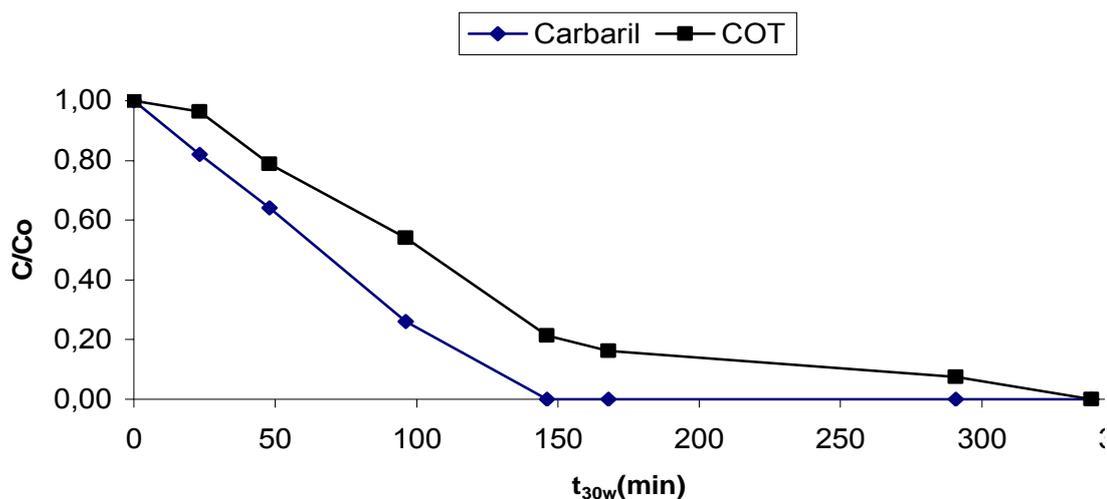
SevnoI

Se prepararon disoluciones iniciales del plaguicida SevnoI con una concentración inicial de carbaril (principio activo del plaguicida, en este caso de tipo carbamato) de

50 mg/L, con un COT de 33 mgC/L, y han sido tratadas con una concentración de TiO_2 de 200 mg/L, según condiciones óptimas (García, A. y col., 2006). Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla 5.3 y en la Gráfica 5.3, apreciándose que hasta que no se alcanza un t_{30w} de aproximadamente 146 min no se ha eliminado el 100% del principio activo. La mineralización de la muestra en ese punto aún es poco efectiva, ya que en ese momento la mineralización de la muestra es de un 80% y sólo al final del experimento se consigue eliminar la materia orgánica.

t_{30w} (min)	Carbaril (mg/L)	COT (mgC/L)
0	45,5	33
23	37,3	31
48	29,1	26
96	11,8	18
146	0,0	7
168	0,0	5
291	0,0	2
339	0,0	0

Tabla 5.3. Fotodegradación del Sevnol con TiO_2



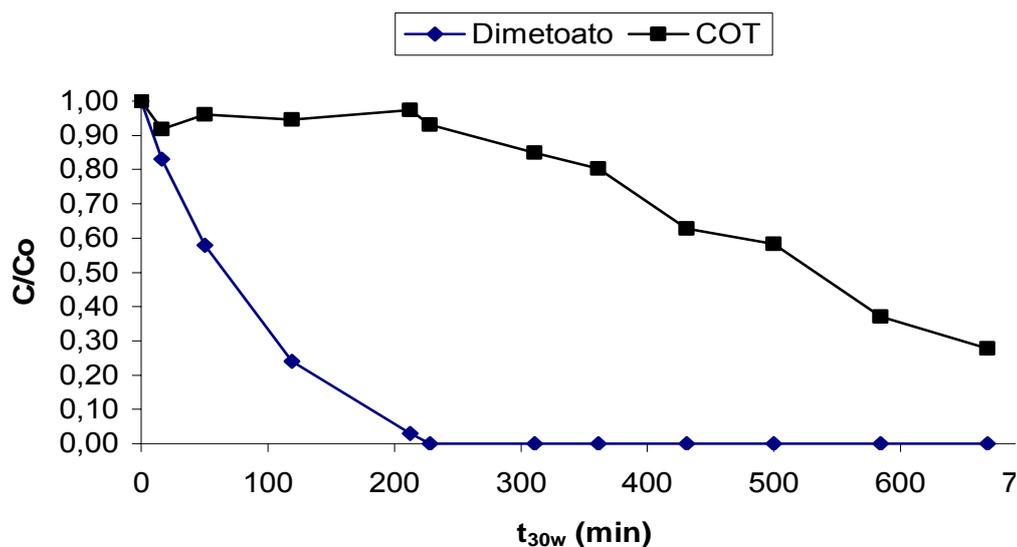
Gráfica 5.3. Fotodegradación del Sevnol con TiO_2

Laition

Se prepararon disoluciones iniciales del plaguicida Laition con una concentración inicial de dimetoato (principio activo del plaguicida, en este caso presenta tanto un grupo tiofosfato como carbamato) aproximadamente de 50 mg/L, con un COT inicial de 56 mgC/L, y han sido tratadas con una concentración de TiO₂ de 200 mg/L considerada óptima (Arques, A. y col., en prensa). Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla 5.4 y en la Gráfica 5.4, observándose que se ha alcanzado una total eliminación del plaguicida con un t_{30w} de aproximadamente 106 min., aunque en ese momento la mineralización de la muestra es casi nula (6%) alcanzando finalmente una importante eliminación de materia orgánica, un 75% al final del experimento.

t _{30w} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)
0	44,4	56
16	36,8	51
50	25,8	54
68	10,7	55
94	1,3	53
106	0,0	53
119	0,0	53
153	0,0	53
192	0,0	52
212	0,0	54
228	0,0	52
311	0,0	47
361	0,0	45
431	0,0	35
500	0,0	33
584	0,0	21
669	0,0	15

Tabla 5.4. Fotodegradación del Laition con TiO₂



Gráfica 5.4. Fotodegradación del Laition con TiO_2

TRATAMIENTOS DE FOTOCÁTISIS SOLAR CON ACRIDINE YELLOW G DEL ÁCIDO FERÚLICO

En las tablas de resultados y las gráficas obtenidas en el estudio del tratamiento fotocatalítico con Acridine Yellow G (AYG) del ácido ferúlico, se presenta la variación del compuesto fenólico así como también la variación de la materia orgánica en forma de COT, carbono orgánico total, frente a la irradiación solar normalizada con el t_{30w} , al igual que en el caso de los plaguicidas.

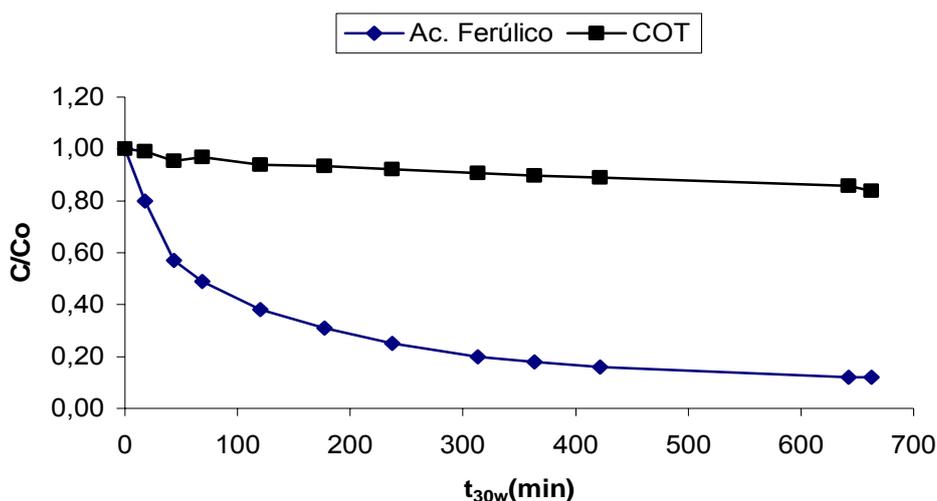
Ácido Ferúlico

Las disoluciones iniciales de Ácido Ferúlico fueron preparadas con una concentración 0,001M (194 mg/L) y han presentado un COT inicial de 120 mgC/L, y han sido tratadas con una concentración de fotocatalizador, en este caso el Acridine Yellow G (AYG) de 10 mg/L que ha sido encontrado el óptimo para este tipo de contaminantes (Amat A.M. y col, 2007).

Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla 5.5 y en la Gráfica 5.5, observándose que se ha alcanzado una casi total eliminación del ácido ferúlico al final del experimento, aunque en ese momento la mineralización de la muestra es muy baja (18%).

t_{30w} (min)	Ac.Ferúlico (mg/L)	COT (mgC/L)
0	194,0	120
18	155,2	119
44	110,6	115
68	95,1	116
120	73,7	113
177	60,1	112
237	48,5	111
313	38,8	109
363	34,9	108
422	31,0	107
643	23,3	103
663	23,3	101

Tabla 5.5. Fotodegradación del ácido ferúlico con AYG



Gráfica 5.5. Fotodegradación del ácido ferúlico con AYG

TRATAMIENTOS DE FOTOCÁTISIS SOLAR CON FOTOFENTON DE CIANUROS

Efluentes industriales de recubrimientos metálicos: cianuros

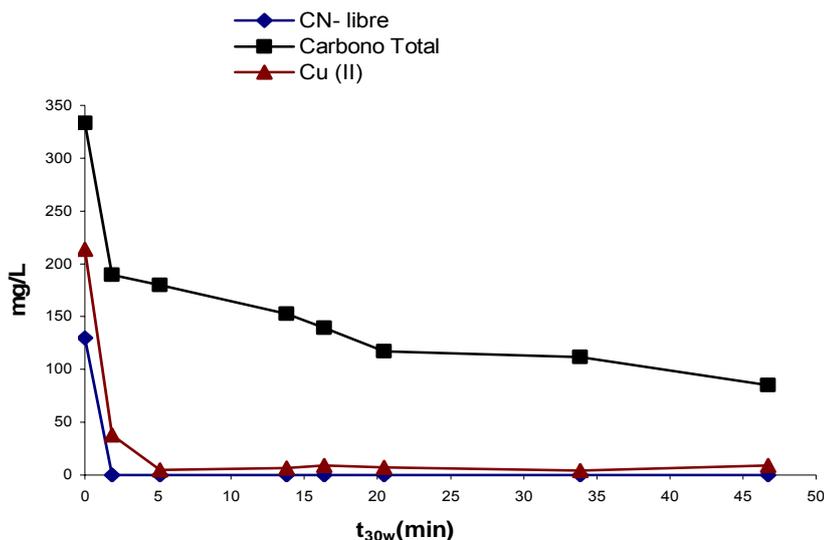
El efluente tomado de la planta de tratamiento de superficies se ha tratado mediante un proceso tipo-Fenton, sin añadir ningún ion metálico externo puesto que probablemente los propios iones cobre de la disolución actúen como fotocatalizador, incluso en medio básico (Ciesla, P. y col., 2004).

La concentración de cianuro libre se pudo determinar por medio de un electrodo selectivo; sin embargo, el cianuro total no se puede determinar por este método; es por tanto que se ha medido el carbono total de la disolución, tras precipitar carbonatos, y a partir de este valor, se ha estimado la concentración de cianuros. También se ha determinado la concentración de iones cobre (II) por ionización a la llama.

En la Tabla 5.6 y en la Gráfica 5.6 se puede observar la rápida eliminación de CN^- libre, desde 130 mg/L de concentración inicial; las medidas de TOC también muestran una tendencia a la oxidación del CN^- complejado. Esto se ve confirmado por la desaparición del Cu^{2+} , que precipita a pH básico, conforme se destruyen los complejos.

$t_{30w}(\text{min})$	CN (mg/L)	CT (mgC/L)	Cu (II) (mg/L)
0	130	333	213,4
2	0	190	37,8
5	0	180	5,0
14	0	153	6,6
16	0	140	9,3
20	0	117	7,5
34	0	112	4,5
47	0	85	8,9

Tabla 5.6. Fotodegradación de cianuro libre y complejado, y del ion Cu(II) con fotoFenton



Gráfica 5.6. Fotodegradación de cianuro libre y complejado, y del ion Cu(II) con fotoFenton

5.2.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN DE FANGOS ACTIVOS

Como se ha indicado en la introducción de esta tesis, la determinación de la toxicidad de un efluente es necesaria para poder decidir si puede ser tratado por métodos biológicos (Mantzavinos, D. y col., 2004). Aunque existe una gran variedad de métodos para determinar este parámetro, parece que aquellos basados en fangos activos pueden predecir más exactamente el comportamiento de los reactores biológicos de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

El método que se estudia en este apartado se basa en la determinación de la inhibición de la tasa de respiración de fangos activos en presencia de un contaminante. Se trata de una modificación de un método normalizado (serie OCDE 301), que presenta la ventaja adicional de su rapidez (del orden de minutos).

Para probar este método, se utilizaron en primer lugar disoluciones de cuatro plaguicidas comerciales. Posteriormente aguas que contienen cianuros cuya toxicidad puede ser mucho mayor, y disoluciones de un compuesto fenólico (ácido ferúlico) presente en varios productos vegetales con una toxicidad probablemente menor a la de los plaguicidas. En todos los ensayos se ha medido la evolución de la toxicidad (en %inh, ver Ecuación 4.4) a lo largo del tratamiento fotocatalítico.

PLAGUICIDAS

Metasystox

Como se indica en la sección 5.1. el Metasystox, al igual que los otros plaguicidas estudiados, ha sido sometido a un proceso de fotocatalisis solar con TiO_2 en la planta solar de 24L. Los datos que presentan la inhibición de la OUR de los fangos activos por el plaguicida Metasystox se muestran en la Tabla 5.7 y en la Gráfica 5.7 se observa su evolución frente a la irradiación solar. Como se observa, la toxicidad tiende a disminuir a medida que avanza el tratamiento hasta desaparecer prácticamente para $t_{30W} = 752$ min.

También en la Tabla 5.7. se muestra la concentración de principio activo (metiloxidemeton, del tipo tiofosfato según Figura 5.1) y carbono orgánico total que tienen las muestras. Como se puede observar la inhibición parece estar más ligada con la concentración del principio activo, que con la variación de COT, ya que este parámetro no varía demasiado a lo largo del tratamiento fotocatalítico.

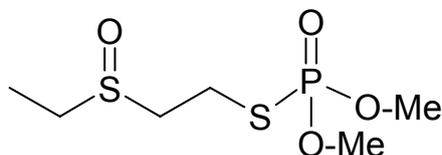
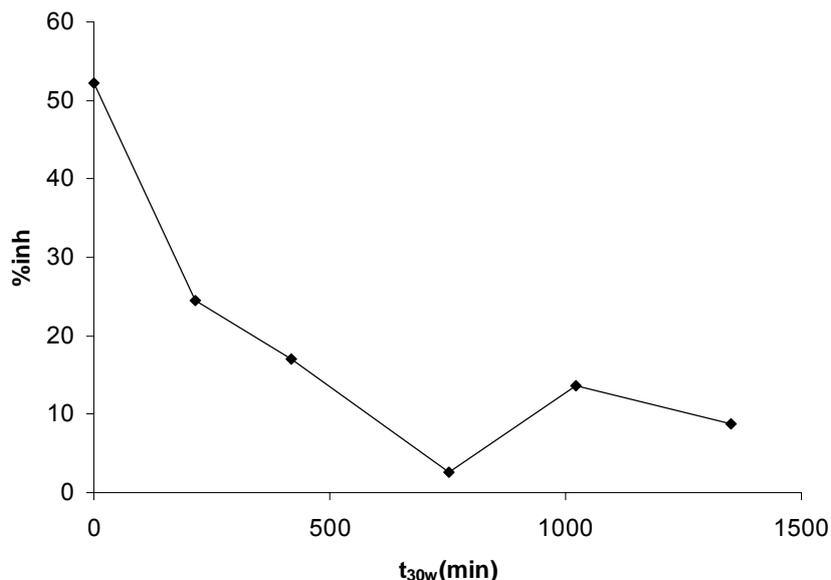


Figura 5.1. Estructura Química del metiloxidemeton

Sin embargo, se realizaron pruebas adicionales para comprobar este punto, pues la eliminación total del principio activo no se ha podido conseguir.

t_{w30} (min)	Metiloxidemeton (mg/L)	TOC(mgC/L)	%inh OUR
0	50,0	132	52
216	38,6	128	25
418	31,5	118	17
752	26,6	108	3
1022	21,7	103	14
1350	14,1	101	9

Tabla 5.7. % inhibición de la respiración de fangos activos del Metasystox



Gráfica 5.7. % inhibición de la respiración de fangos activos del Metasystox

Ultracid

Se estudió entonces, el comportamiento de otro plaguicida como el Ultracid, que contiene el metidation como principio activo (Figura 5.2). Se trata de un compuesto organotiofosforado como el anterior, pero en este caso sí se consiguió una eliminación total del principio activo y una casi completa mineralización de la disolución (Tabla 5.8). Tanto en esta tabla como en la Gráfica 5.8 se puede observar que hay un progresivo descenso de la inhibición medida hasta lograr la casi total detoxificación.

También se puede deducir la existencia de una relación directa entre la concentración del principio activo y la inhibición, pero el hecho de que quede un 13% de inhibición cuando se ha eliminado ya el metidation indica que se forman pequeñas cantidades de intermedios con cierta toxicidad.

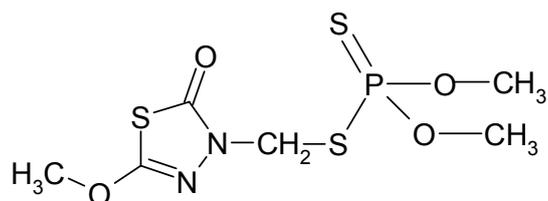
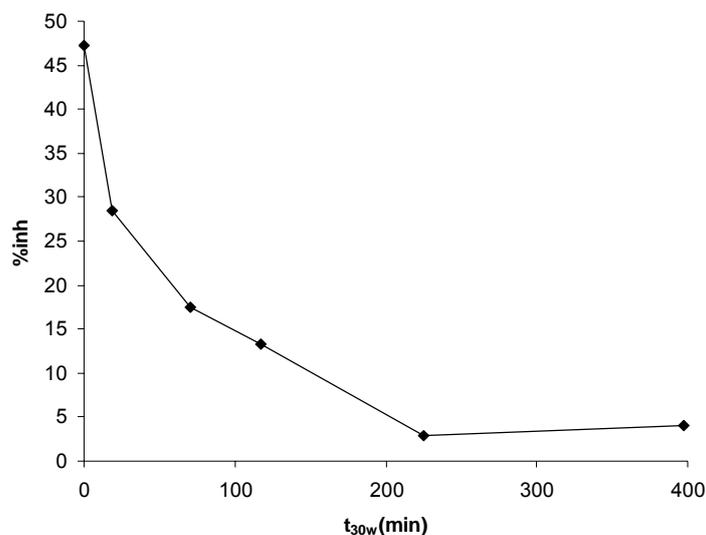


Figura 5.2. Estructura química del metidation

Otra posibilidad sería relacionar la toxicidad con la presencia de compuestos organofosforados del metidation principio activo del Ultracid (ver Figura 5.2), pues la pérdida de ésta grupo funcional ocurre en los primeros pasos de la degradación oxidativa de estas especies, tal y como se habría estudiado previamente (Konstantinou, I.K. y col., 2003; Evgenidou, E. y col., 2005) y se ha observado en este caso (García-Ripoll, A. y col., 2007).

t_{30w} (min)	Metidation (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh OUR
0	41,0	31	47
19	21,2	36	28
71	4,3	34	17
117	0,0	29	13
225	0,0	17	3
398	0,0	1	4

Tabla 5.8. % inhibición de la respiración de fangos activos del Ultracid



Gráfica 5.8. % inhibición de la respiración de fangos activos del Ultracid

SevnoI

El SevnoI está basado en el carbaril, que a diferencia de los compuestos anteriores pertenece a la familia de los carbamatos. Se estudió la evolución de la toxicidad de este compuesto a lo largo del tratamiento (Gráfica 5.9) y se vió que, a diferencia de lo

que ocurría en los casos anteriores, aquí no hay una relación clara entre la desaparición del principio activo y la detoxificación.

Observando los datos de la Tabla 5.9 se ve que tras la desaparición del carbaril, la toxicidad es similar a la inicial y hace falta una mineralización casi total para detoxificar la disolución. Esto se puede deber a la formación de aminas, en la degradación del grupo carbamato, principio activo del Sevnol (ver Figura 5.3) (Pramauro, E. y col., 1997; Konstantinou, I.K. y col., 2003) y que pueden seguir siendo muy tóxicos frente a los fangos activos. De todos modos hay que indicar que el carbamato parece ser menos tóxico, pero más persistente, que los organotiofosforados.

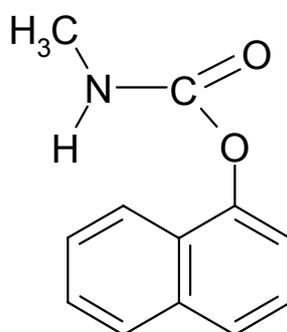
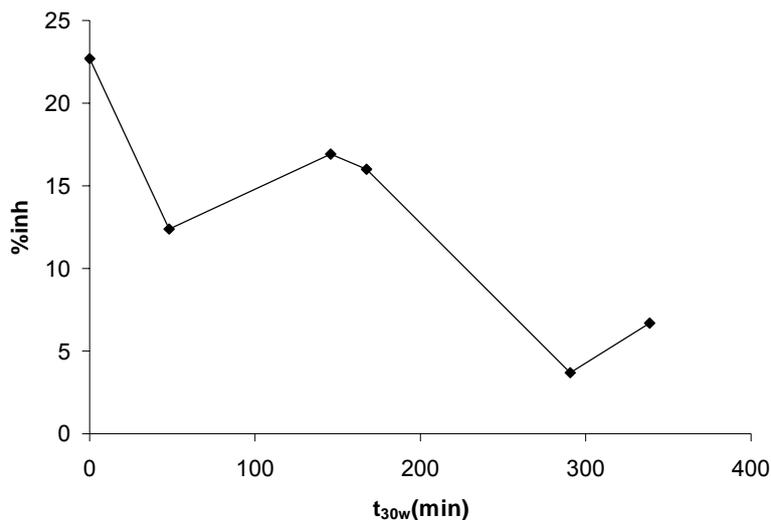


Figura 5.3. Estructura química del carbaril

t_{30w} (min)	Carbaril (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh OUR
0	45,5	33	23
48	29,1	26	12
146	0,0	7	17
168	0,0	5	16
291	0,0	2	4
339	0,0	0	7

Tabla 5.9. % inhibición de la respiración de fangos activos del Sevnol



Gráfica 5.9. % inhibición de la respiración de fangos activos del Sevnol

Laition

Se estudió entonces otro plaguicida comercial, el Laition, que tiene como principio activo el dimetoato, compuesto que presenta un grupo tiofosfato junto con otro carbamato. Observando la Tabla 5.10 y en la Gráfica 5.10 se puede comprobar que en este caso hay una detoxificación rapidísima en los primeros momentos de la reacción fotocatalítica, coincidiendo con la desaparición del principio activo, y probablemente la liberación del grupo tiofosfato (Evgenidou, E. y col., 2005; Oller, I. y col., 2005). Sin embargo queda una toxida residual del 10-20% que también se puede asociar, como en el caso del carbatil, a la formación de aminas provenientes del carbamato.

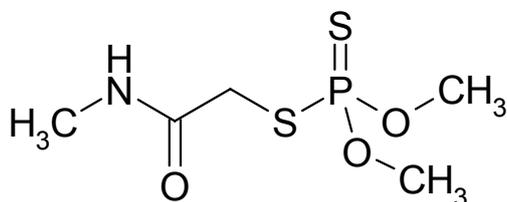
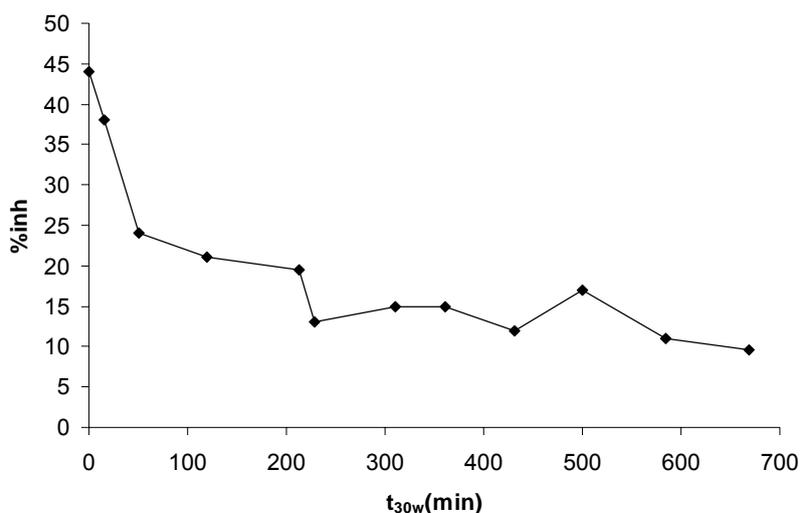


Figura 5.4. Estructura química del dimetoato

t_{w30} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh OUR
0	44,4	56	44
16	36,8	51	38
50	25,8	54	24
119	0,0	53	21
212	0,0	54	20
228	0,0	52	13
311	0,0	47	15
361	0,0	45	15
431	0,0	35	12
500	0,0	33	17
584	0,0	21	11
669	0,0	15	10

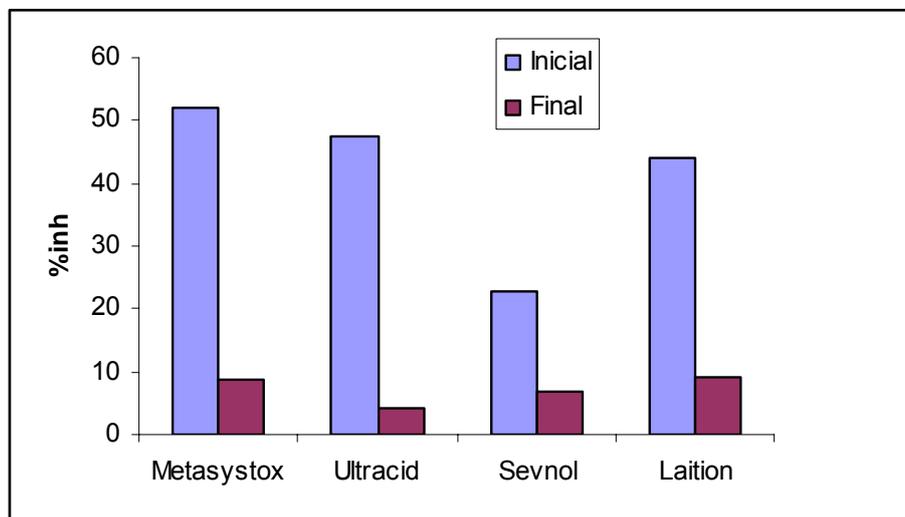
Tabla 5.10. % inhibición de la respiración de fangos activos del Laition



Gráfica 5.10. % inhibición de la respiración de fangos activos del Laition

Como resumen de los resultados, la Gráfica 5.11 muestra que tras el proceso de fotocatalisis solar, se ha producido una importante detoxificación, de acuerdo con este método de análisis. Se pueden ver diferencias entre los diferentes plaguicidas siendo los del tipo organotiofosforados más tóxicos, mientras que los carbamatos presentan una menor toxicidad inicial aunque ésta resulta más persistente, probablemente debida a la formación de aminas, como intermediarios de reacción, que siguen siendo tóxicas.

Para comprobar esta hipótesis sería necesario análisis de los intermedios formados, por medio de cromatografía GC-MS. Esta podría ser una línea de investigación interesante para seguir en el futuro.



Gráfica 5.11. Comparación de la inhibición de la respiración por los fangos de los plaguicidas

ÁCIDO FERÚLICO

Una vez se ha comprobado que la respirometría de fangos activos puede ser un método adecuado para estimar la toxicidad de disoluciones acuosas de plaguicidas, se decidió extender el estudio a otro tipo de contaminantes, los fenólicos (en concreto el ácido ferúlico) como ejemplo de compuestos con toxicidad no muy elevada.

Con el fin de determinar la toxicidad del ácido ferúlico, se realizaron distintas pruebas con la disolución 0,001M (194 mg/L) de plaguicida inicial, y con una disolución acuosa de 10mg/L del fotocatalizador Acridin Yellow G (la misma que se utiliza en los tratamientos) para comprobar que el fotocatalizador no afectaba al valor medido. Los resultados obtenidos en ambos casos así lo demuestran produciéndose una toxicidad sin corregir de aproximadamente un 25% que, como ya hemos indicado con anterioridad, corresponde a la dilución de los fangos.

Por esta razón, se decidió comprobar la toxicidad sólo de la muestra inicial, la de una muestra intermedia (aquella en la que se hubiera eliminado aproximadamente el 50% del ácido ferúlico inicial) y una muestra al final del tratamiento. Los datos obtenidos se representan en la Tabla 5.11. Los valores obtenidos para la inhibición de la OUR de

fangos activos de las muestras analizadas coinciden, lo cual corrobora la falta de toxicidad tanto del ácido ferúlico como del acridine yellow G, y de los posibles intermedios formados en la degradación.

t_{30w} (min)	Ac. Ferúlico (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh OUR
0	194	120	2
68	11,6	115	1
663	2,4	101	1

Tabla 5.11. % inhibición de la respiración de fangos activos del ácido ferúlico

Este hecho parece indicar que, en contra de lo que ocurría con los plaguicidas, la inhibición de la respiración de fangos activos no parece ser un método suficientemente sensible para estudiar aquellos efluentes donde la toxicidad no es muy acusada y por tanto, es conveniente utilizar algún método adicional para asegurar que se ha conseguido la detoxificación de la muestra.

EFLUENTES INDUSTRIALES DE RECUBRIMIENTOS METÁLICOS: CIANUROS

Se ha extendido el estudio de medición de la toxicidad por fangos activos, a un efluente inorgánico de muy elevada toxicidad, como son las aguas residuales de recubrimientos metálicos, con elevadas concentraciones de cianuros y de metales pesados.

Para determinar la toxicidad de estos efluentes industriales utilizando fangos activos, se estudió en primer lugar la CE_{50} de los principales contaminantes existen en este tipo de aguas: cianuros y cobre (II). En los experimentos realizados en el laboratorio, utilizando el método de la inhibición de la OUR en fangos activos, se han obtenido los valores de CE_{50} para una disolución patrón de cianuros de 0,52 mg/L y para una disolución patrón de cobre (II) de 2,95 mg/L. Esto indica que como podría esperarse, la toxicidad del cianuro es mucho más elevada que en los casos anteriores, aunque también se ve afectada por la importante toxicidad del cobre.

Estos datos nos han permitido realizar el ensayo de la evolución de la toxicidad midiendo la inhibición de OUR, modificando los volúmenes de adición de la muestra a

los fangos en la parte experimental (ver Tabla 5.12). De la muestra inicial se añadieron 10 mL sobre los fangos activos provocando un %inh del 93%. Como en las siguientes muestras tratadas se había eliminado todo el contenido en cianuros, se añadieron volúmenes cada vez mayores para comprobar cuál era la toxicidad que provocaban. Los resultados obtenidos demuestran que a medida que el tratamiento fotocatalítico avanzaba la toxicidad iba disminuyendo.

El fuerte descenso de la toxicidad no se debe únicamente a la eliminación del cianuro libre y acomplejado (el carbono orgánico total residual se debe probablemente a la existencia de cianatos o de carbonatos que no han sido precipitados), sino que también el Cu^{2+} ha desaparecido totalmente según los análisis de emisión a la llama. Una posible explicación sería la precipitación de óxidos e hidróxidos a pHs alcalinos.

t_{30w} (min)	CN^- (mg/L)	CT (mgC/L)	Volumen muestra (mL)	%inh OUR
0	130	333,2	10	93
2	0	189,5	20	28
5	0	180,0	30	2
14	0	152,6	50	9
16	0	139,6	60	12
20	0	116,8	70	10
34	0	111,8	80	31
47	0	85,2	100	18

Tabla 5.12. % inhibición de la respiración de fangos activos del efluente de recubrimientos metálicos

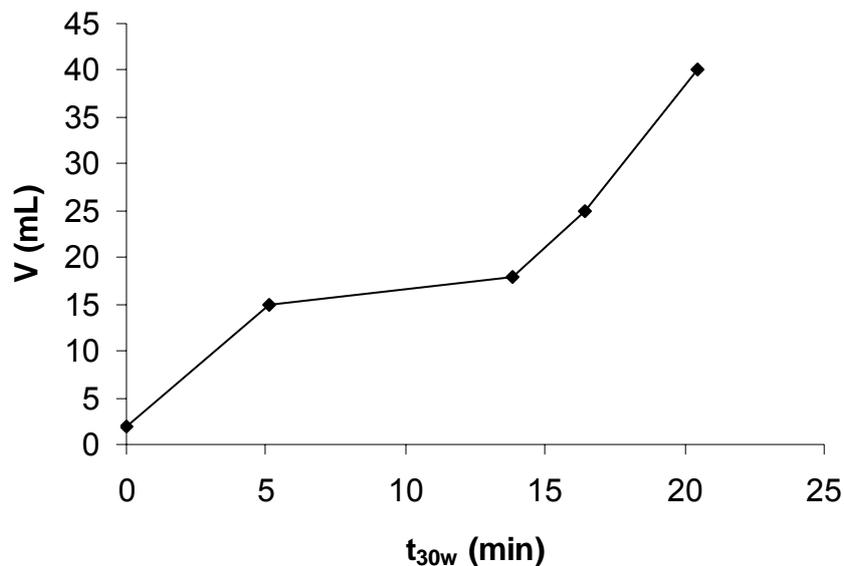
Como se puede observar en la tabla anterior, la variación de la toxicidad es tan marcada en este caso, que no se puede realizar el experimento empleando un volumen fijo de muestra, sino que este se tuvo que aumentar progresivamente porque dificulta la representación de los datos.

Para poder sistematizar el método, se realizó un experimento paralelo que nos diera el volumen, a distintos tiempos de tratamiento, que se tiene que añadir para obtener un valor del 50% de la inhibición de la OUR de fangos activos. Los datos obtenidos quedan reflejados en la Tabla 5.13 y la Gráfica 5.12. Como se observa, a medida que tratamos la muestra, se necesita mayor volumen para obtener una inhibición del 50% de la OUR de la inhibición de los fangos activos; esto muestra que se está

consiguiendo una importante detoxificación del efluente. Esta puede ser por tanto una buena manera de representar los datos cuando la variación de toxicidad es tan importante.

t_{30w} (min)	CT(mgC/L)	V (mL)
0	405	2
5	314	15
14	300	18
16	217	25
20	200	40

Tabla 5.13. Cálculo del volumen de efluente de recubrimientos metálicos tratados para provocar la inhibición de la respiración de fangos activos



Gráfica 5.12. Cálculo del volumen de efluente de recubrimientos metálicos tratados para provocar la inhibición de la respiración de fangos activos

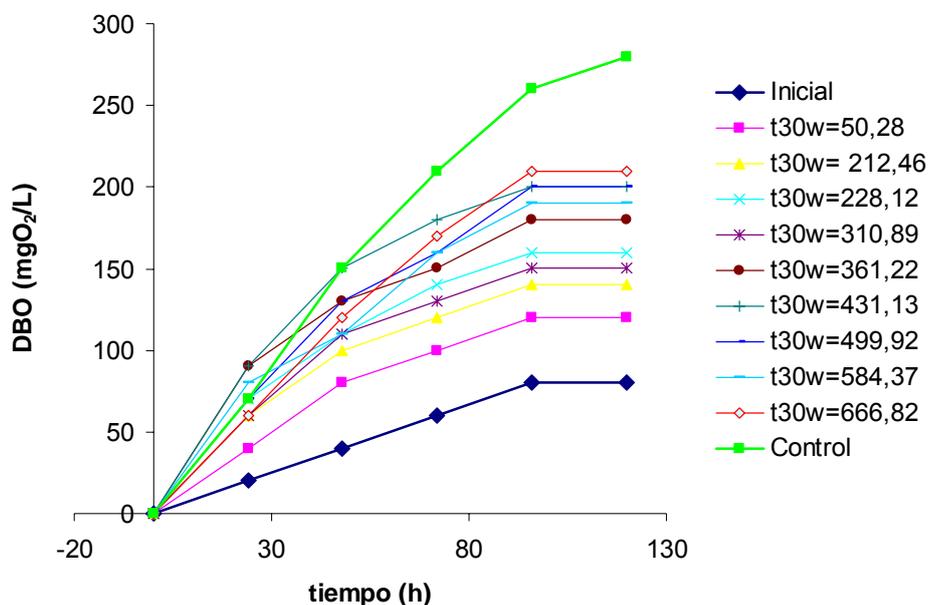
5.3.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅)

El ensayo de toxicidad utilizando la inhibición de la tasa de respiración de fangos activos tiene un tiempo de contacto entre el contaminante y los fangos activos relativamente corto (en la mayoría de casos de unos 10 min). Por esta razón se ha

decidido modificar el ensayo para permitir un mayor tiempo de contacto entre el contaminante y los fangos (5 días), para comprobar si existe alguna variación significativa en el resultado debido a este factor.

Para comprobarlo, se decidió elegir un plaguicida ya que es en ellos donde mejor se ha podido observar la variación de la toxicidad a lo largo del tratamiento. Esto se explica por la posible formación de intermedios que pueden presentar toxicidades diferentes al compuesto inicial. De entre los plaguicidas se eligió el Laition- dimetoato, ya que al poseer a la vez un grupo carbamato y un tiofosfato se forman intermedios de características muy diferenciadas asociadas a los grupos funcionales.

Los experimentos se realizaron tal como se indica en la sección experimental (apartado 4.4.2). Los datos obtenidos para las diferentes muestras tratadas, junto a la disolución patrón de glucosa-ácido glutámico se presentan en la Gráfica 5.13, donde se ha resaltado con un trazo más grueso la DBO₅ de la muestra inicial (azul oscuro) y de la sustancia control glucosa-ácido glutámico (verde).



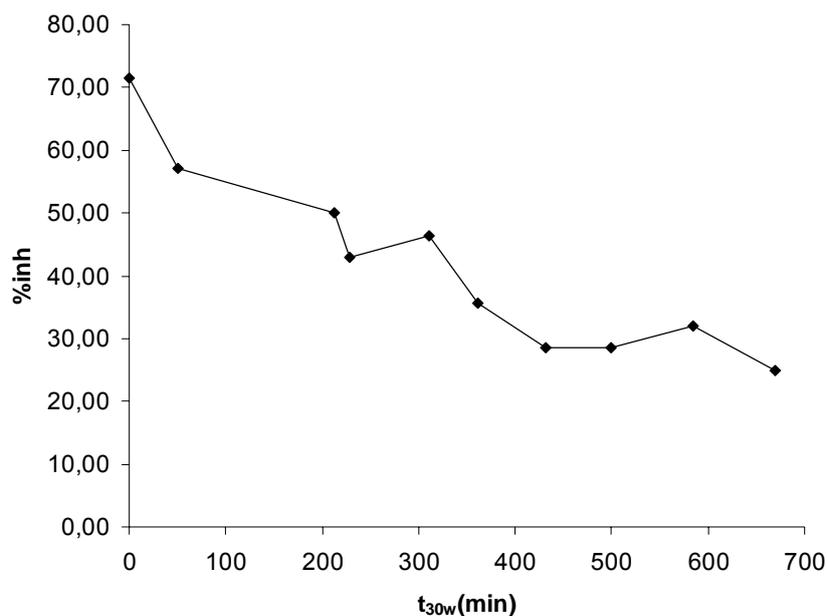
Gráfica 5.13. Ensayo de la DBO₅ del Laition

La medida de la toxicidad utilizando esta metodología se calcula según la Ecuación 4.7 y básicamente compara la DBO₅ del patrón con la de las diferentes muestras. Los resultados están expresados en la Tabla 5.14.

t_{30w} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh DBO ₅
0	44,4	56	71
50	25,7	54	57
212	1,2	54	50
228	0,0	52	43
311	0,0	47	46
361	0,0	45	36
431	0,0	35	29
500	0,0	33	29
584	0,0	21	32
669	0,0	15	25

Tabla 5.14. % inhibición de la DBO₅ del Laition

La Gráfica 5.14 nos refleja la evolución de la inhibición de la DBO en las distintas muestras utilizadas y se puede observar que a medida que tratamos el Laition, la toxicidad disminuye hasta alcanzar un valor del 25% de inhibición. Cuando se ha eliminado totalmente el plaguicida, la toxicidad todavía permanece elevada (la materia orgánica casi no ha disminuido) y cuando el COT empieza a descender, la toxicidad también sufre una importante disminución. Sin embargo, tampoco en este caso se consigue una total detoxificación debido probablemente a la presencia de intermedios aminados, provenientes de la eliminación del carbamato.



Gráfica 5.14. % inhibición de la DBO₅ del Laition

Comparando las gráficas 5.10 y 5.14 se ve que la tendencia en los dos métodos es la misma, aunque los valores medidos son mayores en el caso de la inhibición de la DBO₅. Esto se puede deber a dos causas:

- en el caso de la inhibición de la OUR, 500 mL de fangos eran sometidos al efecto de 250 mL de contaminantes, mientras que en la DBO₅ sólo un mililitro de inóculo se somete a la acción de 164 mL de muestra contaminada, por lo que la concentración real del tóxico es mucho mayor en este último caso.
- el tiempo de contacto es mucho mayor en la DBO₅ de manera que se puede observar el efecto bioacumulativo de los contaminantes.

Hay que decir que aunque este experimento puede ser útil, presenta el problema de la gran cantidad de tiempo que consume y de la necesidad de realizar muchos ensayos en paralelo, por lo que no puede ser utilizado como ensayo de rutina sino sólo en algunas muestras concretas, para ofrecer información complementaria a la inhibición de la OUR.

5.4.- MEDIDAS DE TOXICIDAD POR INHIBICIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE *Vibrio fischeri*

Puesto que los dos métodos anteriores, que utilizan bacterias de fangos activos (presentes en las balsas de aireación de los tratamientos biológicos de aguas residuales), han mostrado niveles de toxicidad medios y una disminución de ésta con el tratamiento fotocatalítico hemos considerado oportuno, utilizar otro método estandarizado como la inhibición de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*, para comprobar cómo varía la toxicidad de los contaminantes.

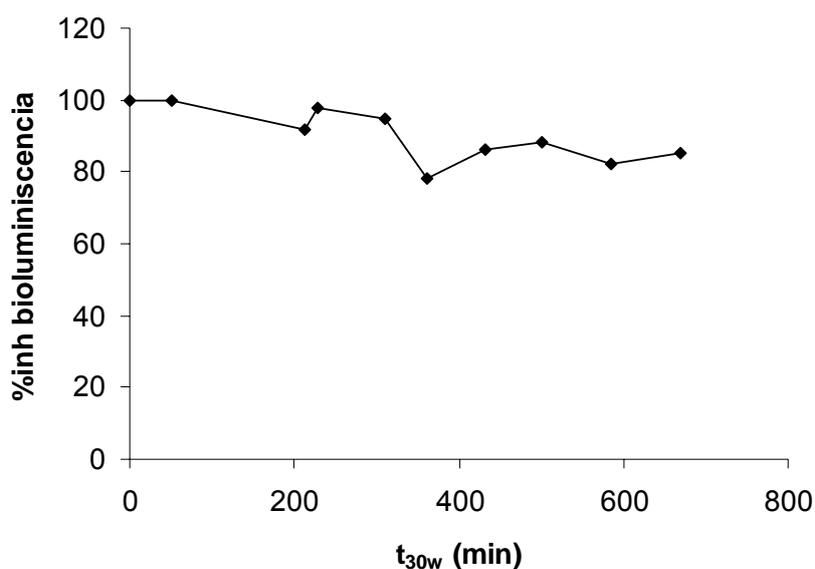
PLAGUICIDAS

Como ejemplo de plaguicidas se ha utilizado el Laition por las características que hemos expuesto en el apartado anterior, es decir, presencia simultánea de grupo carbamato y tiofosfato. Con ello se pretende además completar la comparación entre los tres métodos utilizados de toxicidad. Los datos obtenidos después del tratamiento fotocatalíticos se resumen en la Tabla 5.15 donde se dan valores de descenso del plaguicida por HPLC, calores del COT y la toxicidad en forma de %inh de la bioluminiscencia.

t_{w30} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh lumin.
0	44,4	56	100
50	25,8	54	100
212	0,0	54	92
228	0,0	52	98
311	0,0	47	95
361	0,0	45	78
431	0,0	35	86
500	0,0	33	88
584	0,0	21	82
669	0,0	15	85

Tabla 5.15. % inhibición de la luminiscencia producida por el Laition

En la Gráfica 5.15 se observa la evolución de la toxicidad mediante este análisis. Como se puede ver, la toxicidad de todas las muestras, incluida la inicial, las que ya no contienen plaguicida y la final con poca materia orgánica, presenta un elevado valor. Un experimento similar, en este caso utilizando el principio activo del Laition, el dimetoato puro, ha sido realizado por Evgenidou, E. y col., 2005. También muestra valores de toxicidad muy altos utilizando el método de la inhibición de la bioluminiscencia. Estos resultados muestran que el ensayo es mucho más sensible que los realizados con fangos activos, por lo que sólo debería emplearse cuando la toxicidad medida en estos ensayos es suficientemente baja, para asegurarnos de la total detoxificación del efluente tratado.



Gráfica 5.15. % inhibición de la luminiscencia producida por el Laition

ÁCIDO FERÚLICO

Para comprobar las conclusiones obtenidas en el apartado anterior, se ha aplicado este método de toxicidad al ácido ferúlico, que mostraba una toxicidad despreciable medida según fangos activos. Al igual que en los apartados anteriores se han utilizado sólo tres muestras (ninguna de las cuales mostraban toxicidad según los fangos activos): la inicial, una intermedia (con eliminación de aproximadamente el 50% de la concentración inicial) y la muestra al final del tratamiento. Los resultados se observan en la Tabla 5.16.

t_{30w} (min)	Ac. Ferúlico (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh lumin.
0	194	120	77
68	12	115	34
663	2	101	11

Tabla 5.16. % inhibición de la luminiscencia producida por el ácido ferúlico

Como se aprecia en los resultados, con el método de la inhibición de la bioluminiscencia si se aprecia una toxicidad inicial del ácido ferúlico (77%) y cómo ésta va disminuyendo a medida que aplicamos el tratamiento fotocatalítico. Esto corrobora la idea anteriormente indicada de que este método se debería emplear para asegurar la toxicidad de aquellas muestras donde los fangos activos ya no son útiles (baja toxicidad), debido a su falta de sensibilidad.

5.5.- COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE MEDIDA DE TOXICIDAD

Una vez realizados los tres métodos de medida de la toxicidad, y a modo de resumen, hemos realizado una comparación de los resultados obtenidos que se presenta en la Tabla 5.17. Para ello nos hemos basado en el estudio del Laition al cual se le han aplicado los tres métodos. En ella se puede apreciar varios aspectos: en primer lugar se observa que la toxicidad con el método de medida de la inhibición de la

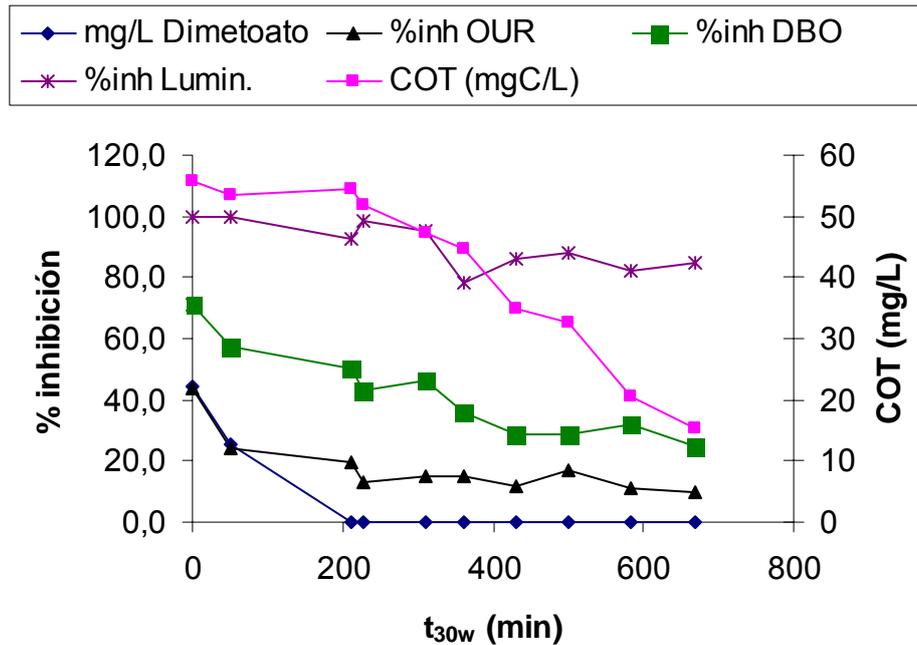
bioluminiscencia presenta un valor más alto que en los otros métodos, incluyendo las muestras que contenían plaguicida y en las que este ya había sido eliminado. Esto podría ser debido a la aparición de intermedios tóxicos en el proceso de degradación fotocatalítica del plaguicida demostrando la alta sensibilidad del método.

t_{w30} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	%inh OUR	%inh DBO₅	%inh lumin.
0	44,4	56	44	71	100
50	25,8	54	24	57	100
212	0,0	54	20	50	92
228	0,0	52	13	43	98
311	0,0	47	15	46	95
361	0,0	45	15	36	78
431	0,0	35	12	29	86
500	0,0	33	17	29	88
584	0,0	21	11	32	82
669	0,0	15	10	25	85

Tabla 5.17. Comparación de la toxicidad del Laition utilizando los tres métodos

Por otra parte también es destacable el hecho de que sólo el método de la inhibición de la OUR de fangos activos, tenga una pérdida de toxicidad importante cuando se degrada el plaguicida aunque la muestra resultante mantenga aún una elevada cantidad de materia orgánica. En los demás métodos, la materia orgánica presente parece provocar aún una elevada toxicidad en la muestra ensayo.

Pese a todo y como se puede observar en la Gráfica 5.16 la evolución en la toxicidad de la muestra es similar en todos los casos. Se aprecia un descenso paulatino de la toxicidad a medida que transcurre el tratamiento fotocatalítico. La eliminación del principio activo del plaguicida no parece estar directamente relacionado con la toxicidad de la muestra debido a la formación de intermedios que todavía muestran un acierta toxicidad.



Gráfica 5.16. Comparación de la toxicidad del Laition utilizando los tres métodos

Esto podría explicarse si observamos dos aspectos de los ensayos: por una parte, el tipo de bacterias utilizadas, en el que se aprecia que las de los ensayos de respiración de fangos activos provienen de una EDAR con un proceso biológico y por otra, una bacteria marina a primera vista más sensible a este tipo de muestras.

El otro aspecto a destacar es el volumen de fangos activos utilizados en cada ensayo. En la inhibición de la OUR se utiliza una cantidad importante de fangos activos (1 L), mientras en la DBO se utiliza sólo 1 mL y en la inhibición de la bioluminiscencia el volumen aún es más pequeño, sólo 0,5 mL

También es importante analizar los valores obtenidos para el ácido ferúlico. Al comparar los dos métodos utilizados (la inhibición de la OUR y la inhibición de la luminiscencia, recordando que no utilizamos la inhibición de la DBO porque al tratarse de una modificación del primero, éste no había detectado toxicidad) los resultados son completamente diferentes. En la inhibición de la luminiscencia el ácido ferúlico si manifiesta toxicidad mientras en la inhibición de la OUR no ocurre. Las tendencias que muestran los distintos tipos de análisis son las mismas y habría que pensar en la procedencia de las bacterias utilizadas y en la mayor sensibilidad de las de tipo marino en los ensayos como posible explicación a estas diferencias cuantitativas.

5.6.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD CON LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO A TIEMPO CORTO (DBO_{st})

Para poder acoplar un proceso biológico a un pretratamiento fotoquímico, no sólo es necesario conseguir la detoxificación del efluente sino que además tenemos que asegurarnos que sea suficientemente biodegradable para que la materia orgánica pueda ser totalmente eliminada (Momani, F. y col., 2006; Ben Abderrazik, N. y col., 2002). De esta manera no quedarán compuestos persistentes que puedan ocasionar problemas a medio o largo plazo.

Si bien existen métodos ampliamente utilizados para medir la biodegradabilidad, como los basados en la DBO₅ (Rodríguez, M. y col., 2002) y el test de Zahn-Wellens (Lapertot, M.E. y col., 2006), es necesarios buscar otros cuya respuesta sea más rápida pero que mantenga la utilización de fangos activos para que los resultados sean asimilables a los que se puedan producir en un reactor biológico. En este contexto se va a estudiar la DBO_{st} basada en la respiración de fangos activos.

Como se ha indicado en el apartado 4.5.2. la demanda bioquímica de oxígeno a corto plazo (DBO_{st}) consiste en el cálculo del consumo de oxígeno por parte de los fangos activos, durante los instantes siguientes a la adición de la muestra problema. El valor de la DBO_{st} se calcula por integración de la OUR frente al tiempo, entre la adición de la muestra y el momento en que la respiración vuelve a aproximarse a la basal (ver figura 4.22).

PLAGUICIDAS

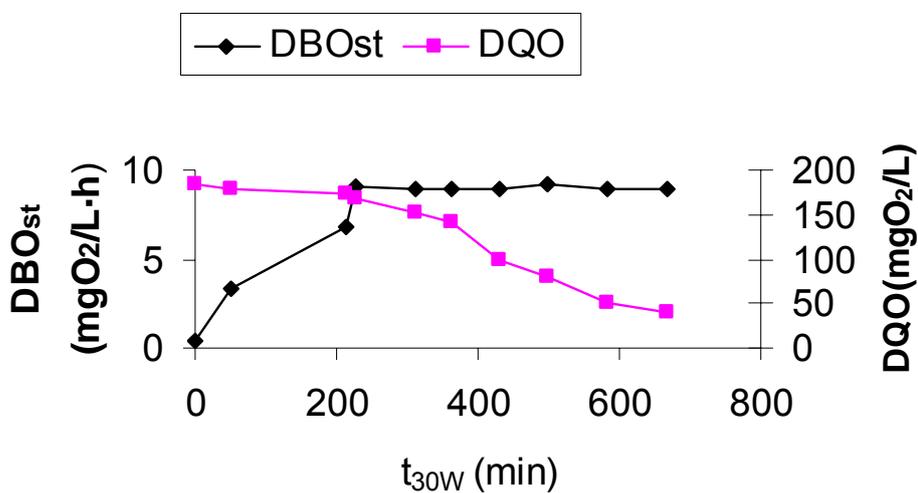
Al igual que hicimos en la medida de la toxicidad, se ha elegido el modelo Laition-dimetoato, debido a que presenta los dos grupos característicos de los demás plaguicidas, tiofosfato y carbamato, para estudiar este método de medida de la biodegradabilidad.

Se ha determinado la DBO_{st} para el Laition, y los resultados obtenidos están reflejados en la Tabla 5.18. Como se puede apreciar en la Gráfica 5.17 la evolución de la DBO_{st} es favorable, lo que indica un aumento de la biodegradabilidad, hasta que se estabiliza el valor de la DBO_{st} en un valor cercano a 9 mgO₂/L·h debido al efecto de la mayor oxidación de la materia orgánica.

$t_{30w}(\text{min})$	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	DBO _{st} (mgO ₂ /L)	DQO (mgO ₂ /L)
0	44,4	56	0,4	185
161	25,7	54	3,4	180
212	1,2	54	6,8	174
247	0,0	52	9,1	167
311	0,0	47	9,0	153
361	0,0	45	8,9	141
403	0,0	35	9,0	99
500	0,0	33	9,2	81
584	0,0	21	8,9	51
669	0,0	15	8,9	39

Tabla 5.18. Valores de la DBO_{st} y de la DQO del Laition

Los valores de la DBO_{st} son bastantes bajos; este hecho se puede deber a que no todos los compuestos son metabolizados por los microorganismos en tan breve espacio de tiempo, por lo que sirven para apreciar bien las tendencias pero se necesitan pruebas adicionales a más largo plazo.



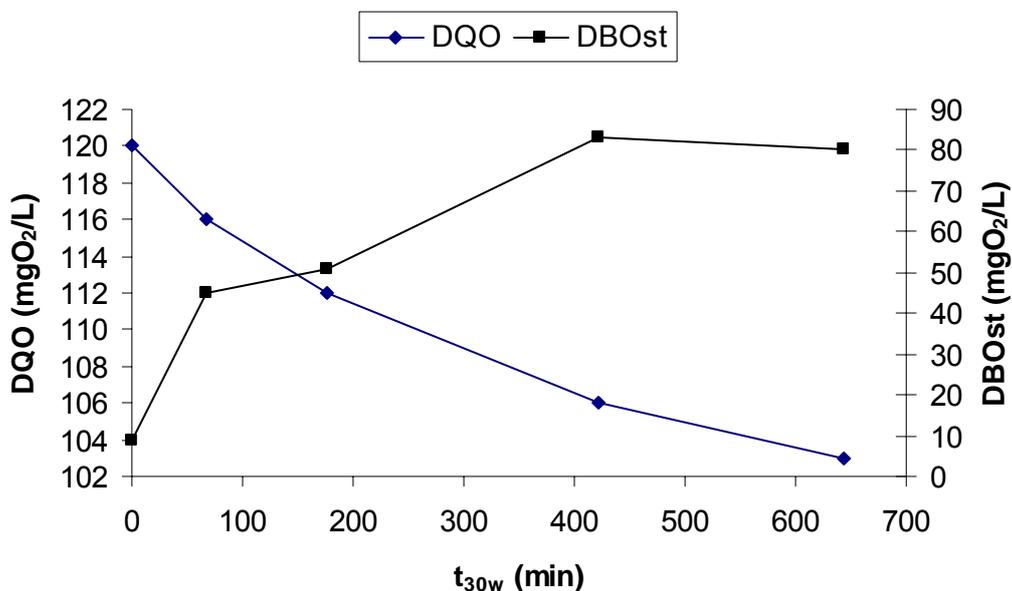
Gráfica 5.17. Variación de la DBO_{st} y de la DQO del Laition

ÁCIDO FERÚLICO

Se calculó la DBO_{st} para un compuesto fenólico, el ácido ferúlico, tras diversos periodos de tratamiento con amarillo de acridina como fotocatalizador solar. Los resultados de la Tabla 5.19 y la Gráfica 5.18 indican que hay un claro incremento en la DBO_{st} , durante el tratamiento hasta alcanzar un valor estable alrededor de los 83 $mgO_2/L \cdot h$. Este comportamiento se puede asociar a un aumento claro de la biodegradabilidad inmediata de la muestra tratada.

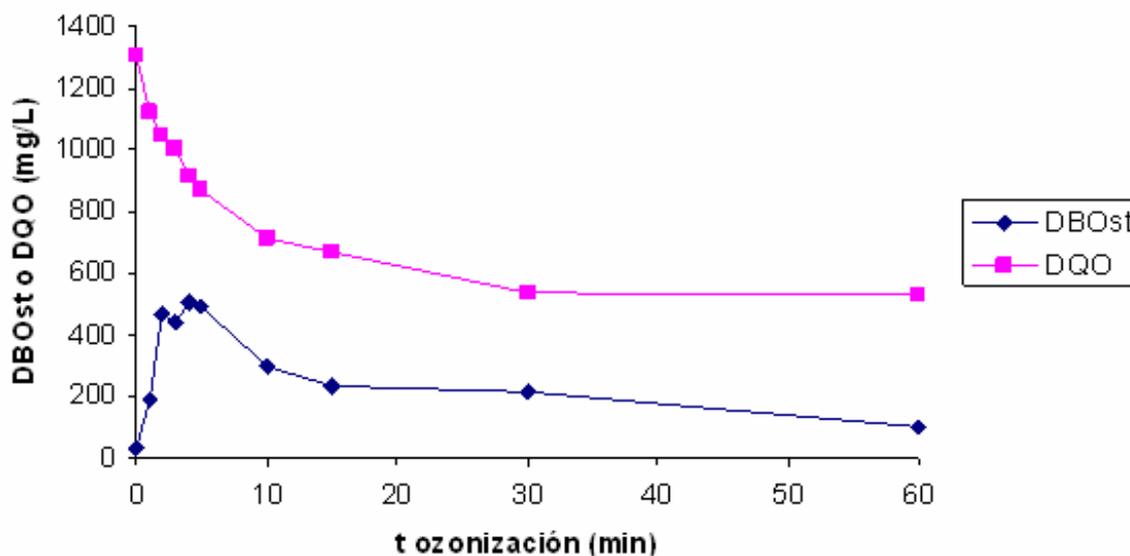
$t_{30w}(\text{min})$	Ac.Ferúlico (mg/L)	DBO_{st} (mgO_2/L)	DQO (mgO_2/L)
0	194	9	120
68	10	45	116
177	6	51	112
421	3	83	106
643	2	80	103

Tabla 5.19. Valores de la DBO_{st} y de la DQO del ácido ferúlico



Gráfica 5.18. Variación de la DBO_{st} y de la DQO del ácido ferúlico

Estudios previos de este grupo de investigación realizados con una mezcla de 4 ácidos cinámicos (ferúlico, p-cumárico, cafeico y cinámico) sometidos a ozonización (Amat A.M. y col., 2003) mostraron que en las primeras fases de la reacción se produjo un fortísimo aumento en el valor de la DBO_{st} , debido a la formación de intermedios más biodegradables. Sin embargo, en un segundo tramo, se observaba un lento descenso de este valor, asociado a una oxidación más intensa de la materia orgánica y formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ver Gráfica 5.19). Un comportamiento similar se observó con las aguas residuales de la industria papelera, donde tratamientos suaves producían incrementos en la DBO_{st} , mientras que si este es más enérgico, como la ozonización en medio básico, se podía observar una disminución (Amat A.M. y col., 2005 a y b).



Gráfica 5.19. Variación de la DBO_{st} y de la DQO de ácidos fenólicos después de un tratamiento de ozonización

El tratamiento del ácido ferúlico con Acridin Yellow G es un tratamiento claramente más suave que la ozonación, con una disminución de la DQO muy ligera (en torno al 20%) y un fuerte aumento de la relación DBO_{st}/DQO . Las dos gráficas nos indican que sería comparable con los primeros minutos de la ozonización de la muestra; así, el fuerte incremento en la BOD_{st} sería debido a la formación de intermedios más biodegradables. En este contexto, hay que indicar la detección de cantidades significativas de vanilina, un aldehído aromático muy biodegradable.

5.7.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD CON LA RELACIÓN ENTRE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO Y LA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DBO₅/DQO)

La biodegradabilidad a medio plazo es un parámetro importante de medida y puede proporcionar relevante información sobre el proceso de biodegradación de un contaminante en fangos activos. Sin embargo la medida de la DBO, en cualquiera de sus acepciones (DBO_{st} y DBO₅) no tiene en cuenta el grado de oxidación de los diferentes compuestos de una mezcla. De esta forma puede observarse al final de los procesos oxidativos un leve descenso de la DBO, debido a una mayor oxidación química de la materia orgánica requiriendo menos oxígeno para su paso a CO₂. Por tanto esta disminución no se debe asociar a una bajada de la biodegradabilidad. Si combinamos estas medidas con la DQO, se puede corregir este problema Contreras, S. y col.; 2003; Guhl, W. y col., 2006).

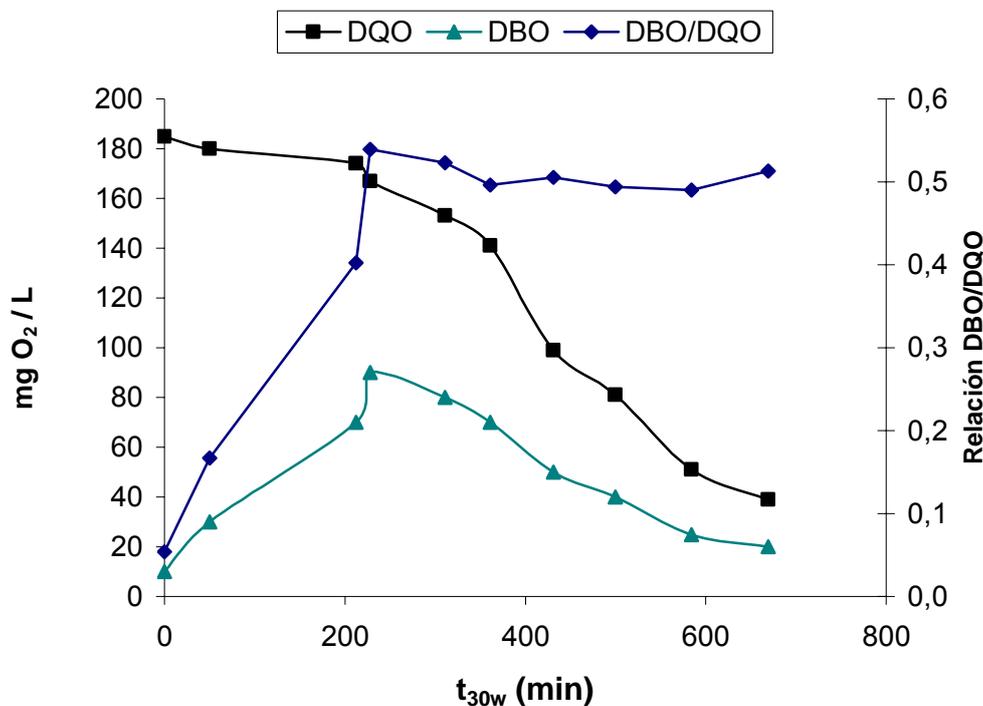
PLAGUICIDAS

Como ya hemos indicado en el apartado anterior, se ha estudiado esta metodología empleando el Laition. Aunque la relación DBO_{st}/DQO puede calcularse los valores son tan bajos que no se puede obtener ninguna conclusión; por lo tanto, se ha calculado la DBO₅ y la relación DBO₅/DQO. Los datos obtenidos en la determinación de la DBO₅ y la DQO a lo largo del tratamiento fotocatalítico se presentan en la Tabla 5.20.

t _{30w} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mg/L)	DBO ₅ (mgO ₂ /L)	DQO (mgO ₂ /L)	(DBO ₅ /DQO)
0	44,4	56	10	185	0,1
50	25,7	54	30	180	0,2
212	1,2	54	70	174	0,4
228	0,0	52	90	167	0,5
311	0,0	47	80	153	0,5
361	0,0	45	70	141	0,5
431	0,0	35	50	99	0,5
500	0,0	33	40	81	0,5
584	0,0	21	25	51	0,5
669	0,0	15	20	39	0,5

Tabla 5.20. Valores de la DBO₅ y de la DQO del Laition

Como se puede observar en la Gráfica 5.20, la relación DBO/DQO aumenta de forma considerable con el tratamiento fotocatalítico, desde la muestra inicial hasta alcanzar un valor máximo y estable de aproximadamente 0,5, cuando empieza a producirse la mineralización de la muestra (se reducen los valores de DBO y DQO).



Gráfica 5.20. Variación de la DBO₅ y de la DQO del Laition

Los estudios realizados con anterioridad proponen que un valor de la relación DBO/DQO mayor o igual a 0,4 indica que el compuesto es biodegradable (Goi, A. y col., 2004). En el estudio realizado al Laition se observa que se llega a un valor mayor de 0,4 por lo que podemos considerar que el compuesto tratado pasa a ser biodegradable por los fangos activos.

Una comparación entre los valores de DBO₅ y DBO_{st}, muestra que si bien las tendencias son similares los valores de DBO₅ son siempre más altos. Esto puede deberse al mayor tiempo de que disponen los fangos para metabolizar la materia orgánica, de modo que no sólo se consume la más fácilmente metabolizable sino que tras agotarse ésta, pueden consumirse otras especies.

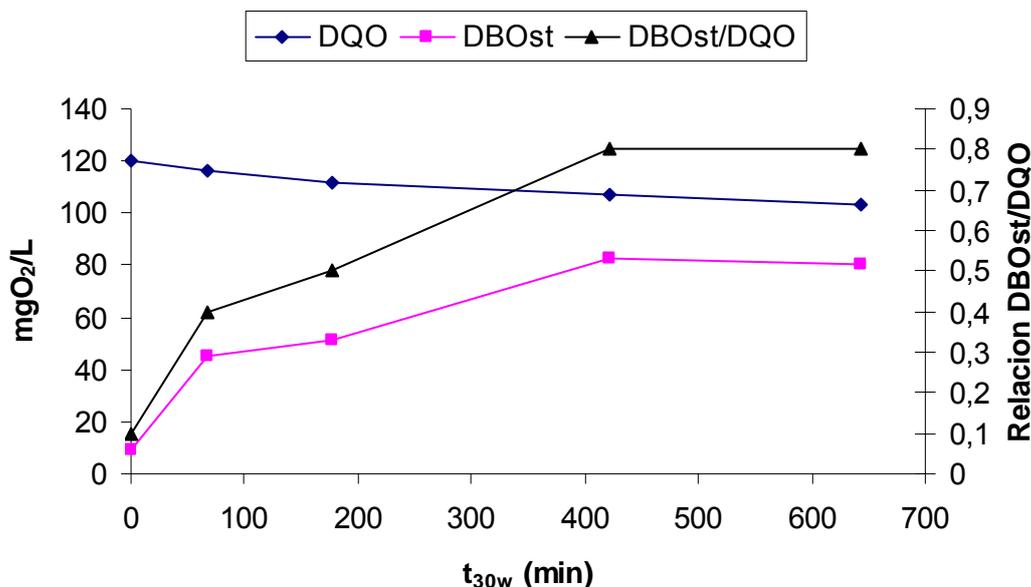
FERÚLICO

Como hemos expuesto en el apartado anterior al estudiar la DBOst, el ácido ferúlico tiene un comportamiento tal, que en el tratamiento fotocatalítico parece formar intermedios biodegradables en su degradación. En la Tabla 5.21 se pueden observar los datos obtenidos para este tratamiento.

t_{30w} (min)	Ac.Ferúlico (mg/L)	DBOst (mgO ₂ /L)	DQO (mgO ₂ /L)	DBOst/DQO
0	194	9	120	0,1
68	10	45	116	0,4
177	6	51	112	0,5
421	3	83	107	0,8
643	2	80	103	0,8

Tabla 5.21. Valores de la DBOst y de la DQO del ácido ferúlico

En la Gráfica 5.21 se puede comprobar que la biodegradabilidad del ácido ferúlico (relación DBOst/DQO) aumenta con el tratamiento fotocatalítico, estabilizándose en un valor próximo a 0,8 cuando la materia orgánica empieza a oxidarse (como demuestra el descenso de la DQO).



Gráfica 5.21. Variación de la DBOst y de la DQO del ácido ferúlico

Puesto que en los ensayos realizados sobre la evolución de la biodegradabilidad del ácido ferúlico con el tratamiento fotocatalítico son tan favorables (relación DBOst/DQO próximas a 0,8), identificando una biodegradabilidad muy importante, consideramos que no es necesario realizar un ensayo de biodegradabilidad a más largo plazo.

5.8.- MEDIDAS DE BIODEGRADABILIDAD COM EL MÉTODO DE ZAHN-WELLENS

El test de Zahn-Wellens es un método de medida de la biodegradabilidad intrínseca (Rodríguez, M. y col., 2002) que utiliza también fangos activos, aunque en este caso el tiempo de contacto entre el contaminante y los fangos es bastante largo, 28 días. La medida de la biodegradabilidad se realiza midiendo el COT de las diferentes muestras a lo largo de los 28 días y utilizando la ecuación 4.8. Esta metodología la hemos utilizado para evaluar la biodegradabilidad de los contaminantes cuando han dado bajos resultados en las pruebas de biodegradabilidad inmediata (DBOst y DBO₅ y su relación con la DQO).

Es por esta razón que este análisis se ha realizado para los plaguicidas Laition y Ultracid. En el caso del Laition se pretende, además, completar el análisis de la biodegradabilidad por los tres métodos estudiados y poder compararlos y observar qué conclusiones nos aportan y cómo varían.

Además se ha extendido el estudio al Ultracid, por que contábamos con su principio activo Metidation en estado puro, y podríamos comprobar cómo afectan las demás sustancias que componen el plaguicida comercial (recordar que el Ultracid contiene un 40% de metidation), cuando son expuestas a un proceso de degradación fotocatalítica y a un test como éste a largo plazo (posibles problemas de volatilidad de materia orgánica, o de solubilidad, etc.).

LAITION

Se ha medido la evolución de la biodegradabilidad del Laition después de un tratamiento fotocatalítico con TiO₂. En primer lugar se han presentado en la Tabla 5.22 los datos de COT (en mgC/L) obtenidos para las diferentes muestras tratadas y un patrón de dietilenglicol.

t(días)	COT ⁽¹⁾ Agua	COT ⁽¹⁾ Dietilenglicol	COT ⁽¹⁾ t _{30w} =0	COT ⁽¹⁾ t _{30w} =160,6	COT ⁽¹⁾ t _{30w} =246,7	COT ⁽¹⁾ t _{30w} =403
0	11	33	24	24	22	25
4	11	14	24	22	22	25
5	11	9	22	20	21	13
6	12	10	21	19	21	12
7	13	11	23	19	18	13
10	13	11	24	18	18	11
11	14	16	20	19	18	12
12	14	11	22	18	17	12
13	15	9	20	19	17	11
14	14	10	20	17	18	11
17	13	11	19	16	16	10
18	13	13	18	17	16	10
19	13	11	19	15	16	10
20	11	11	19	17	15	10
21	8	16	18	13	13	9
24	10	10	17	12	13	8
25	8	8	13	11	10	7

(1) Todos los COT están medidos en mgC/L

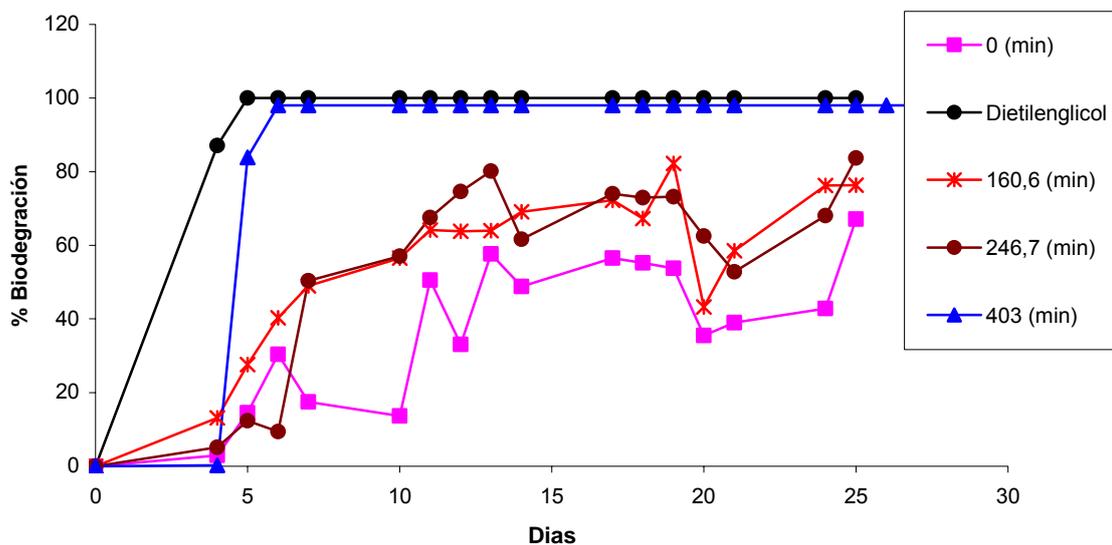
Tabla 5.22. Valores del COT del Laition en el método de Zahn-Wellens

Se seleccionaron unas muestras determinadas por diferentes motivos: la inicial, la de t_{30w}=160,6 min porque en ese momento, según el análisis de HPLC, queda aproximadamente la mitad del principio activo inicial; la de t_{30w}=246,7 min porque ya no queda nada del principio activo (aunque la mineralización aún no ha casi empezado) y la de t_{30w}=403 min porque ya se ha producido una mineralización importante. A continuación se obtuvo la biodegradabilidad de cada una de las muestras tratadas y del patrón, según la Ecuación 4.8. Los datos obtenidos aparecen descritos en la Tabla 5.23 y la evolución de la biodegradabilidad se refleja en la Gráfica 5.22.

Como se puede observar en la gráfica se produce un aumento de la biodegradabilidad a medida que tratamos las muestras, llegando a unos valores de casi el 100% de biodegradación. Los valores absolutos de biodegradabilidad de todas las muestras parecen ser más elevados que en los métodos utilizados con anterioridad, y eso podría deberse a la adaptación de los fangos al contaminante.

t(días)	%Biod. Dietilenglicol	%Biod. $t_{30w}=0$	%Biod. $t_{30w}=160,6$	%Biod. $t_{30w}=246,7$	%Biod. $t_{30w}=403$
0	0	0	0	0	0
4	87	3	13	5	0
5	100	15	28	12	84
6	100	30	40	9	98
7	100	18	49	50	98
10	100	14	57	57	98
11	100	51	64	68	98
12	100	33	64	75	98
13	100	58	64	80	98
14	100	49	69	62	98
17	100	57	72	74	98
18	100	55	67	73	98
19	100	54	82	73	98
20	100	36	43	63	98
21	100	48,7	59	53	98
24	100	43	76	68	98
25	100	67	76	84	98

Tabla 5.23. Valores de biodegradabilidad del Laition en el método de Zahn-Wellens



Gráfica 5.22. Variación de la biodegradabilidad del Laition en el método de Zahn-Wellens

ULTRACID

Como ya se ha comentado antes, también hemos comparado la biodegradabilidad de un plaguicida comercial con la de su principio activo para comprobar si existe una gran diferencia de comportamiento y determinar así la influencia de los excipientes de la formulación comercial en la biodegradabilidad total del compuesto. En este caso se ha comparado el Ultracid con el Metidation, su principio activo. Se han realizado medidas de COT de las muestras sin tratar y después de un tratamiento fotocatalítico con TiO₂ de 3 horas de duración (con un t_{30w} de aproximadamente 58 min). Las muestras iniciales tenían una concentración inicial de 50 mg/L en el principio activo. Los resultados aparecen en la Tabla 5.24.

t(días)	COT ⁽¹⁾ Agua	COT ⁽¹⁾ Dietilenglicol	Ultracid t=0	Ultracid t=3 h	Metidation t=0	Metidation t=3h
0	2	15	22	33	12	16
1	1	12	9	25	12	9
2	1	12	10	22	11	10
8	2	4	7	17	12	13
9	4	4	9	18	13	11
12	4	4	8	19	13	13
16	6	5	8	26	13	13
17	4	8	8	18	13	13
19	4	4	8	18	14	14
23	5	4	8	18	13	12
25	5	5	8	18	14	13
28	4	5	8	18	14	13

(1) Todos los COT están medidos en mgC/L

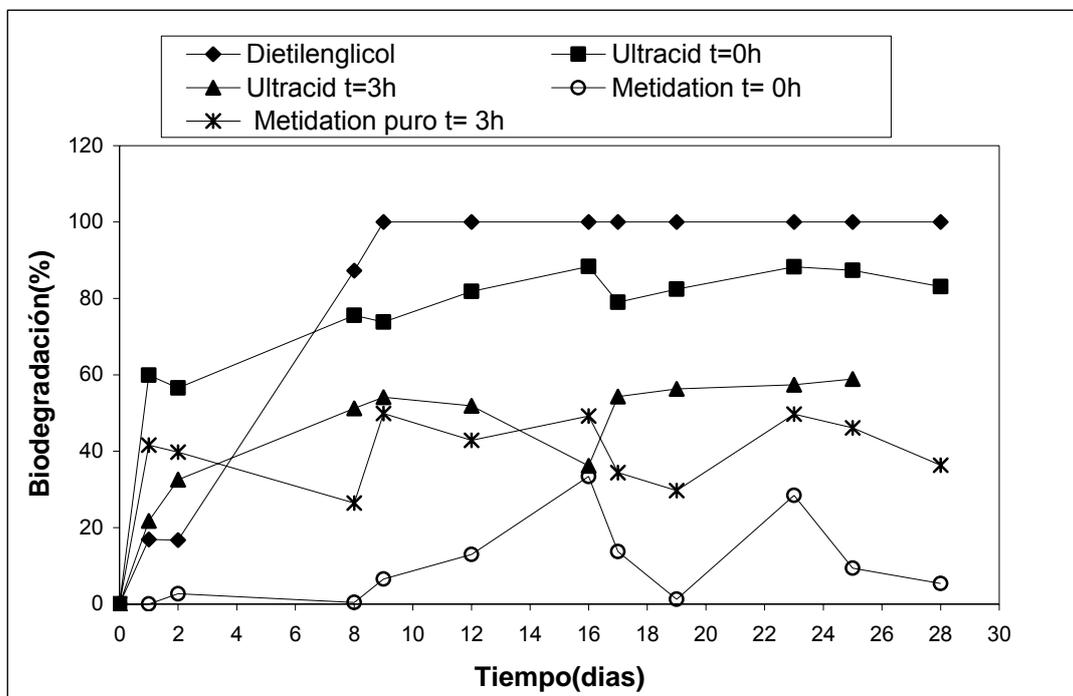
Tabla 5.24. Valores de COT del Ultracid y su principio activo, el metidation, en el método de Zahn-Wellens

A continuación se obtuvo la biodegradabilidad según la Ecuación 4.8. Los datos obtenidos aparecen descritos en la Tabla 5.25 y la evolución de la biodegradabilidad se refleja en la Gráfica 5.23.

Si se compara el valor de la biodegradabilidad de la muestra pura y el comercial, se puede comprobar que el metidation se queda en una biodegradabilidad próxima a cero, mientras que en el caso del Ultracid se aproxima al 80%. El análisis de HPLC muestra que la concentración del principio activo permanece constante a lo largo de todo el ensayo, confirmando que los microorganismos no pueden metabolizarlo.

t(días)	%Biod. Dietilenglicol	%Biod. Ultracid t=0	%Biod. Ultracid t=3 h	%Biod. Metidation t=0	%Biod. Metidation t=3h
0	0	0	0	0	0
1	17	60	22	0	42
2	17	57	33	3	40
8	87	76	51	0	27
9	100	74	54	7	50
12	100	82	52	13	43
16	100	88	36	33	49
17	100	79	54	14	34
19	100	82	56	1	30
23	100	88	57	29	50
25	100	87	59	9	46

Tabla 5.25. Valores de biodegradabilidad del Ultracid y su principio activo, el metidation, en el método de Zahn-Wellens



Gráfica 5.23. Variación de la biodegradabilidad del Ultracid y su principio activo, el metidation, en el método de Zahn-Wellens

La elevada biodegradabilidad del producto comercial puede tener dos explicaciones:

- los microorganismos son capaces de eliminar los excipientes orgánicos sin verse afectados por el principio activo
- se ha producido una evaporación de los elementos orgánicos volátiles que se encuentran en la formulación comercial del Ultracid (Lapertot, M. y col., 2006), ya que en ella están presentes compuestos como la ciclohexanona. Esta segunda hipótesis parece más probable ya que todo el descenso del COT ocurre el primer día.

En cuanto al tratamiento fotoquímico, en el caso del Ultracid no parece observarse un incremento de biodegradabilidad sino que incluso ésta desciende. Esto podría explicarse si se asume que la mayor parte de la disminución del COT se deba a la evaporación de volátiles de la muestra inicial; en la muestra tratada, estos representan una proporción mucho menor ya que una parte puede haberse evaporado y otra haber sufrido oxidación para dar compuesto de mayor punto de ebullición como ácidos carboxílicos. De hecho, en el experimento realizado con metidation puro, en ausencia de estas interferencias, sí hay un claro incremento de la biodegradabilidad tras el tratamiento fotoquímico (García-Ripoll, A. y col., 2007).

5.9.- COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE MEDIDA DE LA BIODEGRADABILIDAD

Una vez realizados los tres métodos de medida de la biodegradabilidad, hemos realizado un resumen de los resultados obtenidos que se presenta en la Tabla 5.26. Para ello nos hemos basado en el estudio del Laition al cual se le han aplicado los tres métodos. En ella se puede apreciar varios aspectos: en primer lugar se observa que la biodegradabilidad con el método del test de Zahn-Wellens presenta un valor absoluto más alto que en los otros métodos, incluyendo tanto las muestras que contenían plaguicida como aquellas en las que este ya había sido eliminado. Esto podría ser debido al mayor tiempo de que disponen los fangos activos para metabolizar la muestra. De todas formas los ensayos de HPLC en la muestra inicial no muestran consumo de principio activo por parte de los fangos activos.

t_{w30} (min)	Dimetoato (mg/L)	COT (mgC/L)	DBOst (mgO ₂ /L)	Relación DBO/DQO	%Biod. Zahn- Wellens
0	44,4	56	0,4	0,1	67
161	25,8	54	3,4	0,2	76
247	0,0	54	9,1	0,5	84
403	0,0	35	9	0,5	98

Tabla 5.26. Comparación de la biodegradabilidad del Laition utilizando los tres métodos

Por otra parte también es destacable el hecho de que tanto en el método de la DBOst como el de la relación DBO/DQO, los valores lleguen a estabilizarse cuando se degrada el plaguicida y la muestra empieza a presentar un grado de mineralización importante (empieza a descender la DQO).

Otro aspecto a destacar es el volumen de fangos activos utilizados en cada ensayo. En la medida de la DBOst se utilizan hasta 500 mL de fangos, llegando a los 2L en el test de Zahn-Wellens, mientras por el contrario en la medida de la relación DBO/DQO el volumen de fango utilizado es mínimo, 1 mL. Teniendo en cuenta el tiempo del experimento podría decirse que la DBOst es un buen método y rápido para estimar la posible biodegradabilidad de contaminantes, pero es conveniente ratificar estos resultados con ensayos a más largo plazo para tiempos seleccionados a partir de los resultados obtenidos.

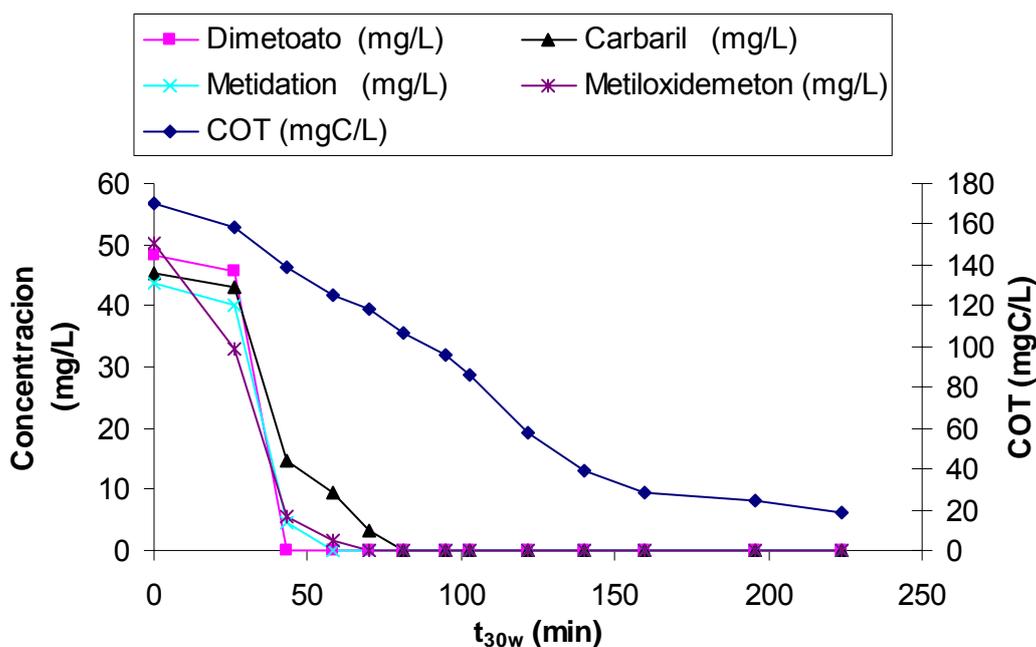
5.10. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL A UNA MUESTRA COMPLEJA

Una vez comprobados todos los métodos anteriores con sistemas sencillos, se ha decidido aplicar la metodología estudiada a una muestra más compleja como sería la mezcla de los cuatro plaguicidas comerciales utilizados en los estudios previos. Las concentraciones iniciales de cada principio activo se han fijado alrededor de 50 mg/L y su tratamiento fotoquímico ha sido mediante un proceso fotoFenton. Se ha preferido utilizar este método debido a que es más rápido y a que la muestra de los cuatro plaguicidas presenta una carga orgánica más elevada.

t_{30w} (min)	COT (mgC/L)	Dimetoato (mg/L)	Carbaril (mg/L)	Metidation (mg/L)	Metiloxidemeton (mg/L)
0	170	48,3	45,3	43,8	50,1
26	158	45,7	43,0	40,1	33,0
43	139	0,0	14,8	4,6	5,6
58	125	0,0	9,6	0,0	1,7
70	118	0,0	3,4	0,0	0,0
81	107	0,0	0,0	0,0	0,0
95	96	0,0	0,0	0,0	0,0
103	86	0,0	0,0	0,0	0,0
122	58	0,0	0,0	0,0	0,0
140	39	0,0	0,0	0,0	0,0
160	28	0,0	0,0	0,0	0,0
196	24	0,0	0,0	0,0	0,0
224	19	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 5.27. Valores de la mezcla de los plaguicidas de la mezcla con un proceso fotoFenton

Como se puede ver en la Tabla 5.27 y Gráfica 5.24 se produce una rápida eliminación de todos los principios activos, aunque se observa que el carbaril presenta una degradación más lenta debido a la ausencia del grupo tiofosfato, que como se ha indicado anteriormente se elimina muy rápidamente. De todas formas, para $t_{30w} = 70$ min se ha conseguido eliminar todos los principios activos, mientras que la mineralización es más lenta y tras un $t_{30w} = 224$ min, sigue existiendo un COT residual.



Gráfica 5.24. Variación de la mezcla de los plaguicidas de la mezcla con un proceso fotoFenton

En primer lugar se estudió la toxicidad de la muestra, compuesta por los cuatro plaguicidas Metasystox, Ultracid, Sevnol y Laition, tomadas a distintos tiempos de tratamiento (iniciales, cuando aún quedaba principio activo de cada uno de los plaguicidas, y al final del tratamiento cuando ya se había conseguido eliminarlo por completo e incluso la materia orgánica había descendido hasta valores bajos) según los tres métodos utilizados en esta tesis:

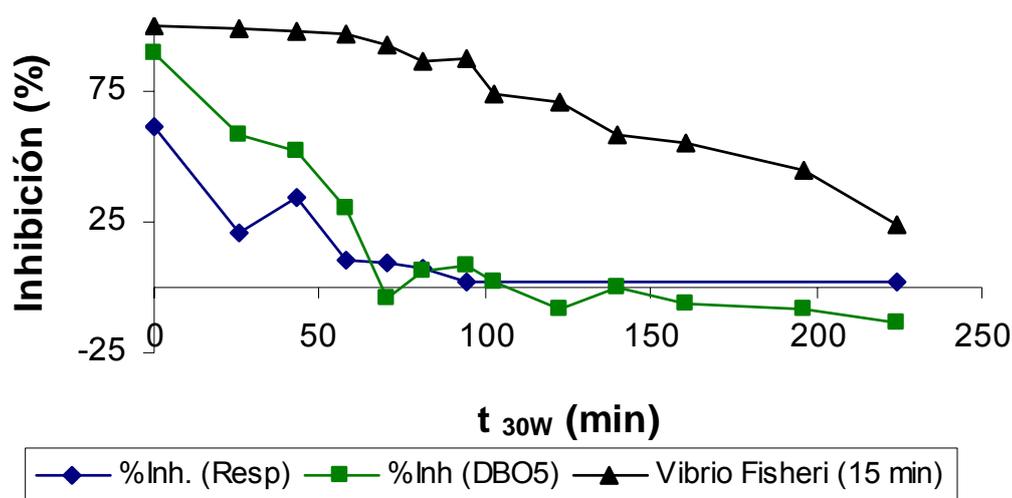
- inhibición de la OUR
- inhibición de la DBO₅
- inhibición de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.28 y su evolución en la Gráfica 5.25. Los resultados son los esperados a partir de los estudios previos, pues los tres métodos muestran un descenso de la toxicidad conforme avanza el proceso fotocatalítico; los mayores valores se observan para la inhibición de la bioluminiscencia.

t_{30 w} (min)	COT (mgC/L)	%inh lumin.	%Inh OUR	%Inh DBO₅
0	170	100	62	89
26	158	99	21	59
43	139	98	34	52
58	125	97	10	30
70	118	93	9	-4
81	107	86	8	7
95	96	87	2	9
103	86	74	2	2
122	58	71	0	-9
140	39	58	0	0
160	28	55	0	-7
196	24	45	0	-9
224	19	24	0	-13

Tabla 5.28. Comparación de la toxicidad de la mezcla de plaguicidas con los tres métodos

En cuanto a los otros dos métodos, basados en fangos activos, demuestran ser algo menos sensible que el anterior pues dan inhibiciones muy bajas a partir de un $t_{30w} = 70$ min. Los valores de la inhibición de la DBO₅ vuelven a presentar valores algo superiores a la inhibición de la OUR posiblemente debido a efectos acumulativos.



Gráfica 5.25. Comparación de la toxicidad de la mezcla de plaguicidas con los tres métodos

A continuación se estudió la biodegradabilidad de la mezcla de plaguicidas, utilizando para ello todos los métodos estudiados:

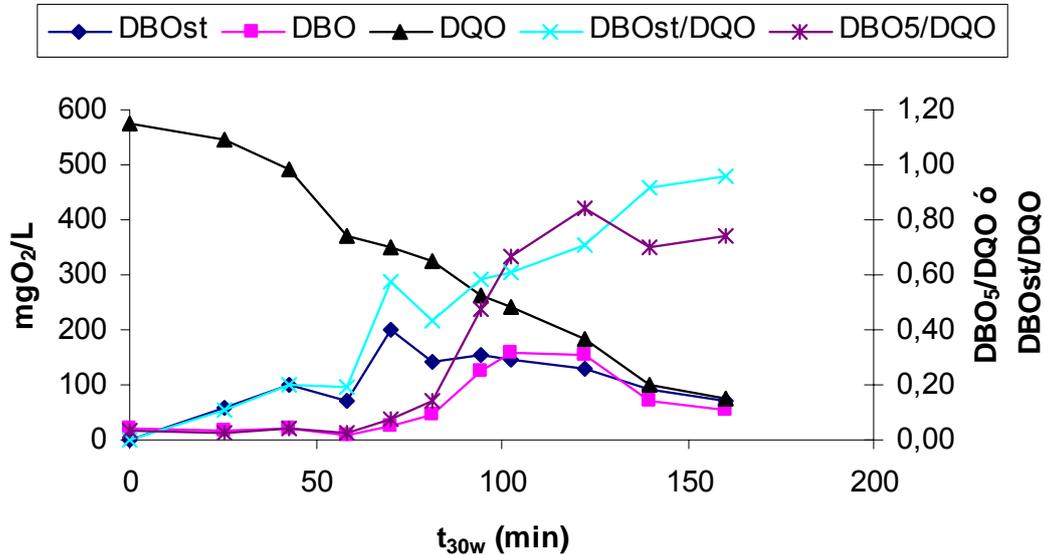
- DBOst
- relación DBO/DQO
- test de Zahn-Wellens.

Los resultados obtenidos en las pruebas de DBOst, DBO₅ y DQO se muestran en la Tabla 5.29. La evolución de estos valores se aprecia en la gráfica 5.26. Como se puede observar, a medida que avanza el tratamiento fotocatalítico la biodegradabilidad va aumentando como se deduce de las relaciones DBOst/DQO y DBO₅/DQO.

t _{30 w} (min)	DBOst (mgO ₂ /L)	DBO ₅ (mgO ₂ /L)	DQO (mgO ₂ /L)	DBOst/DQO	DBO ₅ /DQO
0	0,13	20	576	0,00	0,03
26	60	15	544	0,11	0,03
43	99	20	492	0,20	0,04
58	72	10	372	0,19	0,03
70	199	25	348	0,57	0,07
81	140	45	324	0,43	0,14
95	154	125	263	0,59	0,48
103	146	160	240	0,61	0,67
122	130	155	184	0,71	0,84
140	92	70	100	0,92	0,70
160	71	55	74	0,96	0,74

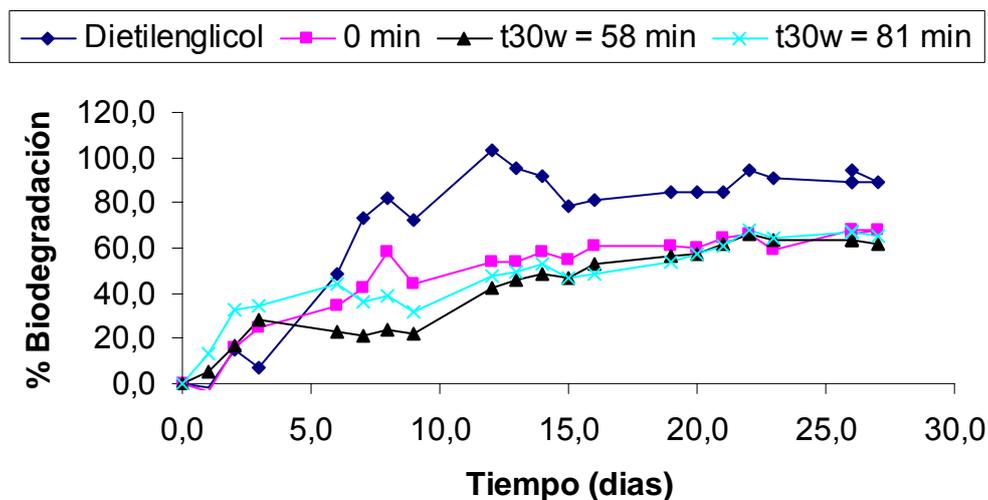
Tabla 5.29. Valores de la DBOst, DBO₅ y la DQO de la mezcla de plaguicidas

Esta variación puede estar fuertemente marcada por la presencia de principios activos muy tóxicos junto con excipientes orgánicos muy biodegradables como alcoholes, cetonas, etc. Conforme se van eliminando los compuestos tóxicos ($t_{30w}=50-100$ min), los microorganismos son capaces de metabolizar las sustancias biodegradables.



Gráfica 5.26. Variación de la DBOst, DBO₅ y la DQO de la mezcla de plaguicidas

Para realizar el estudio de biodegradabilidad con el test de Zahn-Wellens se eligió la muestra inicial, una muestra tomada antes de la desaparición de todos los principio activos ($t_{30w} = 58$ min) y otra tras la desaparición de todos ellos ($t_{30w} = 81$ min) pero con valores de COT aún relativamente altos. Se ha calculado el valor de la biodegradación y los resultados se muestran en la Gráfica 5.27.



Gráfica 5.27. Variación de la biodegradabilidad según el método de Zahn-Wellens de la mezcla de plaguicidas

Como se puede apreciar en la gráfica no se observan diferencias apreciables entre las tres muestras, con biodegradabilidades de alrededor del 60% al final del test. Esto no concuerda con los resultados obtenidos con los métodos anteriores y se puede deber a diversas causas:

- la mezcla de pesticidas es una muestra compleja, y el test de Zahn-Wellens está sometido a muchas interferencias, como puede ser la evaporación de compuestos volátiles o la precipitación de algunos de los componentes. Esto puede haber aumentado aparentemente la biodegradabilidad de la muestra inicial.
- la muestra analizada después de eliminar el principio activo ($t_{30w}=58$ min), puede no ser la más adecuada ya que está muy próxima a la desaparición del carbaril y puede quedar todavía intermedios tóxicos. De hecho las relaciones DBO/DQO alcanzan sus valores más altos pasado $t_{30w}=100$ min, y se debería haber realizado el test de Zahn-Wellens a partir de estas muestras, con lo que previsiblemente se apreciarían aumentos de la biodegradabilidad.

Aunque el test de Zahn-Wellens proporciona información muy valiosa sobre el proceso de biodegradación de contaminantes en los fangos activos, presenta importantes inconvenientes como es el prolongado tiempo de análisis y el elevado volumen de muestra necesario. Esto obliga a una selección previa muy cuidadosa del tiempo de irradiación en el cual realizamos la toma de muestra para el test. Para esta elección, se pueden utilizar los otros métodos de toxicidad y biodegradabilidad descritos que permiten la realización de mayor número de experimentos en un menor tiempo, junto con el resto de análisis químicos (HPLC, COT, DQO, etc.).

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES.

A partir del trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los procesos de oxidación avanzada producen una detoxificación en los tres tipos de aguas residuales investigadas; las tendencias observadas en los métodos analíticos empleados son las mismas, aunque aparecen diferencias cuantitativas dependiendo de la sensibilidad del ensayo realizado.
 - La inhibición de la OUR de fangos activos es un método que da una respuesta rápida del comportamiento tóxico de los contaminantes persistentes sobre fangos presentes en reactores biológicos de EDARs. Los resultados positivos permiten confirmar la toxicidad del contaminante analizado pero los resultados negativos, requieren el empleo de análisis a medio plazo o de técnicas de mayor sensibilidad. Por lo tanto son especialmente útiles para efluentes de elevada toxicidad (plaguicidas y cianuros).
 - La inhibición de la DBO₅ es un método de medida que requiere mayor tiempo de análisis, pero es conveniente su utilización como método complementario al anterior para determinar el efecto a medio plazo del contaminante o de los intermedios de su degradación, sobre un fango activo.
 - La medida de la inhibición de la luminiscencia, debido a su alta sensibilidad, debería utilizarse como prueba adicional, en los casos en los que el ensayo de la inhibición de la OUR y de la DBO₅ presenten valores muy bajos, con objeto de confirmar la no toxicidad del efluente tratado.
- Los procesos de oxidación avanzada producen un aumento de la biodegradabilidad en los efluentes que contienen una carga orgánica no biodegradable (plaguicidas y ácidos fenólicos). En todos los casos los resultados obtenidos muestran una evolución similar, aunque observamos diferencias cuantitativas importantes en función del tiempo del análisis realizado; todos los métodos de análisis de biodegradabilidad muestran una incertidumbre en los resultados obtenidos mayor que la observada en los ensayos de toxicidad.

- La determinación de la biodegradabilidad utilizando la DBOst es un ensayo rápido para la medida de la materia orgánica fácilmente biodegradable, aunque los valores absolutos obtenidos muestran dispersión en función del lote de fangos empleados. Cuando los resultados dan valores muy bajos (poca biodegradabilidad o poca materia orgánica) es conveniente realizar ensayos a más largo plazo.
- La medida de la DBO₅ requiere tiempos de análisis más largos y es capaz de medir tanto la materia fácilmente biodegradable como aquella con una biodegradabilidad intermedia, aunque sigue presentando una falta de reproducibilidad importante.
- Tanto la medida de la DBOst como la de la DBO₅ están influenciadas por el grado de oxidación de la muestra. La relación DBOst/DQO o DBO₅/DQO permite corregir este efecto y estimar el momento idóneo para el acoplamiento del tratamiento fotocatalítico con un proceso biológico (valores de COT relativamente altos, ausencia de toxicidad según métodos basados en fangos activos y relaciones DBO/DQO elevadas).
- El método de Zanh-Wellens para determinar la biodegradabilidad intrínseca es un ensayo de mayor duración que permite determinar el efecto de contaminantes o intermedios de degradación a más largo plazo. Los resultados obtenidos nos proporcionan información mucho más específica sobre el comportamiento de los efluentes tratados en un reactor biológico, considerando diversos efectos como sinergia de contaminantes, pérdidas de volátiles, aclimatación de fangos. Por tanto resulta muy interesante en el estudio final de viabilidad de un acoplamiento fotocatalítico-biológico.

A la vista de estas conclusiones surgen consideraciones interesantes a tener en cuenta en futuros trabajos de investigación:

- La dispersión de resultados obtenidos en los métodos de análisis basados en el empleo de fangos activos, indica la conveniencia de establecer una correlación entre los resultados obtenidos y las características físico-químicas del fango de modo que se llegue a una normalización de los resultados expresados.

- La posible presencia en los fangos activos de bacterias nitrificantes debería de tenerse en cuenta en todos los ensayos que utilicen este medio, por lo que es interesante añadir un inhibidor de la nitrificación para evitar alteraciones en los resultados.
- Cuando los efluentes analizados presenten compuestos orgánicos volátiles (como por ejemplo aditivos en formulaciones comerciales), sería conveniente dejar un tiempo de evaporación de la muestra previo a la realización de los análisis. De este modo se evita la disminución de COT no debida a la mineralización de la muestra.
- En muestras que contengan derivados nitrogenados (como por ejemplo carbamatos), se debe de tener en cuenta la posible formación de intermedios tóxicos, como metilaminas o aminas aromáticas, que puedan alterar los ensayos de biodegradabilidad y toxicidad, especialmente los que requieran mayor de tiempo de análisis.

Los resultados de esta Tesis abren futuras líneas de investigación para el Grupo de Oxidación Avanzada del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera entre las que destacan:

- El desarrollo de sistemas acoplados de oxidación fotocatalisis solar-tratamiento biológico para depurar diferentes tipos de efluentes tóxicos.
- Utilización de fangos específicos para estudiar la toxicidad y biodegradabilidad de compuestos persistentes mediante las técnicas analíticas empleadas en este trabajo.
- Estudios de posibles interferencias en los tratamientos fotocatalíticos que puedan interferir en medidas de biodegradabilidad y toxicidad, como por ejemplo elevadas conductividades por presencia de sales, tensioactivos, complejantes, etc. que aparecen en efluentes reales.
- Realizar un estudio mecanístico a fin de identificar los intermedios formados en el proceso de degradación de los plaguicidas e intentar relacionarlos con las variaciones de toxicidad/biodegradabilidad de las muestras.

7.- APORTACIONES DE LA TESIS

7.- APORTACIONES DE LA TESIS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo han sido realizados gracias al apoyo de la Universidad Politécnica de Valencia, a la Consellería de Cultura y Educación y Ciencia de la Generalitat Valenciana y al Ministerio de Ciencia y Tecnología, para el desarrollo de proyectos de investigación. Estos resultados han sido presentados en distintos congresos nacionales e internacionales. Así mismo, se han realizado publicaciones en revistas de carácter científico y todo esto se detalla a continuación.

7.1.- PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- *ACTAS DE CONGRESOS INTERNACIONALES*

Autores: R.F.VERCHER ; A.M. AMAT; A. ARQUES; R. VICENTE; A. GARCÍA-RIPOLL	
Título: DETOXIFICATION AND INCREASE IN THE BIODEGRADABILITY OF COMMERCIAL PESTICIDES BY TiO ₂ BASED SOLAR PHOTOCATALYSIS.	
Tipo de participación: POSTER	
Congreso: 17º INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING CHISA 2006	
Publicación: ARTÍCULO (ISBN 80-86059-45-6)	
Lugar de celebración: PRAGUE	Año: 2006

Autores: R. VICENTE; A.M. AMAT; A. ARQUES; L. SANTOS-JUANES; R.F. VERCHER	
Título: DETOXIFICATION OF METAL INDUSTRY EFFLUENTS CONTAINING CYANIDES BY MEANS OF SOLAR PHOTOCATALYSIS.	
Tipo de participación : POSTER	
Congreso: 6º ANQUE INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMISTRY	
Publicación: REVISTA/LIBRO (ISBN 84-690-2349-7)	
Lugar de celebración: SANTA CRUZ DE TENERIFE	Año: 2006

Autores: R. VICENTE; A.M. AMAT; A. ARQUES; A. GARCÍA-RIPOLL ; A. DOMENECH

Título: SOLAR PHOTOCATALYST TO DETOXIFY AQUEOUS SOLUTIONS OF THE COMERCIAL PLAGUICIDA SEVNOL.

Tipo de participación : POSTER

Congreso: 6º ANQUE INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMISTRY

Publicación: REVISTA/LIBRO (ISBN 84-690-2349-7)

Lugar de celebración: SANTA CRUZ DE TENERIFE Año: 2006

Autores: A. GARCÍA-RIPOLL; A.M. AMAT; A. ARQUES; R. VICENTE; A. DOMENECH

Título: TREATMENT OF AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING FOUR COMMERCIAL PESTICIDES BY JEANS OF TiO₂ SOLAR PHOTOCATALYSIS.

Tipo de participación : POSTER

Congreso: 4th EUROPEAN MEETING ON SOLAR CHEMISTRY AND PHOTOCATALYSIS ENVIRONMENTAL APPLICATIONS

Publicación: BOOK OF ABSTRACTS

Lugar de celebración: LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Año: 2006

Autores: A.M. AMAT; A. ARQUES; L. SANTOS-JUANES; R. VICENTE

Título: DETOXIFICATION OF METAL FINISHING EFFLUENTS USING SUNLIGHT.

Tipo de participación : Póster

Congreso: 4th EUROPEAN MEETING ON SOLAR CHEMISTRY AND PHOTOCATALYSIS ENVIRONMENTAL APPLICATIONS

Publicación: BOOK OF ABSTRACTS

Lugar de celebración: LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Año: 2006

Autores: A. ARQUES.; A.M. AMAT; A. GARCÍA-RIPOLL; R. VICENTE; M.F. LÓPEZ

Título: DETOXIFICATION AND/OR INCREASE OF THE BIODEGRADABILITY OF AQUEOUS SOLUTIONS OF PESTICIDES BY MEANS OF SOLAR PHOTOCATALYSIS.

Tipo de participación : PONENCIA

Congreso: ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF ADVANCED OXIDATION PROCESSES

Publicación: BOOK OF ABSTRACTS

Lugar de celebración: CHANIA (CRETA) Año: 2006

Autores: A. M. AMAT; A. ARQUES; A.DOMENECH; R. VICENTE
Título: EFFECT OF DIFFERENT METALS COMMOLY USED AS HOMOGENEOUS CATALYST ON THE OXYGEN CONSUMPTION OF ACTIVE SLUDGES: A RESPIROMETRIC STUDY.
Tipo de participación : POSTER
Congreso: 15º INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING CHISA 2002
Publicación: REVISTA/LIBRO (ISBN 80-86059-3-2)
Lugar de celebración: PRAGUE Año: 2002

- *ACTAS DE CONGRESOS NACIONALES*

Autores: R.VICENTE; A.M. AMAT; A. ARQUES; A. GARCÍA-RIPOLL
Título: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y LA BIODEGRADABILIDAD DE DISOLUCIONES ACUOSAS DEL PLAGUICIDA COMERCIAL LAITON DESPUÉS DE UN TRATAMIENTO DE FOTOCATÁLISIS SOLAR.
Tipo de participación : PONENCIA
Congreso: III CONGRESO "LA INVESTIGACIÓN ANTE LA SOCIEDAD DEL CONOCIMIENTO. SOSTENIBILIDAD Y MEDIOAMBIENTE"
Publicación: LIBRO DE RESÚMENES (ISBN 84-690-2237-7)
Lugar de celebración: ALCOY Año: 2006

Autores: ANA Mª AMAT; A. ARQUES; A.DOMENECH; R. VICENTE
Título: EFECTOS DE DIVERSOS METALES USADOS COMÚNMENTE COMO CATALIZADORES HOMOGÉNEOS EN EL CONSUMO DE OXÍGENO EN FANGOS ACTIVOS: UN ESTUDIO RESPIROMÉTRICO.
Tipo de participación : PONENCIA
Congreso: I JORNADAS "LA INVESTIGACIÓN ANTE LA SOCIEDAD DEL CONOCIMIENTO. SOSTENIBILIDAD Y MEDIO AMBIENTE".
Publicación: LIBRO DE RESÚMENES (ISBN 84-688-9389-7)
Lugar de celebración: ALCOY Año: 2004

7.2.- PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Clave: L = libro completo, CL = capítulo de libro, A = artículo, R = revisión, E = editor

Autores (por orden de firma): A. GARCÍA-RIPOLL; A.M. AMAT; A. ARQUES;
R.VICENTE; M.F. LÓPEZ; I. OLLER; M.I. MALDONADO; W. GERNJAK
Título: INCREASER BIODEGRADABILITY OF ULTRACID™ IN AQUEOUS
SOLUTIONS WITH SOLAR TiO₂ PHOTOCATALYSIS
Editorial: ELSEVIER
Ref. revista: CHEMOSPHERE (EN PRENSA) Clave: A
Volumen: Páginas: Año: 2006

Autores (por orden de firma): A.M. AMAT; A. ARQUES; F. GALINDO; MIGUEL A.
MIRANDA; LUCAS SANTOS-JUANES; R.F. VERCHER; R.VICENTE
Título: ACRIDINE YELLOW AS SOLAR PHOTOCATALYST FOR ENHANCING
BIODEGRADABILITY AND ELIMINATING FERULIC ACID AS MODEL POLLUTANT
Editorial: ELSEVIER
Ref. revista: APPLIED CATALYSIS B ENVIRONMENTAL Clave: A
Volumen: 73 Páginas: 51-57 Año: 2007

Autores (por orden de firma): A. ARQUES; A.M. AMAT; A. GARCÍA-RIPOLL; R.
VICENTE
Título: DETOXIFICATION AND/OR INCREASE OF THE BIODEGRADABILITY OF
AQUEOUS SOLUTIONS OF DIMETHOATE BY MEANS OF SOLAR
PHOTOCATALYSIS
Editorial: ELSEVIER
Ref. revista: JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS (EN
PRENSA) Clave: A
Volumen: Páginas: Año: 2006

Autores (por orden de firma): A. GARCÍA-RIPOLL; A. ARQUES; A.M. AMAT;
R.VICENTE; A. DOMENECH

Título: TREATMENT OF AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING PESTICIDES BY
MEANS OF TiO₂ SOLAR PHOTOCATALYSIS.

Editorial: ASME JOURNALS

Ref. revista: JOURNAL OF SOLAR ENERGY ENGINEERING
(ENVIADA)

Clave: A

Volumen:

Páginas:

Año: 2006

8.- BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA

- 1^{er} Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. *Water for People, Water for Life*. 2003. <http://www.unesco.org/water>
- 2^o Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. *Water: A Shared Responsibility*. 2006. <http://www.unesco.org/water>
- Abbondanzi, F.; Cachada, A.; Campisi, T; Guerra, R.; Raccagni, M.; lacondini, A. 2003. *Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox® assay*. Chemosphere 53, 889-897.
- Adham, S; DeCarolis, J.; Grounds, J.; Waseserman, L.; Pearce, B. 2005. *BRM Performance. Pilot-scale test show bioreactor can treat wastewater or advanced primary system effluent*. Water Environ. Technol. 74, 33-39
- Acher, A.; Fischer, E.; Zellingher, R.; Manor, Y. 1990. *Photochemical Disinfection of Effluents-Pilot Plant Studies*. Water Res. 24(7), 837-843.
- Adewuyi, Y.G. 2001. *Sonochemistry: environmental science and engineering applications*. Ind. Chem. Res. 41, 5958-5965.
- Albert, L.A. 1998. *Los plaguicidas persistentes y sus efectos a largo plazo*. II Simposio Internacional sobre agricultura sostenible. México D.F.
- Al-Ekabi, H.; Serpone, N. 1988. *Kinetic studies in heterogeneous photocatalysis. 1. Photocatalytic degradation of chlorinated & hellip*. J. Phys. Chem. 92, 5726-5731.
- Alvaro, M.; Carbonell, E.; García, H. 2004a. *Photocatalytic degradation of sulphur-containing aromatic compounds in the presence of zeolite-bound 2,4,6-triphenylpyrylium and 2,4,6-triphenylthiapyrylium*. Appl. Catal. B. 51, 195-202.

- Alvaro, M.; Carbonell, E.; Fornes, V.; Garcia, H. 2004b. *Novel photocatalysts containing 2,4,6-triphenylthiapyrylium encapsulated within zeolites. Enhanced photocatalytic activity as compared to the pyrylium analogues.* New J. Chem. 28, 631-639.
- Alvaro, M.; Carbonell, E.; García, H.; Lamaza, C.; Pillai, M.N. 2004c. *Ship-in-a-bottle síntesis of 2,4,6- triphenylthiapyrylium cations encapsulated in zeolites Y and beta: a novel robust photocatalyst.* Photochem. Photobiol. 3, 189-193.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed.* Wiley. New York, EEUU. pp. 147.
- Amat, A.M., Arques, A., Miranda, M. 1999. *p-Coumaric acid photodegradation with solar light, using a 2,4,6-triphenylpyrylium salt as photosensitizer. A comparison with other oxidation methods.* Appl. Catal. B, 23, 205-214.
- Amat, A.M.; Arques, A.; Seguí, S.; Vercher, R.F., 2002. *Pyrylium salts as solar photocatalysts for wastewater treatment.* Res. Adv. In Water Res.3, 55-63.
- Amat, A.M.; Arques, A.; Bossmann, S.H.; Braun, A. M.; Gob, S.; Miranda, M.A.2003a. *A "Camel through the eye of a needle": Direct introduction of the TPP⁺ ion inside Y-zeolites by formal ion exchange in aqueous medium.* Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 42, 1653-1655.
- Amat, A.M.; Arques, A.; Beneyto, H.; García, A.; Miranda, M.A.; Seguí, S. 2003b. *Ozonisation coupled with biological degradation for treatment of phenolic pollutants: a mechanistically based study.* Chemosphere 53, 79-86.

- Amat, A.M.; Arques A.; Bossmann S. H.; Braun A. M.; Göbb S.; Miranda M.A. 2004. *Oxidative degradation of 2,4-xylidine by photosensitization with 2,4,6-triphenylpyrylium: homogeneous and heterogeneous catalysis*. Chemosphere. 57, 1123-1130.
- Amat, A.M.; Arques A.; Bossmann S. H.; Braun A.M.; Miranda M.A.; Vercher R.F. 2005a. *Synthesis, loading control and preliminary test of 2,4,6-triphenylpyrylium supported onto Y-zeolite as solar photocatalyst*. Catal. Today 101, 383-388.
- Amat, A.M.; Arques A.; Miranda, M.A.; Lopez, F. 2005b. *Use of ozone and/or UV in the treatment of effluents from board paper industry*. Chemosphere 60, 1111-1117.
- Amat, A.M.; Arques A.; Galindo, F.; Miranda, M.A.; Santos-Juanes, L.; Vercher, R.F.; Vicente, R. 2007. *Acridine yellow as solar photocatalyst for enhancing biodegradability and eliminating ferulic acid as model pollutant*. Appl. Cata. B: Environ. 73, 51-57.
- Anderson, R.T.; Lovley, R.D. 2000. *Hexadecane decay by methanogenesis*. Nature 404, 722-723.
- Archibald, F.; Méthot, M.; Young, F.; Paice, M.G. 2001. *A simple system to rapidly monitor activated sludge health and performance*. Water Res. 35, 2543– 53.
- Argese, E.; Bettiol, C.; Miana, P.; Luzzolino, L.; Giurin, G.; Aquat. J. 1998. *Comparison of in vitro submitochondrial particle and microtox® assays for determining the toxicity of organotin compounds*. Environ. Toxicol. Chem. 17, 1005-1012.
- Arques. A. 2001. *Métodos de oxidación avanzada para el tratamiento de las aguas residuales de la industria aceitunera*. Tesis Doctoral.

- Arques, A.; García-Ripoll, A.; Sanchís, R.; Santos-juanes, L.; Amat, A.M.; López, M.F.; Miranda, M.A. 2007. *Detoxification of aqueous solutions containing the comercial pesticide Metasystox by TiO₂ mediated solar photocatalysis*. J. Solar Energy Engineering 129, 74-79.
- Arslan-Alaton, I.; Gurses, F. 2004. *Photo-Fenton and photo-Fenton-like oxidation of Procaine Penicillin G formulation effluent*. J. Photochem. Photobiol. A .165, 165-175.
- Augugliano, V.; Blanco Gálvez, J.; Cáceres Vázquez, J.; García López, E.; Loddo, V.; López Muñoz, J.; Malato, S.; Marci, G.; Palmesano, L.; Schiarello, M.; Soria Ruiz, J. 1999. *Photocatalytic oxidation of cyanide in aqueous TiO₂ suspensions irradiated by sunlight in mild and strong oxidant conditions*. Catal. Today 54, 245-253.
- Augusti, Rodinei; Dias, Adelson O.; Rocha, Lilian L.; Lago, Rochel M. 1998, *Kinetics and Mechanism of Benzene Derivative Degradation with Fenton's Reagent in Aqueous Medium Studied by MIMS*. J. Phys. Chem. A 102, 10723-10727.
- Babich, H.; Borenfreund, E. 1991. *Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review*. Toxicol. in Vitro 5, 91-100.
- Bacsa, R.R.; Kiwi, J. 1998. *Effect of rutile phase on the photocatalytic properties of nanocrystalline titania during the degradation of p-coumaric acid*. Appl. Catal. B: Environ. 16, 19-29.
- Baird, C. 1999. *Enviromental Chemistry*. W.H. Freeman and Company New York.
- Bandala, E.R.; Octaviano, J,A.; Albiter, V.; Torres, L.G. 1998. *Designing and applying treatment technologies : remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. US.Battelle Press. Columbus Ohio, USA. Wickramanayake, G.B. and Hincee (Eds.) 177-182.

- Battersby, N.S.; Ciccognani, D.; Evans, M.R.; King, D.; Painter, H.A.; Peterson, D.R.; Starkey, M., 1999. *An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test*. Chemosphere 38, 3219-3235.
- Baumstark-Khan, C.; Hellweg, C.E.; Scherer, K.; Horneck, G. 1999. *Microscale application of the SOS-LUX-TEST as biosensor for genotoxic agents*. Anal. Chim. Acta 387, 281-296.
- Beccari, M.; Carucci, G.; Majone, M.; Torrisi, L. 1999. *Role of lipids and phenolic compounds in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents*. Environ. Technol. 20, 105-110.
- Biesinger, K.E.; Williams, W.H.; Van der Schailie, J. 1987. *Procedures for conducting Daphnia magna toxicity bioassays*. EPA/600-8-87/011.
- Bigda, R.J. 1995. *Considerer Fenton chemistry for wastewater treatment*. Chem. Eng. Prog. 91, 63-66.
- Blake, D.M. 2001. *Bibliography of work on the heterogeneous photocatalytic removal oh hazardous compounds from water and air*. National Renewable Energy Laboratory .Technical Report NREL/TP.
- Blanco, J.; Malato, S.; Fernández, P.; Vidal, A.; Morales, A.; Trincado, P.; Oliveira, J.C.; Minero, C.; Musci, C.; Casalle, C.; Brunotte, S.; Tratzky, S.; Dischinger, N.; Funken, K.H.; Sattler, C.; Vincent, M.; Collares-Pereira, J.F.; Mendez, J.F.; Rangel C.M. 1999. *Compound parabolic concentrator technology development to commercial solar detoxification applications*. Sol. Energy 67, 317-330.
- Blanco-Galvez, J.; Fernández, P.; Malato, R. 2007. *Solar photocatalytic detoxification and disinfection of water: recent overview*. Journal of Solar Energy Engineering. 129:4-15.
- Blesa, M.A., 2004. *Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea*. Editorial CIEMAT.

- Bolton, J.R.; Cater, S.R. 1994. *Aquatic and Surface Photochemistry*. Lewis Publishers 467-490.
- Boluda, R., Quintanilla, J.F., Bonilla, J.A., Sáez, E., Gamón, M. 2002. *Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain)*. Chemosphere 46, 355-369.
- Bossmann, S.H., Oliveros, E., Göb, S., Siegwart, S., Dhalen, E.P., Payawam, Jr., 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.
- Bozzi, A.; Guasaquillo, I.; Kiwi, J. 2004. *Accelerated removal of cyanides from industrial effluents by supported TiO₂ photo-catalysis*. Appl. Catal. B Environ. 51, 203-211.
- Bozzi, A., Yuranova, T., Lais, P., Kiwi, J. 2005. *Degradation of industrial waste waters on Fe/C-fabrics. Optimization of the solution parameters during reactor operation*. Water Research, 39, 1141-1450.
- Braun, A. M.; Pintori, I. G.; Popp, H.-P.; Wakahata, Y.; Woerner, M. 2004 *Technical development of UV-C- and VUV-photochemically induced oxidative degradation processes*. Water Sci. Technol. 49, 235-240.
- Bremmer, D.H.; Burgess, A.E.; Houlemare, D.; Mankung, K.C. 2006. *Phenol degradation using hydroxyl radicals generated from zero-valent iron and hydrogen peroxide*. Appl. Catal. B. 63, 15-19.
- Caldwell, M.E., Garrett, R.M., Prince, R.C., Suflita, J.M., 1998. *Anaerobic biodegradation of long chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions*. Environ. Sci. Technol., 32, pp. 2191-2195.

- Callahan, M.A., Slimak, M., Gbel, N. Report EPA-44014-79-029^a, b, 1998, NTIS
- Carey, J.H.; Lawrence J.; Tosine H.M. 1976. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 697-701.
- Chatterjee, D.; Dasgupta, S. 2005. *Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants*. J. Photochem. Photobio. C: Photochem. Review. 6, 186-205.
- Chen, R., Piagnatello, J. J., 1997. *Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds*. Environmental Science and Technology. 31, 2399-2406.
- Chiti, G. , Marrazza, G., Mascini, M., 2001. *Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring*. Anal. Chim. Acta 427.155-164.
- Cicek, N 2003. *A review of membrana bioreactors and their potencial application in the treatment of agricultural wastewater*. Canadian Biosystems Engineering. 45, 639-646.
- Ciesla, P.; Kocot, P.; Mytych, P.; Stasicka, Z. 2004, *Homogeneous photocatalysis by transition metal complexes in the environment*. J. Molec. Catal. A 224, 17-33.
- Colleran, E., Pender, S., 2002. *Anaerobic biodegradability, methanogenic activity and toxicity test systems: defining the test conditions*. En Ligthart J, Nieman H (Eds.) Proceedings of the Workshop on Harmonisation of Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition Assays. Lago d'Orta, Italy. 1-10.
- Convenio de Basilea, 1989. Control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación. 22 de marzo de 1989.

- Convenio de Estocolmo, 2001. Convenio sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP). 23 de mayo de 2001.
- Contreras, S.; Rodríguez, M.; Al Momani, F.; Sans, C.; Espulgas, S. 2003. *Contribution of the ozonation pre-treatment to the biodegradation of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol*. *Water Res.* 37, 3164-3171.
- Crespi, M 1994. Tecnología disponible para disminuir la contaminación de efluentes textiles. *Revista de Química Textil.* 117, 36-44
- Dabrowski, B.; Zaleska, A.; Janczarek, M.; Hupka, J.; Millar, J.D. 2002. *Photo-oxidation of dissolved cyanide using TiO₂ catalyst*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 11, 201-205.
- Dalzell, D.J.B., Christof, N., 2002. *An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sludge process*. *Water Res.*, 36, 1493– 502.
- De Laat, J., Truong Le G., Legube, B. 2004. *A comparative study of the effects of chloride sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H₂O₂ and organic compounds by Fe(II)/ H₂O₂ and Fe(III)/ H₂O₂* . *Chemosphere* 55, 715-723.
- Deng, B.; Burris, D.R.; Campbell, T.J. 1999. *Reduction of vinyl chloride in metallic iron*. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2651-2656.
- Deng, N.; Luo, F.; Wu, F.; Xiao, M; Wu, X. 2000. *Discoloration of aqueous reactive dye solutions in the UV/Fe system*. *Water Res.* 34, 2408-2411.
- Dionysiou, D.D., Khodadoust, A., Kern, A.M., Suidan, M.T., Baudin, I., Laïne, J.M. 2000. *Continuous-mode photocatalytic degradation of chlorinated phenols and pesticide in water using a bench-scale TiO₂ rotating disk reactor*. *Appl. Catal. B.* 24, 139-155.

- Directiva 1999/31/CE, 1999. Relativa al vertido de residuos, de 26 de abril de 1999.
- Directiva 2000/60/CE, 2000. Directiva marco sobre el agua, 23 de octubre de 2000. Anexo COP, Decisión 2455/2001/CE de 20 de noviembre de 2001.
- Directiva 2004/35/CE, 2004. Directiva sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales, de 21 de abril de 2004.
- Drzewiez, P.; Nalecz-Jawecki, G.; Gryz, M.; Sawicki, J.; Bojanowska-Czaika, A.; Gluszewski, W.; Kulisa, K.; Wolkewicz, S.; Trojanowicz, M. 2004. *Monitoring of toxicity during degradation of selected pesticides using ionizing radiation*. Chemosphere 57, 135-145.
- EPA-600/9-78-018. 1978. The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. Experimental design, application and data interpretation protocol.
- EPA-600/3-82-034, 1982. Biological aspects of pollutants effects on marine organisms. pp. 112-122.
- EPA-600/4-90/027F, 1993. EPA-Methods. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms environmental monitoring and support laboratory.
- Esplugas, S., Ollas, D.F., 1997. *Economic aspects of integrated (chemical+biological) processes for water treatment*. Journal Advanced Oxidation Technology. 1, 197-202.
- Esplugas, S., Gimenez, J., Contreras, S., Pascual, E., Rodriguez, M. 2002. *Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation*. Water Res. 36, 1034-1042.
- Evans. M.R., Jordinson, G. M., Rawson, D.M., Rogerson, J.G., 1998. *Biosensors for the measurement of toxicity of wastewaters to activated sludge*. Pestic. Sci. 54, 447-452.

- Evgenidou, E., Fytianos, K., Poulios, I., 2005. *Photocatalytic oxidation of dimethoate in aqueous solutions*. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 175, 29-38
- Fallamann, H., Krutzler, T., Bauer, R., Malato, S. Blanco, J., 1999. *Detoxification of pesticide containing effluents by solar driven Fenton process*. Physical Chem. 213, 67-74.
- Farré, M., Barceló, D., 2003. *Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis*. Trend in Analytical Chemistry, 22, 299-310
- Feng, W., Nansheng, D. 2000. *Photochemistry of hydrolytic iron(III) species and photoinduced degradation of organic compounds*. Chemosphere, 41, 1137-1147.
- Ferrari, B., Radetski, C.M., Veber, A.-M., Ferard, J.-F., 1999. *Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid-and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1195-1202.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Borja Padilla, R., 1992. *Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain*. Grasas y aceites 43, 101-106.
- Fitzgerald, K.S. 2005. Wastewater Treatment Plant Technology Review. TSG Making Every Drop Count.
- Flox, C.; Ammar, S.; Arias, C.; Brillas, E.; Vargas-Zavala, A.V.; Abdelhedi, R. 2006. *Electro-Fenton and photoelectro-Fenton degradation of indigo carmine in acidic aqueous medium*. Appl. Catal. B. 67, 93-104.

- Freitas dos Santos, L.F., Defrenne, L., Kreb-Brown, A.. 2002. *Comparison of threemicrobial assay procedures for measuring toxicity of chemical compounds:ToxAlertR 10, CellSense and Biolog MT2 microplates*. Anal. Chim. Acta, 456, 41– 54.
- Fung, P.C.; Huang, Q.; Tsui, S.M.; Poon, C.S. 1999. *Treatability study of organic and color removal in desizing/dyeing wastewater by UV/US system combined with hydrogen peroxide*. Wat. Sci. Technol. 40,153-161.
- García-Ripoll, A.; Amat, A.M.; Arques, A.; Vicente, R.; López, M.F.; Oller, I.; Maldonado, M.I.; Gernjak, W., 2007. *Increased biodegradability of Ultracid™ in aqueous solutions with solar TiO₂ photocatalysis*. Chemosphere (en prensa).
- García García, P., Garrido Fernández, A., Chakman, A., Lemonier J.P., Overend, R.P., Chornet, E., 1989. *Purificación de aguas residuales ricas en polifenoles: aplicación de la oxidación húmeda a los efluentes acuosos derivados de las industrias olivaderas*. Grasas y aceites, 40, 291-295.
- Gernaey, A.K., Petersen, B., Ottoy, J.P., Vanrolleghem, P. 2001. *Activated sludge monitoring with combined respirometric – titrimetric measurements*. Water Res, 35, 1280– 94.
- Gernjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Cáceres J., Bauer, R. Fernández-Alba A.R. 2003. *Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants*. Chemosphere, 50, 71-78.
- Glaze, W.H.; Kang, J-W.; Chapin, D.H. 1987. *Chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation*. Ozone Sci. Eng. 9, 335-352
- Göb, S., Oliveros, E., Bossmann, S.H., Braun, A.M., Nascimento, C.A.O., Guardani, R. 2001. *Optimal experimental design and artificial neural networks applied to the photochemically enhanced Fenton reaction*. Water Science Technology 44, 339-345.

- Gogate P.R., Pandit, A.B. 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.B. 2004b. *A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods*. Adv. Environ. Res. 8, 553-597.
- Goi, A., Trapido, M., Tuhkanen, T. 2004. *A study of toxicity, biodegradability, and some by-products of ozonised nitrophenols*. Advances in Environmental Research 8, 303-311
- González, M.C.; Braun A.M. 1994. *Vacuum-ultraviolet (VUV) photolysis of water: mineralización of atrazine*. Chemosphere. 28, 2121-2127.
- González M.C.; Braun A.M.1995. *VUV photolysis of aqueous solutions of nitrate and nitrite*. Res. Chem. Intermed. 21, 837-859.
- Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. 1994. *Chemistry of the elements*. Pergamon Press, Cambridge
- Gu, M.B.; Gil, G.C., 2001. *A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity*. Biosens Bioelectron 16, 661, 669.
- 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.
- Haag, W.R., Yao, C.D., 1992. *Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with several drinking water contaminants*. Environmental Science Technology 26, 1005-1013.
- Hamdi, M., García, J.L., Ellouz, R., 1992. *Integrated biological process for olive mill wastewater treatment*. Bioprocess Engineering, 8, 79-84.

- Hayo, M.G. 1996. *Assessing the impact of pesticides on the environment*. Agric. Ecosys Environ. 60, 81-96.
- Hee-Sung, B., Young-Gyun, C., Sang-Eun, O., In-Soo, K., James, M.L., Sung-Taik, L., 2002. *Anaerobic degradation of pyrrolidine and piperidine coupled with nitrate reduction*. Chemosphere 48, 329-334.
- Hernando, M.D., Ferrer, I., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2005. *Evaluation of pesticides in wastewaters*. Acombined (Chemical and biological) analytical approach.
- Herrera, F., Pulgarin, C., Nadtochenko, V., Kiwi, J. 1998. *Accelerated photo-oxidation of concentrated p-coumaric acid in homogeneous solution. Mechanistic studies, intermediates and precursors formed in the dark*. Applied Catalysis Environmental. 17, 141-156.
- Hincapié, M., Maldonado, M.I., Oller, I., Gernjak, W., Sanchez-Pérez J.A., Ballesteros, M.M. Malato, S., 2005. *Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances*. Catalysis Today 101, 203-210.
- Hoffmann, M.R.; Martin, S.C.; Choi, W.; Bahnemann, D.W. 1995. *Environmental applications of semiconductor photocatalysis*. Chem Rev. 95, 69-96.
- Huston, P.L., Pignatello, J.J., 1999. *Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction*. Water Research 33,1238-1246.
- Ikehata, K.; El-Din, M.G. 2005. *Aqueous pesticide degradation by ozonation and ozone-based advanced processes: a review (Part 1)*. Ozone Sci. Eng. 27, 83-114.
- Instituto Mediterráneo por el Desarrollo Sostenible (Imedes), 2000. Estudio sobre las tendencias del empleo y las necesidades formativas en medio ambiente en los sectores cerámico, agroalimentario, madera y mueble y metal mecánico.

<http://www.ecoempleo.com/Estudios/SectoresIndustriales/capitulo4.pdf>

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 2000, Encuesta Industrial Mensual, México D.F.
- ISO 10229, 1994. ISO water quality: Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish – Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum).
- ISO 10253, 1995. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.
- ISO 10712, 1995. Water Quality: *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test).
- ISO 6341, 1996. Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test.
- ISO 11348-1, 2 y 3, 1998 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).
- ISO 14001, 1996. Environmental Management Standard
- ISO 15522, 1999. Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms.
- Persoone, G.; Jansen, C.R. 1994. *Field validation of predictions based on laboratory toxicity tests*. Lewis Publisher (USA) 379-397.
- Jakob, L., Oliveros, E., Legrini, O., Braun, A.M., 1993. *TiO₂ photocatalytic treatment of water. Reaction design and optimization experiments*. In: Ollis, D.F. and Al-Ekabi, H. (eds.). *Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 511-532.

- Kaiser, K.L.E., 1998a. *Correlations of Vibrio fischeri bacteria test data with bioassay data for other organisms*. Environ. Health Perspect. 106, 583-591.
- Kaiser, K.L.E., 1998b. *Review of biodegradability tests for the purpose of developing regulations*. Water Qual. Res. J. Canada 33, 85-211.
- Kavitha, V., Palanivelu, K. 2004. *The role of ferrous iron in Fenton and photoFenton processes for the degradation of fenol*. Chemosphere 55, 1235-1243.
- Kelly, C.J., Lajoie, C.A., Layton, A.C., Saylor, G.S., 1999. *Bioluminescent reporter bacterium for toxicity monitoring in biological wastewater treatment systems*. Water Environ Res. 71, 31– 5.
- Kim. S.M.; Vogelpohl, A.1998. *Degradation of organic pollutants by the Photo-Fenton Process*. Chem. Eng. Technol. 21, 187-191.
- Kim, T.S.; Kim, J.K.; Choi, K.; Stenstrom, M.K.; Zoh, K.D. 2006. *Degradation mechanism and the toxicity assessment in TiO₂ photocatalysis and photolysis of parathion*. Chemosphere 62, 926-933.
- Kiwi, J., López, A., Nadtochenko, V. 2004. *Mechanism and kinetics of the OH-radical intervention during Fenton oxidation in the presence of a significant amount of radical scavenger (Cl⁻)*. Environmental Science Technology. 34, 2162-2168.
- Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A. 2002. *TiO₂ assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations. A review*. Appl. Catal. B: Environ. 49, 1-14.
- 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.

- Lajoie, C.A., Lin, S.C., Kelly, C.J., 2003. *Comparison of bacterial bioluminescence with activated sludge oxygen uptake rates during zinc toxic shock loads in a wastewater treatment system*. Journal Environmental Engineering, 129, 879–83.
- Langlais, B.; Reckhow, D.A.; Brink, D.R. 1991. *Ozone in water treatment: application and engineering*. Lewis Publishers.
- Lappalainen, J., Juvonen, R., Nurmi, J., Karp, M., 2001. *Automated color correction method for Vibrio fischeri toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays*. Chemosphere, 45, 635–41.
- Legrini, O., Oliveros, E., Braun, A.M., 1993. *Photochemical processes for water treatment*. Chem. Rev. 93, 671-698.
- Lewis, M.A. 1991. *Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment*. Water Res. 25, 101-113.
- Liao, J.D., Wang, S-H., Hsu, D-J., 2001. *Studies on the early detection of wastewater's toxicity using a microbial sensing system*. Sens Actuators, B, Chem., 72, 167– 73.
- Lipczynska-Kochany, E., 1991. *Novel method for a photoanalytic degradation of 4-Nitrophenol in homogeneous aqueous solution*. Environmental Technology 12, 87-92.
- Lipczynska-Kochany, E., 1992. *Degradation of nitrobenzene and nitrophenols by means of AOP's in homogeneous phase: photolysis in the presence of hydrogenperoxide versus the Fenton reaction*. Chemosphere 24, 1369-1380.
- Lizama, C.; Freer, J.; Baeza, J.; Mansilla, H.D. 2002. *Optimized photodegradation of Reactive Blue 19 on TiO₂ and ZnO suspensions*. Catal. Today 76, 235-246.

- López Cisneros, R., Gutarra Espinoza, A., Litter M.I..2002. *Chemosphere*. 48, pp.393-399.
- Maciel, R., Sant'Anna, G. L., Dezotti, M. 2004. *Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photoFenton reactions*. *Chemosphere*. 57, 711-719.
- Maestro Durán, R., Borja Padilla, R., Martín Martín, A., Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Alba Mendoza, J., 1991. *Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín*. *Grasas y aceites*, 42, 271-276.
- Malato, S.; Blanco, J.; Richter, C.; Milow, B.; Maldonado, M.I. 1999. *Pre-industrial experience in solar photocatalytic mineralization of real wastewater. Application to pesticide containers recycling*. *Water Sci. Technol.* 40,123-130.
- Malato, S.; Maldonado, M.I.; Blanco, J.; Fernández-Ibañez, P.; Campos, A. 2000. *Optimising Solar Photocatalytic Mineralization of pesticides by Adding Inorganic Oxidising Species: Application to the recycling of pesticides containers*. *Appl. Catal., B*. 28, 163-174.
- Malato, S., Blanco, J., Vidal, A., Alarcón, D., Maldonado, M.I., Cáceres, J., Gernjak, W., 2003. *Applied studies in solar photocatalytic detoxification: and overview*. *Solar Energy*, 75, 329-336.
- Mansilla, H.; Yeber, M.; Freer, J.; Rodríguez, J.; Baeza, J.; 1997. *Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry*. *Water Sci. Technol.* 35, 273-278.
- Mantzavinos, D.; Psillakis, E. 2004. *Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment*. *Review.J. Chem Technol Biotechnol.* 79:431-454.
- Masschelein, M.J. 1991. *L'ozonation des eaux*. Ed. Tec. Et Doc. Paris.

- Mariscal, A., Peinado, M^a.T., Carnero-Varo, M., Fernandez-Crehuet, J. 2003. *Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with Vibrio fischeri*. Chemosphere, 50, 349-354.
- Marques, P.A.S.S.; Rosa, M.F.; Mendes, F.; Collares Pereira, M., Blanco, J.; Malato, S. 1996. *Wastewater detoxification of organic and inorganic toxic compounds with solar collectors*. Desalination 108, 213-220.
- Martínez, F., Calleja, G., Meleró, J.A., Molina, R., 2005. *Heterogeneous photoFenton degradation of phenolic aqueous solution over iron-containing SBA-15 catalyst*. Applied Catalysis B: Environmental, 60, 185-194.
- Martínez Nieto, L., Ramos Cormenzana, A., García Pareja, M.P., Garrido Hoyos, S.E., 1992. *Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con Aspergillus terreus*. Grasas y aceites, 43, 75-81.
- Metcalf & eddy, Inc 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. McGraw-Hill. New York.
- Miller, J.S. 2005. *Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated light*. Water Research. 39, 412-422.
- Milow, B.; Blanco, J.; Fernandez, P.; Malato, S.; Richter, C.; Funken, K.-H.; Sattler, C. 1999. *Photocatalytic detoxification of contaminated water*. Global Symposium on Recycling, Waste Treatment and Clean Technology, Proceedings. 3, 1989-1998.
- Miranda, M.A., García, H. 1994. *2-4-6 triphenylpyrylium tetrafluorborate as an electron transfer photosensitizer*. Chemical. Review. 94, 1063-1089.
- Miranda, M.A., Galindo, F., Amat, A.M., Arques, A. 2000. *Pyrylium salt-photosensitized degradation of phenolic contaminants derived from cinnamic acid with solar light. Correlation of the observed reactivities with fluorescence quenching*. Applied. Catalysis, B. 28, 127-133.

- Miranda, M.A., Galindo, F., Amat, A.M., Arques, A. 2001. *Pyrylium salt-photosensitized degradation of phenolic contaminants present in olive oil wastewaters with solar light*. Applied. Catalysis. B. 30, 437-444.
- Miranda, M.A.; Amat, A.M.; Arques, A.; Seguí, S. 2004. *Photo-Fenton reaction for the abatement of commercial surfactants in a solar pilot plant*. Solar Energy 44, 559-566.
- Morrison, S.R. 1997. *Electrochemistry at semiconductor and oxidized metal electrodes*. Editorial Plenum Press. New York.
- Mrafkova, L., Goi, D., Gallo, V., Colussi, I., 2003. *Preliminary evaluation of inhibitory effects of some substances on aerobic and anaerobic treatment plant biomasses*. Chem Biochem Eng Q 17,243–247.
- Nogueira, R.F.P.; Trovó A. G., Mode, D. F. 2002. *Solar photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4- dichlorophenol using and enhanced photoFenton process*. Chemosphere 48,385-391.
- Nomura, Y., Ikebukuro, K., Yokoyama, K., Takeuchi, T. Arikawa, Y., Ohno, S., Karube, I.1994. Anal. Lett, 27. 3095.
- Nyholm, N., 1991. *The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1237-1246.
- OCDE 1981. Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia
- OCDE 1992. Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia
- OCDE 209. Activated sludge, respiration inhibition test. Guideline for Testing of Chemicals, 209. 1984. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.

- OCDE 301A. Ready biodegradability: DOC Die-Away test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 301B. Ready biodegradability: CO₂ Evolution test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 301C. Ready biodegradability: Modified MITI test (I). 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 301D. Ready biodegradability: Close bottle test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 301E. Ready biodegradability: Modified OECD screening test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 301F. Ready biodegradability: Manometric respirometry test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 302A. Inherent biodegradability: Modified SCAS test. 1981. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 302B. Inherent biodegradability: Zahn-Wellens/EMPA test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 302C. Inherent biodegradability: Modified MITI test (II). 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 302D. Inherent biodegradability: CONCAWE test. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 303A. Simulation test-aerobic sewage treatment: activated sludge units. 2001. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.

- OCDE 303B. Simulation test-aerobic sewage treatment: biofilms. 2001. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 304A. Inherent biodegradability in soli. 1981. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 306. Biodegradability in seawater. 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 307. Aerobic and anaerobic transformation in soil. 2002. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 308. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems. 2002. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 309. Aerobic mineralisation in surface water-simulation biodegradation test. 2004. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 310. Ready biodegradability: CO₂ in sealed vessels (headspace test). 2006. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- OCDE 311. Anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge: method by measurement of gas production. 2006. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- Oller, I.; Gernjak, W.; Maldonado, M.I.; Fernández-Ibáñez, P.; Blanco, J.; Sánchez-Pérez, J.A.; Malato, S., 2005. *Solar photocatalytic of dimethoate by solar photocatalysis at pilot plant scale*. Environmental Chemistry Letters 3,118-121.
- Ormad, P., Cortés, S., Puig, A. y Ovelleiro, J.L., 1997. Water Research, 31, 2387-2391.

- Ottenbrite, R.M., Albertsson, A.C., 1992. *Discussion on degradation terminology*. En Vert M, Feijen J, Albertsson A, Scott G, Chiellini E (Eds.) *Biodegradable Polymers and Plastics*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, RU. 73-92.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 1998, *Investigación en Salud y Ambiente XXXIII Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud de la Organización Panamericana de la Salud*. OPS/CASI/98.05, Caracas, Venezuela.
- Painter, H.A., 1995. *Detailed review paper on biodegradability testing*. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
- Painter, H.A., Reynolds, P., Comber, S., 2003. *Application of the headspace CO₂ method to the assessment of the ultimate biodegradability of surfactants: results of a calibration exercise*. *Chemosphere* 50, 29-38.
- Palmqvist, E., Kriz, C.B., Khayyami, M., Danielsson, B., Larsson, P.O., Mosbach, K., Kriz, D., 1994. *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*. *Biosens. Bioelectron.* 9, 551-559.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. 2006. *A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals*. *Environmental International* 32, 265-268.
- Paterlini, W.C., Nogueira, R.F.P. 2005. *Multivariate analysis of photoFenton degradation of the herbicides tebuthiuron, diuron and 2,4-D*. *Chemosphere*. 58, 1107-1116.
- Palmqvist, E., Kriz, C.B., Khayyami, M., Danielsson, B., Larsson, P.O., Mosbach, K., Kriz, D., 1994. *Biosens. Bioelectron.*, 9. pp. 551.
- Pera-Titus, M.; García-Molina, V.; Baños Migue, I A.; Jiménez, J.; Esplugas S. 2004. *Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review*. *Appl. Catal., B* . 47, 219-256.

- Pérez, M.; Torrades, F.; García-Hortal, J.A.; Doménech, X.; Peral, J. 2002. *Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents under Fenton and photo-Fenton conditions*. Appl. Catal. B Environ. 36, 63-74.
- Pérez-Estrada, L., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernández-Alba A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S., 2005. *Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot-plant scale*. Catalysis Today, 101, 219-226.
- Perneti, M., Di Palma, L., Merli, C., 2003. *A real time toxicity bioassay for activated sludge reactor*. Int J Chem React Eng 1(A17), 1– 11.
- Pignatello, J. J., 1992. *Dark and photo-assisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide*. Environ. Sci. Technol. 944-951.
- Pignatello J.J.; Liu, D.; Huston, P. 1999. *Evidence for additional oxidant in the photoassisted fenton reaction*. Environ. Sci. Technol. 33, 1832-1839.
- Pignatello J.J.; Oliveros, E.; MacKay, A. 2006. *Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry*. Environ. Sci. Technol. 36, 1-84.
- Pizarro, P.; Guillard, C.; Perol, N.; Herrmann, J.M. 2005. *Photocatalytic degradation of imazapyr in water: comparison of activities of different supported and unsupported TiO₂-based catalysts*. Catal. Today 101, 211-218.
- Polak, M.E., Rawson, D.M., Haggett, B.G.D. 1996. *Redox mediated biosensors incorporating cultured fish cells for toxicity assessment*. Biosens. Bioelectron. 11, 1253-1257
- Pramauro, E.; Bianco Prevot, A.; Vincenti, M.; Brizzolesi, G. 1997. *Photocatalytic degradation of carbaryl in aqueous solutions containing TiO₂ suspensions*. Environ. Sci. Technol. 31, 3126:3131.

- Pulgarin, C.; Invernizzi, M.; Parra, S.; Sarriá, V.; Polania, R.; Péringer, P. 1999. *Strategy for the coupling of photochemical and biological flow reactors useful in mineralization of biorecalcitrant industrial pollutants*. *Catalysis Today*. 54, 341-352.
- Ren, S., Frymier, P.D., 2003a. *The use of a genetically engineered Pseudomonas species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent*. *Water Environ. Res.* 75. 21–9.
- Ren, S., Frymier, P.D., 2003b. *Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium*. *J. Environ. Eng.*, 129, 328 – 35.
- Reemtsma, T.; Jakobs, J. 2001. *Concerted chemical and microbial degradation of sulfophthalamides formed from sulfophthalocyanine dyes by white-rot fungi*. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4655-4659.
- Reuschenbach, P., Pagga, U., Strotmann, U., 2003. *A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related methods*. *Water Res.* 37, 1571-1582
- Ricco, G., Tomei, M.C., Ramadori, R., Laera, G. 2004. *Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox®*. *Water Res.* 38, 2103-2110.
- Richterich, K., Steber, J., 2001. *The time-window - an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants*. *Chemosphere* 44, 1649-1654.
- Riedel, K., Kunze, G., König, A., 2002. *Microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring*. *Adv Biochem Eng Biotech.* 75, 81–118.

- Romero, M., Blanco, J., Sánchez, B., Vidal, A., Malato, S., Cardona, A.I., García, E., 1999. *Solar photocatalytic degradation of water and air pollutants: challenges and perspective*. *Solar Energy*. Vol. 66, 169-182.
- Ruiz, M.J., López-Jaramillo, L., Redondo, M.J., Font, G., 1997. *Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples*. *Butll. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 619-625.
- Ryan, D., Robards, K., 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31-44.
- Safarzadeh-Amiri, A., Bolton, J.R., Cater, S.R. 1996. *Ferrioxalate-mediated solar degradation of organic contaminants in water*. *Solar Energy*. 56, 439-444.
- Safarzadeh-Amiri, A., Bolton, J.R., Cater, S.R. 1997. *The use of iron in advanced oxidation processes*. *Water Research*. 31, 787-798.
- Sanjuán, A., Aguirre, A., Alvaro, M., García, H., 1999a. *2-4-6 Triphenylpyrylium ion encapsulated within Y zeolite as photocatalyst for the degradation of methyl parathion*. *Water Research* 34, 320-326.
- Sanjuán, A. 1999b. *El catión 2,4,6-trifenilpirilio encapsulado en la zeolita-Y como un nuevo sistema fotocatalítico alternativo al óxido de titanio*. Tesis Doctoral.
- Sarakinos, H.C., Bermingham, N., White, P.A., Rasmussen, J. B., 2000. *Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 63-71.
- Sarriá, V., Parra, S., Adler, N., Péringer, P., Benitez, N., Pulgarin, C., 2002. *Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds*. *Catalysis Today* 76, 301-315.

- Sarriá, V., Deront, M., Péringer, P., Pulgarin, C., 2003a. *Degradation of biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewater by a new integrated iron(III) photoassisted-biological treatment*. Applied Catalysis B: Environmental 40, 231-246.
- Sarriá, V., Kenfack, S., Guillot, O., Pulgarin, C. 2003b. *An innovative coupled solar-biological system at film pilot scale for the treatment biorecalcitrant pollutants*. Journal Photochemical Photobiology A. 159, 89-99.
- Scott J.P., Ollis D.F.,1995. *Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: Review and recommendations*. Environmental Progress 14, 88-103 .
- Sedlak, D.; Andren, W.A. 1991. *Oxidation of chlorobenzene with Fenton's Reagent*. Environ. Sci. Technol. 25, 777-782.
- Sharma, V.K. 2004. *Use of iron (VI) and iron (V) in water and wastewater treatment*. Water Science and Technology. 49, 69-74.
- Sigman, M.E., Buchanan, A.C., 1997. *Application of advanced oxidation process Technologies to extremely high TOC containing aqueous solutions*. Journal Advanced Oxidation Technology 2, 415-423.
- Simkins, S., Alexander, M., 1984. *Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density*. Appl. Environ. Microbiol. 47, 1299-1306.
- Staehelin, J.; Hoigne, J. 1982. *Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxyde*. Environ. Sci. Technol. 16, 676-681.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, AWWA y WEF), 20th edition, 1999. Greenberg, A. y col.

- Strevett, K., Davidova, I., Suflita, J.M., 2002. *A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 143-167
- Sychev, A. Y., Issak V. G., 1995. *Iron compounds and the mechanisms of the homogeneous catalysis of the activation of O₂ and H₂O₂ and of the oxidation of organic substrates*. Russ. Chem Rev. 64, 1105-1129.
- Subirats Huerta, S. y otros. *La Contaminación industrial en el sector agroalimentario de la Comunidad Valenciana*. IMPIVA, 1993.
- Sun, Y., Pignatello, J.J. 1992. *Chemical treatment os pesticide wates. Evaluation of Fe(III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH*. Journal Agricola Food Chemical 40, 322-327.
- Sun, Y., Pignatello, J.J. 1993a. *Activation of hydrogen by iron(III) chelates for abiotic degradation of herbicides and insecticides in water*. Journal Agricola Food Chemical 41, 308-312.
- Sun, Y., Pignatello, J.J. 1993b. *Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4-D by Fe³⁺/H₂O₂/UV*. Environmental Science Technology 27, 304-310.
- Teuber, M., Rögner, M., Berry, S. 2001. *Fluorescent probes for non-invasive bioenergetic studies of whole cyanobacterials cells*. Biochemical and Biophysical 1506, 31-46.
- Thouand, G., Capdeville, B., Block, J.C., 1996. *Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests*. Ecotoxicol. Environ. Safety 33, 261-267.
- Tomin, C.D.S.1997. *The Pesticide Manual 11th Edition*. British Crop Protection Council. UK.
- Tothill, I.E., Turner, A.P.F., 1996. *Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment*. Trends Analytical Chemistry, 15, 178-188

- Toussaint, M.W., Shedd, T.R., Van der Schaile, W.H., Leather, G.R. 1995. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 907.
- Tzoris, A., Fearnside, D., Lovell, M., Hall EAH., 2002. *Direct toxicity assessment of wastewater: baroxymeter, a portable rapid toxicity device and the industry perspective.* *Environ. Toxicol.* 17, 284– 90.
- US-EPA. 1994. *Handbook of Advanced Photochemical Oxidation Processes*, EPA/625/R-98/004.
- Vanhaeke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P., 1981. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 5, pp. 382.
- Vázquez Roncero, A., Graciani Constante, E., Maestro Durán, R., 1974. *Componentes fenólicos de la aceituna.I. Polifenoles de la pulpa.* *Grasas y aceites* 25, 269-279.
- Vázquez-Rodríguez, G., Palluy, F., Goma, G., Rols, J.L., 1999. *Procedures in ready biodegradability testing: effects of the inoculation and the monitored parameter.* *Environ. Technol.* 20, 301-308.
- Vidal A.; Sanchez B.; Romero M.; Blanco J.; Malato S.1994. *Proceedinngs of 1st Int. Conf. On Advanced Oxidation Tecnologies for Water and Air remediation.*
- von Sonntag, C., Dowideit, P., Fang X., Mertens, R., Pan ,X., Schuchmann M. N., Schuchmann, H. P., 1997. *The fate of peroxy radicals in aqueous solution.* *Water Science and Techonolgy* 35, 9-15.
- Wong, S.L., Nakamoto, L.; Wainwright, J.F. 1995. *Detection and toxicity of titanium from pulp and paper effluents.* *Earth and Environmental Science* 55, 878-885.
- Yeber, M.C.; Rodríguez, J.; Freer, J.; Baeza, J.; Duran, N.; Mansilla, H.D. 1999. *Advanced oxidation of a pulp mill bleaching wastewater.* *Chemosphere* 39, 1679-1688.

- Yeber, M.C., Rodríguez, J.; Freer, J.; Duran, N.; Mansilla, H.D. 2000. *Photocatalytic degradation of cellulose bleaching effluent by supported TiO₂ and ZnO*. Chemosphere 41, 1193-1197.
- Yu, G.; Zhu, W.; Yang, Z. 1998. *Pretreatment and biodegradability enhancement of DSD acid manufacturing wastewater*. Chemosphere 37, 487-494.
- Zhang, S., Wei, W., Zhang, J., Mao, Y., Deng, L., 2001. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82. 113.
- Zhao, J.; Wu, T.; Wu, K.; Oikawa, K.; Hidaka, H.; Serpone, N. 1998. *Photoassisted degradation of dye pollutants. Degradation of the cationic dye Rhodamine B in aqueous anionic surfactant/TiO₂ dispersions under visible light irradiation: evidence for the need of substrate absorption on TiO₂ particles*. Environ. Sci. technol. 32, 2394-2400.

9. APÉNDICES

9.1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Principales componentes orgánicos del alpechín	25
Tabla 1.2.- Compuestos derivados del ácido cinámico	26
Tabla 1.3.- Potenciales redox de algunos oxidantes	33
Tabla 1.4.- Principales organismos empleados en bioensayos de toxicidad	47
Tabla 1.5.- Listado de GEMs bioluminiscentes	53
Tabla 1.6.- Normas de biodegradabilidad según la OCDE.....	58
Tabla 1.7.- Condiciones experimentales de las normas de biodegradabilidad inmediata según la OCDE	59
Tabla 1.8.- Condiciones experimentales de las normas de biodegradabilidad intrínseca según la OCDE	63
Tabla 4.1.- Plaguicidas utilizados	81
Tabla 4.2.- Reactivos generales utilizados	84
Tabla 5.1.- Fotodegradación del Metasystox con TiO ₂	120
Tabla 5.2.- Fotodegradación del Ultracid con TiO ₂	121
Tabla 5.3.- Fotodegradación del Sevnol con TiO ₂	122
Tabla 5.4.- Fotodegradación del Laition con TiO ₂	123
Tabla 5.5.- Fotodegradación del ácido Ferúlico con AYG	125
Tabla 5.6.- Fotodegradación de cianuro libre y complejado, y del ion Cu (II) con fotoFenton	126
Tabla 5.7.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Metasystox	128
Tabla 5.8.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Ultracid	130
Tabla 5.9.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Sevnol	131
Tabla 5.10.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Laition.....	133
Tabla 5.11.- % inhibición de la respiración de fangos activos del ácido Ferúlico.....	135

Tabla 5.12.- % inhibición de la respiración de fangos activos del efluente de recubrimientos metálicos	136
Tabla 5.13.- Cálculo del volumen del efluente de recubrimientos metálicos tratados para provocar la inhibición de la respiración de fangos activos	137
Tabla 5.14.- % inhibición de la DBO ₅ del Laition	139
Tabla 5.15.- % inhibición de la luminiscencia producida por el Laition	141
Tabla 5.16.- % inhibición de la luminiscencia producida por el ácido Ferúlico	142
Tabla 5.17.- Comparación de la toxicidad del Laition utilizando los tres métodos	143
Tabla 5.18.- Valores de la DBO _{st} y de la DQO del Laition.....	146
Tabla 5.19.- Valores de la DBO _{st} y de la DQO del ácido Ferúlico	147
Tabla 5.20.- Valores de la DBO ₅ y de la DQO del Laition	149
Tabla 5.21.- Valores de la DBO ₅ y de la DQO del ácido Ferúlico.....	151
Tabla 5.22.- Valores del COT del Laition en el método de Zahn-Wellens.....	153
Tabla 5.23.- Valores de biodegradabilidad del Laition en el método Zahn-Wellens...	154
Tabla 5.24.- Valores de COT del Ultracid y su principio activo, el metidation, con el método de Zahn-Wellens.....	155
Tabla 5.25.- Valores de biodegradabilidad del Ultracid y su principio activo, el metidation, con el método de Zahn-Wellens.....	156
Tabla 5.26.- Comparación de la biodegradabilidad del Laition con los tres métodos	158
Tabla 5.27.- Valores de la mezcla de plaguicidas con un proceso fotoFenton	159
Tabla 5.28.- Comparación de la toxicidad de la mezcla de plaguicidas con los tres métodos	160
Tabla 5.29.- Valores de la DBO _{st} , DBO ₅ y la DQO de la mezcla de plaguicidas	161

9.2. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1.1.- Relación de la velocidad de reacción con la intensidad solar.....	41
Gráfica 5.1.- Fotodegradación del Metasystox con TiO_2	120
Gráfica 5.2.- Fotodegradación del Ultracid con TiO_2	121
Gráfica 5.3.- Fotodegradación del Sevnol con TiO_2	122
Gráfica 5.4.- Fotodegradación del Laition con TiO_2	124
Gráfica 5.5.- Fotodegradación del ácido Ferúlico con AYG	125
Gráfica 5.6.- Fotodegradación de cianuro libre y complejado, y del ion Cu (II) con fotoFenton.....	127
Gráfica 5.7.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Metasystox	129
Gráfica 5.8.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Ultracid	130
Gráfica 5.9.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Sevnol.....	132
Gráfica 5.10.- % inhibición de la respiración de fangos activos del Laition	133
Gráfica 5.11.- Comparación de la inhibición de la respiración de fangos activos de los plaguicidas	134
Gráfica 5.12.- Cálculo del volumen del efluente de recubrimientos metálicos tratados para provocar la inhibición de la respiración de fangos activos.....	137
Gráfica 5.13.- Ensayo de la DBO_5 del Laition	138
Gráfica 5.14.- % inhibición de la DBO_5 del Laition	139
Gráfica 5.15.- % inhibición de la luminiscencia producida por el Laition	141
Gráfica 5.16.- Comparación de la toxicidad del Laition utilizando los tres métodos...	144
Gráfica 5.17- Variación de la DBO_{st} y de la DQO del Laition	146
Gráfica 5.18.- Variación de la DBO_{st} y de la DQO del ácido Ferúlico.....	147
Gráfica 5.19- Variación de la DBO_{st} y de la DQO de ácidos fenólicos después de un tratamiento de ozonización	148
Gráfica 5.20.- Variación de la DBO_5 y de la DQO del Laition	150
Gráfica 5.21.- Variación de la DBO_5 y de la DQO del ácido Ferúlico	151

Gráfica 5.22.- Variación de la biodegradabilidad del Laition en el método de Zahn-Wellens	154
Gráfica 5.23.- Variación de la biodegradabilidad del Ultracid y su principio activo, el metidation, con el método de Zahn-Wellens.....	156
Gráfica 5.24.- Variación de la mezcla de plaguicidas con un proceso fotoFenton	159
Gráfica 5.25.- Comparación de la toxicidad de la mezcla de plaguicidas con los tres métodos	161
Gráfica 5.26.- Variación de la DBOst, DBO ₅ y la DQO de la mezcla de plaguicidas..	162
Gráfica 5.27.- Variación de la biodegradabilidad según el método de Zahn-Wellens de la mezcla de plaguicidas.....	162

9.3 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Estructura química del ácido cinámico.....	26
Figura 1.2.- Gestión de un residuo industrial.....	28
Figura 1.3.- Espectro de la radiación solar en la superficie de la Tierra.....	36
Figura 1.4.- Teoría de bandas de un semiconductor.....	39
Figura 1.5.- Cation 2, 4, 6 - trifenilpirilo.....	41
Figura 1.6.- Mecanismo de la actuación del cation 2, 4, 6 - trifenilpirilo electrolito como fotocatalizador solar.....	42
Figura 1.7.- Estructura química del amarillo de acridina	43
Figura 1.8.- Representación esquemática de un proceso de biodegradación	61
Figura 4.1.- Estructura química del ácido ferúlico	82
Figura 4.2.- Estructura química del Acridine Yellow G (AYG).....	83
Figura 4.3.- Balanza Analítica.....	86
Figura 4.4.- Estufa para determinación de SST	86
Figura 4.5.- Trampa de vacio para determinación de SST.....	87
Figura 4.6.- pHmetro.....	87
Figura 4.7.- Conductímetro.....	88
Figura 4.8.- Electrodo de CN^-	88
Figura 4.9.- Equipo de cromatografía de alta presión (HPLC)	89
Figura 4.10.- Analizador de carbono orgánico total (COT).....	90
Figura 4.11.- Esquema de funcionamiento del respirómetro.....	91
Figura 4.12.- Respirómetro de laboratorio BM3-LAB	92
Figura 4.13.- Equipo para determinación de demanda bioquímica de oxigeno	92
Figura 4.14a.- Tubos Corning.....	93
Figura 4.14b.- Termoreactor.....	93
Figura 4.15.- Fotómetro	94
Figura 4.16.- Luminómetro	94

Figura 4.17.- Planta piloto de fotocátalisis solar de 4L	96
Figura 4.18.- Planta piloto de fotocátalisis solar de 24L	96
Figura 4.19.- Planta piloto de fotocátalisis solar de 50L	97
Figura 4.20.- Diagrama OUR/t para la inhibición de respiración de fangos activos ...	102
Figura 4.21.- Montaje para el método de Zahn-Wellens	109
Figura 4.22.- Respirograma para el cálculo de la DBOst	110
Figura 5.1.- Estructura Química del metiloxidementon.....	128
Figura 5.2.- Estructura Química del metidation	129
Figura 5.3.- Estructura Química del carbaril	131
Figura 5.4.- Estructura Química del dimetoato	132

9.4. ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.1. y 1.2 - Reacción del proceso Fenton	37
Ecuación 1.3.- Reacción del proceso fotoFenton	37
Ecuación 1.4.- Efecto de la luz solar sobre el TiO ₂	39
Ecuación 1.5., 1.6. y 1.7- Formación de radicales en el fotoFenton	39
Ecuación 1.8.- Reacción de emisión de luminiscencia.....	51
Ecuación 1.9.- Porcentaje de inhibición de la luminiscencia	52
Ecuación 1.10.- Ecuación general de biodegradación de compuestos orgánicos	57
Ecuación 4.1.- Luminiscencia	98
Ecuación 4.2.- % de Inh. luminiscencia	100
Ecuación 4.3.- % de Inh. OUR.....	102
Ecuación 4.4.- % de Inh. OUR corregida.....	103
Ecuación 4.5.- Demanda Bioquímica de Oxígeno	104
Ecuación 4.6.- Eliminación de CO ₂ . Trampa alcalina	105
Ecuación 4.7.- % de Inh. DBO.....	107
Ecuación 4.8.- % de biodegradación por el método Zahn-Wellens.....	109
Ecuación 4.9.- Demanda Química de Oxígeno	113
Ecuación 4.10.- Ecuación t_{30w} . Normalización de la intensidad de reacción	115

