

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Sección de Ingeniería Química



TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE
4-CLOROFENOL EN EFLUENTES
LÍQUIDOS MEDIANTE REACTORES
DISCONTINUOS SECUENCIALES

Víctor Manuel Monsalvo García

Madrid, 2010

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Sección de Ingeniería Química



TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE
4-CLOROFENOL EN EFLUENTES
LÍQUIDOS MEDIANTE REACTORES
DISCONTINUOS SECUENCIALES

MEMORIA

que para optar al grado de

Doctor con Mención Europea

presenta

Víctor Manuel Monsalvo García

Madrid, Octubre de 2010

D. Ángel Fernández Mohedano, Profesor Titular de Universidad y D. Juan José Rodríguez Jiménez, Catedrático de Universidad, ambos profesores de la Sección Departamental de Ingeniería Química, perteneciente al Departamento de Química-Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR: que el presente trabajo, titulado: “Tratamiento biológico de 4-clorofenol en efluentes líquidos mediante reactores discontinuos secuenciales”, presentado por D. Víctor Manuel Monsalvo García, ha sido realizado bajo su dirección, en los laboratorios de la Sección de Ingeniería Química, en la Universidad Autónoma de Madrid y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a efectos oportunos, firmamos el presente informe en Madrid, a 7 de octubre de dos mil diez.

Ángel Fernández Mohedano

Juan José Rodríguez Jiménez

Quiero agradecer:

Al Dr. Ángel Fernández Mohedano el brindarme la oportunidad de realizar estos y otros estudios que han dado lugar finalmente a esta tesis, por sus expertos consejos, por confiar en mis decisiones y puntos de vista y estudiar concienzudamente los resultados obtenidos a lo largo de la realización de la tesis. Al Dr. Juan José Rodríguez su eterna paciencia, sus certeras directrices, sus diestras revisiones y todo lo que con él he aprendido. Lejos de tópicos, gracias a ellos alcanzo un sueño.

Al Dr. Jose Antonio Casas por su disponibilidad para cualquier consulta, por su buen hacer como director de la Sección Departamental de Ingeniería Química y su apoyo a la hora de tomar la poco acertada decisión de permitirme quedar un mayor periodo con vosotros, espero estar a la altura de la calidad docente e investigadora que caracteriza a la casa.

A Nigel Horan, Bruce Jefferson y Simon Judd por su cálida acogida en las Universidades de Leeds y Cranfield para realizar estancias de investigación, ambas me han aportado mucho a nivel profesional y personal. A ellos he de sumar todas las personas que hicieron que esos meses fuesen inolvidables.

A la Dra. Montserrat Tobajas por todo el empeño y dedicación durante los estudios realizados con cepas puras. Trabajar con ella ha sido muy productivo y gratificante, ha sido un placer que contase conmigo para pasar de *L. reuteri* a nuestras amigas de nombre peculiar.

Son tres entusiastas tres, Alberto Suárez, Sonia Sánchis y Dr. Daniel Puyol, a los que agradezco especialmente todos los buenos y regulares momentos que nos han permitido que, aunando esfuerzos, hayamos colonizado con fangos y cepas un espacio del Edificio de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos. Un Edificio en el que, gracias a la titánica labor de Luis Roperó, se cuenta siempre con los reactivos, materiales y espacio necesarios para poder investigar sin más limitaciones que las de uno mismo. El Dr. del cuarteto es heavy, impuntual,

cabezota,...pero de conocimiento, entusiasmo y bondad está sobrado. Al él y a Jose Luis Sanz les debo además el haberme enganchado a los sistemas anaerobios.

Es un orgullo agradecer a aquellos Licenciados en Ciencias Ambientales e Ingenieros Técnicos Industriales que eligieron desarrollar sus proyectos fin de carrera con mi torpe dirección el esfuerzo depositado en sus tareas. Diego Gómez, Sandra Ballesteros, José María Inés, Álvaro Melgar, Miguel San Martín, María Cabrera, Fernando Nogales, Alejandra Montes y Luis Arévalo todas vuestras manos, todas vuestras mentes, han contribuido en el desarrollo experimental de la tesis, muchas gracias.

A la Dra. Zahara, por todos los ratos compartidos dentro y fuera del trabajo, porque la considero un valor añadido resultante de trabajar en IQ, sin duda una persona especial. Otra amiga con la que tengo la suerte de trabajar es la Dra. Díaz. A falta de volúmenes para agradecerla estos años compartiendo jornadas de trabajo y ocio, quisiera agradecerla su papel como compi, psicóloga, consejera, secre, agenda,..., amiga seguro para toda la vida.

Ha sido un enorme placer compartir durante estos años en la Sección Departamental de Ingeniería Química la UAM infinitos ratos con las personas que la integran.

Teniendo la certeza de que uno no es la unidad, sino un elemento del sistema que le rodea, no puedo olvidar a mis mejores amigos, a los amigos charros de toda la vida (Agus, Anibal y Javi) y a los que me acogieron tras la peregrinación a Villalba, a los compañeros de carrera, a los amigos que fueron compañeros de carrera, a la familia que ejerce como tal, a mi hermano y a los mejores padres que uno pueda diseñar, ambos mi gran orgullo, les estoy agradecido por ser la causa de que sea una persona feliz.

A todos os agradezco el que de un modo u otro me habéis ayudado a conseguir una gran ilusión.

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias al apoyo económico prestado a través de los proyectos CTM2004-00337 y CTM2007-60959 del Ministerio de Ciencia e Innovación, y a la concesión de la beca de Formación de Personal Investigador (FPI 2005) cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

ÍNDICE

OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO	1
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	18
I. INTRODUCCIÓN.....	28
1.1. Aguas Residuales Industriales.....	30
1.2. Depuración de Aguas Contaminadas con Fenoles y Clorofenoles.....	32
1.2.1. Tratamientos No Destructivos.....	35
<i>1.2.1.1. Adsorción.....</i>	<i>35</i>
<i>1.2.1.2. Extracción.....</i>	<i>36</i>
1.2.2. Tratamientos Destructivos.....	36
<i>1.2.2.1. Tratamientos térmicos.....</i>	<i>36</i>
<i>1.2.2.2. Tratamientos de oxidación.....</i>	<i>36</i>
<i>1.2.2.3. Tratamientos reductores.....</i>	<i>41</i>
<i>1.2.2.4. Tratamientos sonoquímicos.....</i>	<i>42</i>
<i>1.2.2.5. Tratamientos electroquímicos.....</i>	<i>43</i>
1.2.3. Depuración Biológica de Aguas Contaminadas con Fenoles y Clorofenoles.....	43
<i>1.2.3.1. Sistemas anaerobios y aerobios.....</i>	<i>44</i>
1.3. Reactores Discontinuos Secuenciales.....	47
1.3.1. Definición, Historia y Aplicaciones.....	47
1.3.2. Descripción del Sistema.....	48
1.3.3. Tratamiento de Aguas Conteniendo Fenoles y Clorofenoles mediante SBR.....	51
1.4. El Marco Regulatorio de las Aguas Residuales.....	53
II. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN, PUESTA EN MARCHA Y ACLIMATACIÓN DE REACTORES DISCONTINUOS.....	56
2.1. Introducción.....	58
2.2. Materiales y Métodos.....	60
2.2.1. Reactores Discontinuos.....	60
2.2.2. Fuente de Inóculo.....	61
2.2.3. Composición del agua Tratada.....	62
2.2.4. Métodos Analíticos.....	62

2.2.4.1. Análisis físicos.....	62
2.2.4.1. Análisis químicos.....	62
2.2.4.1. Análisis estadístico.....	62
2.3. Resultados y Discusión.....	63
2.3.1. Evaluación del Empleo de Cosustratos.....	63
2.3.2. Influencia de la Concentración de Fenol como Cosustrato.....	68
2.3.3. Influencia del pH sobre la Biodegradación de 4-CF.....	73
2.3.4. Influencia de la Concentración de Inóculo sobre la Puesta en Marcha de Reactores Discontinuos.....	79
2.3.5. Eliminación de Nutrientes durante la Degradación Cometabólica de 4-CF.....	84
2.3.6. Influencia de la Adaptación a Fenol sobre el Tratamiento de 4-CF durante la Puesta en Marcha de Reactores.....	85
III. TRATAMIENTO DE 4-CF CON BIOMASA SUSPENDIDA EN SBR.....	88
3.1. Introducción.....	90
3.2. Materiales y Métodos.....	94
3.2.1. Reactores Discontinuos Secuenciales.....	94
3.2.2. Fuente de Inóculo.....	96
3.2.3. Composición del Agua Tratada.....	96
3.2.4. Métodos Analíticos.....	97
3.2.4.1. Análisis físicos.....	97
3.2.4.1. Análisis químicos.....	98
3.2.4.1. Análisis biológicos.....	100
3.2.5. Análisis Estadístico.....	104
3.3. Resultados y Discusión.....	104
3.3.1. Biodegradación Cometabólica de 4-CF a Temperatura Controlada..	104
3.3.1.1. Aclimatación del fango.....	104
3.3.1.2. Tratamiento cometabólico de 4-CF mediante SBR: Estudio prelimiar.....	107
3.3.1.3. Influencia de la temperatura en la velocidad inicial de consumo	116
3.3.1.4. Degradación anóxica de fenol.....	118
3.3.1.5. Sedimentabilidad del lodo.....	120
3.3.1.6. Consumo de oxígeno e intermedio.....	121
3.3.1.5. Evolución del COT y de la ecotoxicidad.....	122
3.3.2. Degradación de 4-CF Empleando Biomasa Floculenta.....	124
3.3.3. Degradación de 4-CF Empleando Lodo Parcialmente Granulado.....	128

IV. PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE ADSORBENTES A PARTIR DE BIOSÓLIDOS.....	133
4.1. Introducción.....	135
4.2. Materiales y Métodos.....	139
4.2.1. Preparación de los Adsorbentes.....	139
4.2.2. Ensayos de Adsorción.....	141
4.2.3. Equipos de Caracterización y Análisis.....	141
4.2.3.1. <i>Termogravimetría.....</i>	141
4.2.3.2. <i>Desorción térmica programada.....</i>	142
4.2.3.3. <i>Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido.....</i>	142
4.2.3.4. <i>Composición química elemental.....</i>	142
4.2.3.5. <i>Análisis de la estructura porosa.....</i>	142
4.3. Resultados y Discusión.....	143
4.3.1. Caracterización de los Materiales Carbonosos.....	143
4.3.1.1. <i>pH.....</i>	143
4.3.1.2. <i>Análisis químico elemental.....</i>	143
4.3.1.3. <i>Estructura porosa.....</i>	145
4.3.1.4. <i>Morfología superficial.....</i>	148
4.3.2. Evaluación de la Capacidad de Adsorción.....	151
4.3.2.1. <i>Adsorción de 4-CF sobre biosólidos secos.....</i>	153
4.3.2.2. <i>Adsorción de 4-CF sobre carbonizados.....</i>	159
4.3.2.3. <i>Adsorción de 4-CF sobre materiales activados con CO₂.....</i>	160
4.3.2.4. <i>Adsorción de 4-CF con materiales activados con aire.....</i>	161
4.3.2.5. <i>Adsorción de 4-CF con materiales precarbonizados y activados con aire.....</i>	163
4.3.2.6. <i>Adsorción de 4-CF con materiales activados con KOH.....</i>	164
4.4. Consideraciones Finales.....	166
V. EMPLEO DE SOPORTES CARBONOSOS PARA EL TRATAMIENTO DE 4-CF EN SBBR.....	168
5.1. Introducción.....	170
5.2. Materiales y Métodos.....	176

5.2.1. Reactores Discontinuos Secuenciales.....	176
5.2.2. Fuente de Inóculo.....	176
5.2.3. Preparación de los Soportes y Experimentos de Adsorción.....	176
5.2.4. Composición del Agua Tratada.....	177
5.2.5. Métodos Analíticos.....	178
5.2.5.1. Análisis físicos.....	178
5.2.5.2. Análisis químicos.....	178
5.2.5.3. Análisis biológicos.....	178
5.2.6. Análisis Estadístico.....	178
5.3. Resultados y Discusión.....	178
5.3.1. Capacidad de Adsorción de 4-CF.....	178
5.3.2. Estabilidad de los Reactores.....	179
5.3.3. Degradación de 4-CF.....	181
5.3.3.1. Degradación anóxica y adsorción de 4-CF.....	181
5.3.3.2. Degradación aerobia de 4-CF.....	182
5.3.4. Regeneración de los Adsorbentes.....	186
5.3.5. Sedimentabilidad.....	188
5.3.6. Análisis de la Evolución de la Biopelícula y la Microbiota.....	189
VI. DEGRADACIÓN DE 4-CF MEDIANTE DOS ESPECIES DE PSEUDOMONAS. BIOAUMENTACIÓN EN SBR.....	192
6.1. Introducción.....	194
6.2. Materiales y Métodos.....	198
6.2.1. Cepas Biológicas.....	198
6.2.2. Medios de Cultivo.....	198
6.2.3. Biorreactor.....	199
6.2.4. Equipos Auxiliares.....	201
6.2.5. Análisis Químicos.....	201
6.2.6. Ensayos Abióticos.....	201
6.3. Resultados y Discusión.....	202
6.3.1. Degradación de Fenol y 4-CF mediante <i>Comamonas testosteroni</i>	202
6.3.1.1. Efecto de la temperatura en la degradación de fenol.....	202
6.3.1.2. Degradación de 4-CF.....	203
6.3.1.3. Influencia de la aclimatación en la degradación cometabólica de 4-CF con fenol.....	204
6.3.1.4. Degradación cometabólica de 4-CF con fenol.....	204
6.3.1.5. Degradación cometabólica de 4-CF con glucosa.....	206
6.3.1.5. Degradación cometabólica de 4-CF con fenol y glucosa.....	208
6.3.2. Degradación de Fenol y 4-CF mediante <i>Pseudomonas putida</i>	210

6.3.2.1. Efecto de la temperatura en la degradación de fenol y mezclas denol/4-CF.....	210
6.3.2.2. Cinética de la degradación de fenol.....	211
6.3.2.3. Degradación de 4-CF.....	215
6.3.2.4. Influencia de la aclimatación sobre la degradación cometabólica de 4-CF.....	216
6.3.2.5. Empleo de cosustratos en la degradación de 4-CF.....	217
6.3.2.6. Degradación cometabólica de 4-CF en presencia de fenol o glucosa.....	219
6.3.3. Tratamiento de 4-CF Empleando Lodo Bioaumentado con <i>P. putida</i> en SBR.....	223
6.3.3.1. Influencia de la aclimatación y bioaumentación en la puesta en marcha.....	223
6.3.3.2. Degradación cometabólica de 4-CF con fenol.....	224
6.3.3.3. Degradación de 4-CF como única fuente de carbono y energía.....	231
VII. CONCLUSIONES.....	236
CONCLUSIONS.....	241
VIII. NOMENCLATURA.....	244
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	248

OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO

“Y cuando te flaqueeen las fuerzas amigo, sé el burro al que le ponen la zanahoria en frente, al final, alcanzarás aquello por lo que luchas”, Juan Mayoral.

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación que se desarrolla en la Sección Departamental de Ingeniería Química de la UAM sobre el estudio y desarrollo de sistemas biológicos para el tratamiento de aguas residuales industriales.

A lo largo del trabajo de investigación se analiza la aplicación de sistemas basados en la degradación biológica aerobia para el tratamiento de compuestos orgánicos clorados potenciales contaminantes de aguas residuales industriales. Dentro de los compuestos aromáticos halogenados, los clorofenoles tienen una especial relevancia dada su utilidad en la fabricación de biocidas, debido a sus buenas propiedades como disolventes, reactivos e intermedios en reacciones de síntesis. El 4-clorofenol se seleccionó como compuesto xenobiótico tipo, ya que, se trata de un compuesto organoclorado de baja biodegradabilidad, el cual se encuentra a menudo en las aguas residuales industriales debido a sus numerosas aplicaciones.

El interés del presente estudio no sólo se centra en la degradación del 4-clorofenol, sino que analiza diferentes métodos de intensificación para mejorar, tanto la eficacia, como la capacidad de tratamiento de reactores discontinuos secuenciales empleados en el tratamiento de compuestos xenobióticos.

El objetivo general del trabajo se particulariza en los siguientes objetivos parciales:

- Evaluación de las condiciones de operación, puesta en marcha y aclimatación de sistemas biológicos aerobios. A partir de los resultados se propondrán las condiciones de operación óptimas respecto al empleo de cosustratos y su concentración, pH, requerimientos de nutrientes, así como concentración de biomasa y posibilidades de aclimatación.
- Estudio del empleo de sistemas con biomasa suspendida. Se analizará la influencia de la temperatura sobre la degradación cometabólica de 4-clorofenol y fenol, aclimatación y sedimentabilidad del fango, velocidad de consumo cometabólico con fenol, degradación anóxica, intermedios de degradación generados, grado de mineralización y reducción de la ecotoxicidad. El desarrollo de biomasa granular permitirá analizar las ventajas que este sistema ofrece frente a un lodo biológico convencional en estado floculento.

- Desarrollo de adsorbentes carbonosos a partir de biosólidos excedentarios de estaciones depuradoras de aguas residuales. Se prepararán y caracterizarán adsorbentes obtenidos mediante métodos de activación física y química, evaluando los materiales resultantes en la adsorción en fase acuosa de 4-clorofenol.
- Estudio del empleo de soportes carbonosos para el desarrollo de biopelículas en reactores discontinuos secuenciales. Se comparará el material resultante de la pirólisis de biosólidos obtenidos a partir de lodo biológico con un soporte de carbón activo comercial. Se analizará el desarrollo de la biopelícula y la regeneración de los soportes en la degradación de 4-clorofenol y se evaluará la estabilidad del sistema.
- Estudio de la capacidad de degradación de fenol y 4-clorofenol empleando cepas de *Comamonas testosteroni* y *Pseudomonas putida*. Se evaluará el efecto de la aclimatación y el empleo de cosustratos, en medios binarios y ternarios, en la degradación de ambos compuestos.
- Evaluación del efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas putida* para la degradación de 4-clorofenol y de mezclas de fenol y 4-clorofenol. Se analizará el efecto de la aclimatación del lodo biológico y de la cepa sobre la puesta en marcha del reactor biológico y se realizará un seguimiento bioindicativo del proceso de colonización del lodo.

RESUMEN (SUMMARY)

“En algunos ríos es un crimen sacar peces; en otros, es un milagro”, Richardson.

La contaminación de las aguas constituye un problema prioritario en materia de medio ambiente, ya que se trata de un bien relativamente escaso utilizado de forma cada vez más intensiva durante las últimas décadas. La presencia de contaminantes peligrosos en las aguas residuales, en especial de origen industrial, viene mereciendo una atención creciente en la política comunitaria en este ámbito. La evolución de los sistemas de tratamiento de aguas ha conducido al desarrollo de tecnologías eficaces para la eliminación de contaminantes específicos, entre los que destacan pesticidas, herbicidas, compuestos fenólicos, derivados halogenados y metales pesados. En concreto, los clorofenoles se emplean en importantes procesos industriales tales como la fabricación de herbicidas, tintes, resinas fenólicas, protectores de la madera y reguladores del crecimiento de plantas. Las aguas residuales de estas actividades se caracterizan por contener una concentración variable de clorofenoles, entre los que destaca el 4-clorofenol (4-CF) debido a su empleo, además, para la síntesis de productos farmacéuticos, como desnaturizante de alcoholes y disolvente selectivo en el refinado de aceites minerales.

Ciertos sectores de actividad industrial como la producción de resinas, nylon, fitosanitarios, fármacos, etc. generan aguas residuales con concentraciones variables de compuestos fenólicos y clorofenólicos. A comienzos de siglo, la producción de residuos fenólicos y clorofenólicos en Estados Unidos se situaba por encima de 55.000 t y próxima a las 2.000, respectivamente. La preocupación por el vertido de estos compuestos a las aguas se ha visto reflejada en el desarrollo de normativas cada vez más rigurosas. Cabe destacar que los clorofenoles están incluidos en las listas de contaminantes prioritarios, tanto de la Comunidad Europea (Directivas 98/83/CE, 2006/11/CE y 2008/108/CE) como de la EPA. Además, existen una serie de normas en las que se recogen específicamente límites de vertido para los compuestos fenólicos y clorofenólicos como la Ley 10/93 de la Comunidad de Madrid y los RD 927/1988 y 1138/1990.

Tradicionalmente, los clorofenoles se han tratado mediante un amplio abanico de métodos físico-químicos. Así, entre las tecnologías no destructivas más empleadas se encuentran la adsorción con carbón activo, el arrastre con aire y la extracción líquido-líquido, las cuales simplemente transfieren los compuestos del agua contaminada a otro medio. Los procesos de oxidación húmeda y la oxidación avanzada, incluyendo sus

versiones fotoasistidas, presentan una serie de desventajas derivadas de la elevada presión y temperatura de operación, el consumo de reactivos y/o la necesidad de equipos complejos o caros. La hidrodecloración catalítica puede conseguir de forma eficaz la eliminación del cloro de los clorofenoles, pero no reduce la carga orgánica en términos de COT, por lo que se requiere algún tratamiento posterior. Los procesos químicos, en general, se encarecen en gran medida para el tratamiento de altas cargas de contaminante y, en algunos casos, se generan productos con una toxicidad superior a la de los propios compuestos de partida.

Debido a que la mayoría de los clorofenoles son tóxicos y poco biodegradables, la eliminación de estos compuestos mediante tratamientos biológicos convencionales no resulta efectiva. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la oxidación biológica ha supuesto la aparición de procesos competitivos para el tratamiento de aguas residuales que contengan este tipo de compuestos, dentro de los cuales se incluyen sistemas, tanto anaerobios, como aerobios, entre los que destacan los UASB, EGSB, IC, SBR y MBR. La intensificación de dichas tecnologías para desarrollar sistemas biológicos avanzados más estables y eficientes puede suponer una solución interesante para el tratamiento de aguas residuales que contengan fenoles y clorofenoles.

Entre los diferentes tratamientos biológicos empleados para este tipo de aguas, los reactores discontinuos secuenciales (en inglés, Sequencing Batch Reactors, SBR) se han empleado en el tratamiento de un gran número de compuestos xenobióticos, debido, principalmente, a ciertas ventajas como la reducción del espacio necesario, el control sencillo del proceso, el tratamiento de nutrientes o el reducido consumo energético. La flexibilidad de los SBR en cuanto a operación y control, hace de este sistema una opción muy atractiva para el tratamiento de aguas sujetas a variaciones importantes como las clorofenólicas. Esta tecnología ha sido ensayada para el tratamiento de distintos clorofenoles (4-CF, 2,4-diclorofenol, 3-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol), analizando la influencia del tipo de secuencia empleada, la temperatura y las diferentes técnicas de aclimatación, así como las rutas degradativas de los diferentes compuestos. Sin embargo, la optimización de las condiciones de operación y el empleo de estrategias de intensificación, como el empleo de biomasa

granular o soportes para el crecimiento de la misma, la bioaumentación o el cometabolismo, no han sido suficientemente estudiados.

En el presente trabajo se investiga la aplicación de SBR para el tratamiento de 4-clorofenol en efluentes acuosos. Además, se evalúa la eficacia de dicho sistema cuando se emplean distintos cosustratos para el consumo cometabólico del compuesto, la utilización de biomasa granular, el desarrollo y aplicación de nuevos soportes adsorbentes para el desarrollo de biopelículas y la bioaumentación del fango con cepas degradadoras de clorofenoles como métodos de intensificación del sistema.

En primer lugar, se estudió el efecto de las condiciones de operación (empleo de cosustratos, pH, concentración de inóculo, requerimientos de nutrientes y adaptación previa a fenol) sobre la degradación de 4-CF durante la puesta en marcha de reactores biológicos a base de fangos activos en discontinuo. Se seleccionaron diferentes cosustratos, los cuales pueden aparecer conjuntamente en efluentes con 4-CF, debido a su formación en el tratamiento de clorofenoles mediante procesos químicos de oxidación o reducción (ciclohexanol, catecol y fenol). Por otro lado, el efecto de la adición de glucosa se estudió debido al interés del empleo de sustratos biogénicos fácilmente biodegradables en la degradación de xenobióticos. La baja biodegradabilidad del 4-CF determinó rendimientos de degradación inferiores al 40% en 48 h, tratando 80 mg/L de dicho compuesto. El rendimiento aumentó hasta el 80% al añadir ciclohexanol, fenol o glucosa en bajas concentraciones ($DQO_{4-CF}:DQO_{\text{cosustrato}} = 1:0,25$). La adición de catecol no mejoró la eficacia observada en la degradación de 4-CF sin cosustratos. Con el resto de cosustratos, un aumento de la concentración de los mismos mejoró significativamente la degradación del 4-CF, con una disminución en el grado de mineralización. El tipo de cosustrato empleado influyó sensiblemente en la velocidad de degradación del 4-CF, observándose una variación de las velocidades medias de 0,28 a 0,14 mg 4-CF/g SSV·h, con fenol y catecol, respectivamente. El análisis cinético de los resultados obtenidos con fenol como cosustrato indica que las velocidades de degradación de 4-CF y COT aumentan al hacerlo la concentración, observándose que la degradación cometabólica de 4-CF con fenol corresponde a una inhibición competitiva. Este tipo de inhibición habitualmente sucede con sustratos tóxicos o recalcitrantes, desapareciendo cuando se consume el sustrato inhibitorio.

La aclimatación de la biomasa a la presencia de fenol mejoró de forma notable el rendimiento de eliminación de 4-CF, independientemente de la concentración del mismo y de la presencia o no de cosustratos, alcanzándose velocidades específicas de degradación dos órdenes de magnitud superiores a las obtenidas con lodo no adaptado. El empleo de biomasa aclimatada permitió degradar completamente el 4-CF a pH entre 3,5 y 10,5. Sin embargo, las mayores velocidades de degradación se observaron a pH neutro o ligeramente básico, debido a la capacidad amortiguadora que mostraron los microorganismos en condiciones alcalinas.

Una vez investigadas las condiciones de operación se estudió la degradación de 4-CF en SBR, operando a temperaturas entre 20 y 35 °C con un t_{HR} de 10,5 d. Se emplearon ciclos de 12 h, con las siguientes cuatro etapas: llenado anóxico (1 h), reacción aerobia (9,5 h), decantación (1 h) y vaciado (0,5 h). Los reactores operaron ininterrumpidamente con una secuencia cíclica de las etapas establecidas. El influente alimentado contenía una concentración fija de fenol en los ensayos de degradación cometabólica y concentraciones crecientes de 4-CF, junto con una fuente de nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes necesarios para llevar a cabo eficientemente el proceso biológico de degradación. Se utilizó una relación DQO:N:P:micronutrientes de 100:0,5:0,1:0,05, con la que se observó una eliminación óptima de los diferentes compuestos.

Durante la puesta en marcha de los SBR se observó la acumulación de productos de la degradación aerobia del 4-CF por la ruta *meta*. Dichos compuestos desaparecieron tras el periodo de aclimatación (60 d), el cual se redujo al operar a 35 °C. Los resultados indican que el fenol y el 4-CF son eficazmente eliminados siguiendo un modelo de consumo diáuxico, a temperaturas entre 20 y 35 °C, dentro de un amplio intervalo de concentraciones de 4-CF tratadas (105 - 1.470 mg/L de 4-CF, con 525 mg/L de fenol). Las velocidades de degradación de ambos compuestos aumentaron significativamente con la temperatura dentro del intervalo ensayado, llegando a triplicarse en el caso del 4-CF. Del mismo modo, el aumento de la temperatura permitió aumentar la carga de 4-CF tratable hasta 80 mg 4-CF/g SSV·d, mejorando la sedimentabilidad del lodo y reduciendo la ecotoxicidad de los efluentes, por lo que el resto de ensayos se realizaron a 35 °C. Para bajas concentraciones de 4-CF se observó degradación de fenol en condiciones anóxicas. Sin embargo, la eliminación del 4-CF solamente fue posible

durante la etapa de reacción aerobia. Mediante ensayos respirométricos se observó que el 4-clorocatecol es el compuesto intermedio mayoritario de la degradación cometabólica del 4-CF en presencia de fenol.

A continuación se estudió la degradación de 4-CF como única fuente de carbono y energía. Durante la misma no se detectó 4-CC, lo que indica un consumo más rápido de dicho intermedio en ausencia de cosustrato. La concentración de 4-CF alcanzada en el reactor mostró una gran influencia sobre la eficacia del proceso, debido a su toxicidad, de forma que la carga más alta de 4-CF que pudo tratarse en estos ensayos fue de 21 mg 4-CF/g SSV·d. El aumento del caudal del influente de 0,1 a 0,75 L/h provocó un mayor lavado del reactor, reduciendo la concentración de COT refractario de 50 a 7 mg/L. Esta variación de caudal no provocó cambios en el lodo biológico, observándose flóculos de morfología irregular, muy compactos y firmes, de tamaño entre 60 y 100 μm , con una moderada densidad de organismos filamentosos y una buena sedimentabilidad ($\text{IVF} < 150 \text{ mL/g}$).

La biomasa parcialmente granular desarrollada en el SBR a una velocidad ascensional de aire de 0,5 cm/s mostró un tamaño heterogéneo (100 μm - 2 mm), formas irregulares, bordes redondeados, parduzcos, compactos, firmes y con una elevada sedimentabilidad ($\text{IVF} \approx 43,5 \text{ mL/g}$). Dichos gránulos se asociaron entre sí mediante fibras de entre 2 y 5 μm de diámetro distribuidas paralelamente en multicapas. La biomasa mostró una elevada estabilidad frente al 4-CF, lo que permitió aumentar la carga del mismo hasta 584 mg 4-CF/g SSV·d, alcanzando una concentración en el interior del reactor de 160 mg/L, muy superior a la tratable en el SBR con biomasa floculenta, tanto sin cosustrato (70 mg/L) como en presencia de fenol (100 mg/L). Con el sistema parcialmente granulado se consiguió una mineralización mayor que con lodo floculento.

Se han preparado materiales carbonosos a partir de biosólidos de depuradora por diferentes procedimientos (secado, pirólisis, activación con KOH, CO_2 o aire), en un horno discontinuo vertical, a distintas temperaturas y tiempos de activación. Los materiales obtenidos se caracterizaron y se ensayaron como adsorbentes para la eliminación de 4-CF en fase acuosa.

La capacidad máxima de adsorción de 4-CF osciló en los materiales ensayados entre 82 y 362 mg 4-CF/g. Las menores capacidades de adsorción corresponden a los biosólidos secos, al tratarse de materiales no porosos y con elevado contenido en cenizas (23%, b.s.). Los distintos métodos de preparación ensayados condujeron a materiales con características químicas y estructurales muy diferentes. La carbonización de los biosólidos permitió obtener materiales con áreas BET en torno a 45 m²/g, lo que conduce a un aumento sustancial de la capacidad de adsorción. Por gasificación parcial con aire de los materiales pirolizados se alcanzaron áreas BET próximas a 340 m²/g, pero con capacidades de adsorción de 4-CF similares a las obtenidas con los carbonizados.

El contenido de cenizas del precursor limita el desarrollo de porosidad por activación física, ya que la gasificación parcial con CO₂ o aire no afecta a la fracción inorgánica. Los materiales obtenidos por esta vía mostraron áreas BET de hasta 100 m²/g, mientras que la activación química con KOH permitió alcanzar valores por encima de 1800 m²/g. A pesar de estas notables diferencias, las capacidades de adsorción de 4-CF fueron muy similares, por lo que los materiales obtenidos por gasificación parcial con aire resultan especialmente atractivos, por ser éste método de preparación sencillo, económico y medioambientalmente aceptable.

En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías capaces de aumentar la capacidad de los sistemas de depuración por unidad de superficie construida. Entre las alternativas estudiadas para mantener elevadas concentraciones de biomasa en el reactor cabe destacar los sistemas que utilizan soportes para el crecimiento de biopelículas. El uso de soportes empaquetados o en suspensión que actúen al mismo tiempo como adsorbentes es una opción interesante para el tratamiento de aguas residuales que contengan contaminantes tóxicos. El adsorbente más ampliamente utilizado como soporte es el carbón activo. Sin embargo, su coste aconseja la búsqueda de materias residuales más económicos y ampliamente disponibles. En este sentido, los materiales carbonosos antes indicados, obtenidos a partir de lodos de depuradora resultan particularmente interesantes.

Se estudió el empleo del sistema SBR con biopelícula (SBBR) para el tratamiento de 4-CF, utilizando como soporte el material obtenido por pirólisis de biosólidos a 450 °C. Los resultados se compararon con los obtenidos en un SBBR con

un carbón activo comercial. La utilización de soportes adsorbentes disminuyó sensiblemente el periodo de aclimatación y puesta en marcha de los SBR, lo que permitió el tratamiento de una concentración de 4-CF tres veces superior a la tratable durante la puesta en marcha de SBR con biomasa floculenta, consiguiéndose aumentar la carga de 4-CF hasta 653 mg 4-CF/g SSV·d, alcanzando una concentración en el reactor de 170 mg/L. A pesar de que el 4-CF se degradó mayoritariamente durante la etapa aerobia, en ambos sistemas SBBR se detectó la eliminación de 4-CF en condiciones anóxicas, lo cual puede deberse al desarrollo de nichos anóxicos en el interior de los agregados. El espesor de la biopelícula formada sobre biosólidos pirolizados fue inferior a 150 μm , lo cual permite una mejor difusión de sustrato, nutrientes y oxígeno al interior de la misma, alcanzando elevadas velocidades específicas de degradación de 4-CF. El carbón activo favoreció la formación de agregados más compactos y de diámetros hasta 300 μm , lo que confirió al sistema una mayor resistencia al choque tóxico, posibilitando el tratamiento de elevadas concentraciones de 4-CF con altas eficacias de eliminación. La formación de estos agregados mejoró notablemente la sedimentabilidad del lodo, alcanzándose valores de IVF en torno a 30 y 120 mL/g para los sistemas SBBR con carbón activo y biosólidos pirolizados, lo que supone una sensible mejora de la sedimentabilidad de la biomasa floculenta, cuyos valores de IVF llegaban a 227 mL/g.

A lo largo de la experimentación, las capacidades de adsorción del carbón activo y del biosólido pirolizado disminuyeron un 90 y 39%, respectivamente, lo que indica una mejor regeneración del segundo. No obstante, la capacidad de adsorción de 4-CF del carbón activo resultó muy superior a la del biosólido pirolizado. Esto provoca un mayor déficit de sustrato en el medio, que favorece la velocidad de formación de la biopelícula. Tras un mes de operación, aproximadamente el 50 y 25% de las partículas de carbón activo y biosólidos pirolizados, respectivamente, estaban colonizadas y al cabo de dos meses de operación la colonización era prácticamente completa.

Uno de los métodos de intensificación de sistemas de fangos activos más prometedores es la bioaumentación con bacterias especializadas, entre las que destaca el género *Pseudomonas* por su versatilidad metabólica. En el presente trabajo se evaluó la capacidad degradativa de dos especies de *Pseudomonas* (*Comamonas testosteroni* y *Pseudomonas putida*) con vistas a su empleo en la bioaumentación de SBR. Durante los

ensayos previos con ambas especies se analizó el efecto de la temperatura, la aclimatación y el empleo de cosustratos en combinaciones binarias (4-CF/fenol y 4-CF/glucosa) y ternarias (4-CF/fenol/glucosa) sobre la eficacia de degradación de fenol y 4-CF, para lo cual se utilizaron cultivos en discontinuo con medios saturados en oxígeno, a 30 °C, 120 rpm y un pH próximo a la neutralidad.

C. testosteroni fue capaz de degradar fenol (80 - 240 mg/L) utilizando como única fuente de carbono y energía, siendo la velocidad media de degradación, a 30 °C, 20 - 36 mg/L·h, aproximadamente diez veces mayor que la obtenida a 15 °C (2 - 3,3 mg/L·h), con un menor tiempo de latencia, por lo que el resto de la experimentación se realizó a dicha temperatura. La velocidad específica media de degradación de 4-CF fue de $6,1 \pm 0,2$ µg 4-CF/g SSV·h, por lo que el empleo de *C. testosteroni* parece adecuado para el tratamiento de dicho compuesto en ausencia de otros sustratos. El empleo de fenol o glucosa como sustratos de crecimiento mejoró sensiblemente los rendimientos de eliminación de 4-CF, en mayor grado con fenol. Un aumento de la concentración de ambos cosustratos conduce a una mayor mineralización, con rendimientos de eliminación de COT, tratando 20 mg/L de 4-CF, en torno al 80 y 70% en presencia de fenol y glucosa, respectivamente.

Durante los experimentos de degradación de 4-CF con fenol o glucosa se observó que la degradación total o parcial del 4-CF depende de la relación de concentraciones 4-CF/biomasa (S/X) cuando cesa la degradación de fenol. Para valores de $S/X \leq 0,11$ el 4-CF se degrada completamente, mientras que para $S/X \geq 0,31$ es sólo parcialmente degradado. Finalmente, los resultados obtenidos en medios multisustrato compuestos por 4-CF, fenol y glucosa mostraron un aumento de la eficacia de eliminación de 4-CF y COT, alcanzándose velocidades tres veces superiores a las observadas en presencia de dichos cosustratos individualmente.

La influencia de la temperatura en la degradación de fenol mediante *P. putida* fue similar a la observada para *C. testosteroni*. Sin embargo, el rendimiento de degradación, la velocidad de eliminación y la concentración máxima degradable fueron mayores con *P. putida*. El descenso de la temperatura de 30 a 15 °C disminuyó la eficacia de eliminación de fenol del 100 al 40% durante el tratamiento cometabólico de fenol (185 mg/L) y 4-CF (25 mg/L), lo que provocó una drástica disminución de la eficacia de degradación de 4-CF, llegando a ser despreciable a la temperatura más baja.

Este hecho se debe a que la degradación cometabólica de 4-CF depende en gran medida del consumo de fenol, mediante el cual aumenta la disponibilidad de la enzima monooxigenasa, necesaria para la degradación de 4-CF. La pobre biodegradabilidad del 4-CF, sin cosustratos, con *P. putida* redujo la velocidad específica inicial de consumo hasta 21 ± 13 ng 4-CF/mg SSV·h. El empleo de cosustratos (ciclohexanol, fenol o glucosa) condujo a una mejora de dicha velocidad de degradación, obteniéndose los mayores rendimientos de eliminación cometabólica de 4-CF y COT con glucosa y fenol como sustratos de crecimiento. La estructura química similar de fenol y 4-CF determina una semejanza de los sistemas oxidativos implicados en su degradación, obteniéndose menores velocidades iniciales de consumo de 4-CF al aumentar la concentración de fenol, como resultado de la inhibición competitiva entre ambos. Al tratarse de un consumo diáuxico, una vez el fenol es prácticamente degradado la velocidad de degradación de 4-CF aumenta notablemente, obteniéndose velocidades medias de degradación de 4-CF de 1,8 mg 4-CF/mg SSV·h. Por otro lado, la adición de glucosa redujo la etapa de latencia, alcanzando velocidades específicas iniciales de degradación de 4-CF diez veces mayores que con fenol, similares para ambos cosustratos.

Al igual que con *C. testosteroni*, la degradación total o parcial de 4-CF con *P. putida* pudo determinarse mediante la relación de concentraciones de 4-CF y biomasa cuando se agota el cosustrato (4-CF/biomasa o S/X). Empleando fenol como cosustrato la degradación total de 4-CF se obtuvo para valores de S/X menores de 0,45, mientras que por encima de dicho valor el 4-CF fue sólo parcialmente degradado. En el caso de la glucosa la relación se calculó considerando que el cese de crecimiento celular coincide con el punto de agotamiento del cosustrato. La degradación completa de 4-CF se obtuvo para valores de $S/X \leq 0,19$, mientras que para valores de $S/X \geq 0,65$ la degradación de 4-CF fue sólo parcial.

Debido a los mejores resultados obtenidos con *P. putida* se seleccionó dicha cepa para llevar a cabo los experimentos de bioaumentación. Los ensayos previos para evaluar la influencia de la aclimatación y la bioaumentación sobre la puesta en marcha de SBR mostraron que el empleo de lodos activos o *P. putida* no adaptados conduce a una eficacia de eliminación de fenol y 4-CF inferior al 35%, tratando 80 y 50 mg/L, respectivamente. Sin embargo, la aclimatación previa a dichos compuestos condujo a un aumento significativo de la velocidad de degradación. La bioaumentación con *P. putida*

no aclimatada no mejoró los rendimientos del lodo activo aclimatado, siendo necesario el empleo de cepa adaptada a fenol y/o 4-CF para la bioaumentación de reactores biológicos, consiguiéndose así, la eliminación completa de ambos compuestos en torno a 8 h.

Los experimentos de bioaumentación de SBR para el tratamiento de 4-CF en presencia y ausencia de fenol se llevaron a cabo empleando ciclos de 12 h, con 1 h de llenado anóxico, 9,5 h en aerobiosis, 1 h de sedimentación y 0,5 h de vaciado, manteniendo un t_{HR} de 10,5 d. Los ensayos se realizaron a 30 °C, 120 rpm y pH próximo a la neutralidad.

Mediante la bioaumentación del lodo biológico con *P. putida* se consiguieron altas velocidades de degradación, tanto de fenol, como de 4-CF, pudiéndose tratar una carga de 4-CF de hasta 75 mg 4-CF/g SSV-d. Este hecho puede deberse a la alta supervivencia de la cepa y a la transferencia genética entre la misma y el resto del lodo biológicos, lo que podría dar lugar a transconjugados con una elevada capacidad degradativa. En el caso del SBR inoculado únicamente con *P. putida* no se observó degradación durante el llenado anóxico. Sin embargo, el fenol fue parcialmente degradado en condiciones anóxicas por el lodo biológico, cuyos rendimientos de eliminación disminuyeron del 24 al 5% al aumentar la concentración de 4-CF de 525 a 1.575 mg/L.

Inicialmente *P. putida* creció en suspensión unitariamente en forma de bacilos. Tras varios meses de operación se formaron agregados de tamaño entre 1,0 y 2,0 mm observándose una evolución de la forma celular de bacilos a cocos debido al stress químico por la presencia de 4-CF. La autoagregación de *P. putida* también se observó en el SBR bioaumentado, en el que se desarrollaron colonias esféricas. La colonización del lodo se inició con una adhesión mediante el contacto directo entre las superficies y, finalmente, la cepa se recubrió con exopolímeros celulares presentes en los flóculos del lodo biológico.

El tratamiento de 4-CF como única fuente de carbono y energía mediante *P. putida* en SBR condujo a la inactivación de la cepa. Las máximas cargas tratables en el SBR bioaumentado (150 mg 4-CF/g SSV-d) fueron notablemente superiores a las del SBR con lodo inactivo, en el que el tratamiento de cargas superiores a 70 mg 4-CF/g

SSV-d provocó una drástica caída de la eficacia del sistema y la completa desestabilización del mismo. Por lo tanto, puede concluirse que la adición de la cepa confiere al SBR una mayor resistencia a la toxicidad, gracias a que la cepa fue eficazmente retenida en el SBR por su capacidad de agregación e integración en los flóculos del fango activo. En ambos sistemas las velocidades iniciales de consumo de 4-CF son similares, no así, las velocidades de degradación al final del proceso, que fueron considerablemente mayores en el SBR bioaumentado, reduciéndose así el tiempo requerido para degradar completamente el 4-CF.

Control water pollution has reached primary importance regarding the environmental protection. The increasing amounts of wastes generated as a consequence of the intensification of industrial activities has become one of the most important environmental risks, because of the water scarcity and the intensive use of this source. Due to the fact that 90% of the hazardous wastes are dumped as aqueous off-streams, the prevention of water pollution has reached a relevant importance in the environmental policy of the European Community. The evolution of the wastewater treatment systems has led to the development of efficient technologies for specific pollutants removal, particularly pesticides, herbicides, phenolic and halogenated compounds and heavy metals. Within this group, chlorophenols are used in important industrial processes such as the manufacture of herbicides, dyes, phenolic resins, wood preservatives and plant growth regulator. The wastewaters resulted from these activities are characterized by fluctuating concentrations of chlorophenols. Among chlorophenols, 4-chlorophenol (4-CP) is also used in the manufacture of pharmaceutical products and denatured alcohols and as selective solvent for refined mineral oils.

Some industrial activities like the production of resins, nylon, fitosanitarios, pharmaceutical products, etc. produce wastewaters containing variable concentrations of phenolic (500 - 4000 mg/L) and chlorophenolic compounds (≤ 20 mg/L). The annual industrial production of chlorophenols was estimated at 200,000 tons in 1989. In 1999, 56,000 tons of waste phenol and 1900 tons of waste chlorophenols were generated by industries in the United States. The concern on the discharge of these compounds into the water reservoirs has led to a more stringent legislation. Chlorophenols are included in the lists of priority pollutants by the European Union (Directives 2006/11/CE and 98/83/EC) and the USEPA. Additionally, there are some specific regulations which give discharge limits for phenolic and chlorophenolic compounds like the Law 10/93 of the Comunidad de Madrid and the Royal Decrees 927/1988 and 1138/1990.

Traditionally, chlorophenols have been treated by a wide variety of physical and chemical methods. The most applied non-destructive techniques are adsorption with activated carbon, stripping and liquid-liquid extraction, which just transfer the pollutants from the aqueous phase to a different medium. The oxidation processes like wet oxidation, advanced oxidation, including those photo-assisted varieties, have different disadvantages like high operating pressure and temperature, high requirements

of chemicals and complex facilities are required, respectively. In spite of the fact that high dechlorination efficiencies are achieved by catalytic hydrodechlorination, its operating costs are high and further treatments are needed to mineralize the dechlorinated organic matter. Additionally, the treatment of high loads of the pollutants led to a fairly increase of the operating costs of these chemical processes, which in some cases produce undesirable final products with a higher toxicity than the starting compounds

Most of the chlorophenols are toxic and hardly biodegradable, which are not efficiently removed by conventional biological treatments. Nevertheless, the recently technologies developed based on the biological oxidation like UASB, EGSB, IC, SBR and MBR are considered emerging competitive processes to treat wastewaters containing this type of compounds. The intensification of these technologies to develop more stable and efficient advanced biological systems could be an attractive solution to treat phenols and chlorophenols bearing wastewaters.

Among the different biological treatments used for this type of wastewaters, the sequencing batch reactors (SBR) have been applied to treat numerous xenobiotic compounds because of the advantages of the system such as the reduction of the footprint, easy control of the process, nutrients removal, low energy requirements, etc. The versatility of the SBR allows to modify the operation and control strategies, which make it suitable for the treatment of fluctuating wastewaters. This technology has been applied for the treatment of different chlorophenols (4-CP, 2,4-dichlorophenol, 3-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol), analyzing the influence of the sequence, temperature and acclimation technique, as well as, the removal pathways of these compounds. However, the study of optimal operating conditions and intensification methods of the system, like the use of granular biomass, carriers, bioaugmentation or cometabolism have not been studied sufficiently.

In this work, the application of SBR for the removal of 4-CP from aqueous effluents has been studied. In addition, it has been evaluated the effect on the efficiency of the system of the following intensification methods: the use of cosubstrates for the cometabolic removal of 4-CP, granular biomass, new adsorptive carriers for the develop of biofilm and the bioaugmentation of activated sludge with specialist 4-CP degrading bacteria.

Firstly, a series of experiments were conducted to study the influence of the operating conditions (the use of cosubstrates, pH, inoculum concentration, nutrients requirements and the acclimation to phenol) on the 4-CP removal during the start-up of the biological reactors using discontinuous activated sludge systems. Different cosubstrates were evaluated, which can appear in 4-CP bearing effluents because of their generation during the treatment of 4-CP by chemical oxidation or reduction methods (cyclohexanol, catechol and phenol). On the other hand, the influence of the addition of glucose was studied, since the use of readily biodegradable biogenic compounds has been reported as a promising method for the xenobiotics removal. Due to the low biodegradability of 4-CP, the efficiencies obtained when treating 80 mg/L of 4-CP were lower than 40% after 48 h. These efficiencies increased up to 80% adding cyclohexanol, phenol or glucose at low concentrations ($COD_{4-CP}:COD_{cosubstrate} = 1:0.25$). The addition of catechol did not enhance the efficiency obtained treating 4-CP without cosubstrates. For the rest of the cosubstrates, the increase of their concentrations greatly enhanced the 4-CP degradation but reducing its mineralization. The type of cosubstrate used exert a significant influence on the 4-CP removal rate, obtaining average removal rates between 0.28 and 0.14 mg 4-CP/g VSS·h using phenol and catechol, respectively. The kinetic analysis of the results obtained using phenol as cosubstrate indicated that both the 4-CP and TOC removal rates increased at increasing cosubstrate concentrations, detecting a competitive inhibition during the cometabolic 4-CP degradation in presence of phenol. Usually, this type of inhibition occurs during the treatment of toxic or recalcitrant substrates, which disappears when the inhibitory compound is depleted.

The acclimation of biomass to the presence of phenol greatly increased the 4-CP removal efficiency, regardless the 4-CP concentration treated and the presence or absence of cosubstrates, reaching specific removal rates of two orders of magnitude higher than obtained using non-adapted sludge. The use of acclimated biomass enables the complete removal of 4-CP at pH values between 3.5 and 10.5. However, the highest removal rates were obtained at neutral or slightly basic pH because of the buffer capacity shown by the microorganisms at basic pH conditions.

Once the main operating conditions were evaluated, the 4-CP removal by SBR was studied. These systems operated at temperatures between 20 and 35 °C and a HRT

of 10.5 d. The experiments were conducted in a series of stages in sequences of 12 h as follows: anoxic filling (1 h), aerated reaction (9.5 h), settling (1 h) and draw (0.5 h). The synthetic wastewaters fed maintained a phenol feed concentration of 525 mg/L (for the cometabolic degradation assays) and 4-CP concentration was gradually increased from 105 to 2,100 mg/L. A Nitrogen, Phosphorous and other micronutrients needed to carry out the biological degradation efficiently were also added. A COD:N:P:micronutrients ratio of 100:0.5:0.1:0.05 (w:w) was fixed.

The accumulation of the intermediates from the *meta* cleavage pathway of 4-CP in aerobic conditions was observed during the start-up of the SBR. After a 60-days acclimation period, such compounds disappeared. The results indicated that phenol and 4-CP are efficiently removed following a diauxic consumption model at temperatures between 20 and 35 °C treating a wide interval of concentrations (525 mg/L of phenol and 105 - 1,470 mg/L of 4-CP, respectively). The phenol and 4-CP removal rates increased significantly when the temperature was increased from 20 to 35 °C, being three times higher in the case of 4-CP. Similarly, the increase of the temperature allowed to increase the treatable 4-CP load rate up to 80 mg 4-CP/g VSS·d, enhancing the sludge settleability and reducing the toxicity of the resulting effluents. For this reasons, the rest of the experiments were carried out at 35 °C. The phenol uptake under anoxic conditions was observed for low 4-CP concentrations. However, the 4-CP degradation was only possible during the aerobic reaction phase. The respirometric analysis showed that 4-CC is the major intermediate of the cometabolic 4-CP removal in presence of phenol.

After the study of the 4-CP cometabolic removal in presence of phenol, the degradation of 4-CP as sole carbon and energy source was studied. 4-CC was not detected during this experiment, which indicates that such intermediate was removed much faster in absence of cosubstrate. The concentration of 4-CP reached in the reactor had a great influence on the efficiency of the process owing to the increase of toxicity at increasing concentrations of the toxic compound. Due to this fact, the highest 4-CP load treatable was 21 mg 4-CP/g VSS·d. The increase of the inlet flow from 0.1 to 0.75 L/h increased the volume exchanged, reducing the refractory TOC concentration from 50 to 7 mg/L. No significant changes were observed in the external aspect of the mixed liquor for the different inlet flows tested, observing irregular shaped, compact and firm

floccules with sizes between 60 and 100 μm , with a moderate density of filamentous organisms and a good settleability ($\text{SVI} < 150 \text{ mL/g}$).

The partially granular biomass developed in the SBR when the superficial air upflow velocity was increased up to 0.5 cm/s showed an heterogeneous size between 100 μm and 2 mm, irregular shapes, smooth edges, brownish, compact, firm and high settleability ($\text{SVI} \approx 43,5 \text{ mL/g}$) aggregates. These granules built associations by means of parallel fibres of 2 - 5 μm distributed in multilayers. This biomass showed a high stability towards the toxic shock provoked by 4-CP, which allowed to increase the 4-CP load rate up to 584 mg 4-CP/g VSS·d, reaching a concentration in the reactor of 160 mg/L. This concentration was much higher than the treatable with flocculent biomass, either without cosubstrate (70 mg/L) or in presence of phenol (100 mg/L). The extension of the mineralization obtained by the system with partially granular biomass was higher than that reached with flocculent biomass.

In this work, different materials have been characterized and prepared using sewage-sludge as precursor by using different methods (drying, pyrolysis, activation with KOH, CO_2 and air). These materials were prepared in a discontinuous vertical furnace at several temperatures and holding times. The resulting materials were evaluated as adsorbents for the 4-CP removal in aqueous phase.

The maximum adsorption capacity for 4-CP varied for the materials tested between 82 and 362 mg 4-CP/g. The lowest adsorption capacities were obtained with dry biosolids, since it is a non-porous material with a high ash content. The materials obtained showed marked differences in their chemical and textural properties. The carbonization of the biosolids allowed to obtain materials with BET surface areas of about 44 m^2/g , which led to a significant increase of the adsorption capacity. Although the materials obtained by the gasification with air of the pyrolyzed materials showed BET areas of 340 m^2/g , the adsorption capacities for 4-CP were similar to those obtained with the carbonized materials.

The high ash content of the starting material (23%, dry base) limits the development of porosity on a total dry weight basis since the partial gasification occurring upon the so-called physical activation with CO_2 or air does not affect to the inorganic matter. While the materials obtained by this method showed BET area up to

100 m²/g, around twenty times higher surface area (1,832 m²/g) was achieved by chemical activation with KOH. Nevertheless, in spite of these dramatic differences fairly close capacities were found for 4-CP liquid-phase adsorption. Thus, air-activation can be viewed as a simple, economical and environmental friendly way of valorisation of dry sewage sludge to inexpensive activated carbon with high adsorption capacities.

In recent years, new technologies have been developed to increase the treatment efficiency reducing their footprint. One of the alternatives studied to retain high biomass concentrations inside biological reactors is the use of carriers for the fixed growth of biomass in biofilms. The use of packed or suspended carriers with adsorption capacity has been claimed as an attractive solution to treat toxic compounds bearing wastewaters, being activated carbon the most used adsorbent. However, due to the cost of activated carbons, more economic, practical and efficient adsorbents are needed. In this respect, sewage sludge is an interesting precursor to prepare carbonaceous materials since it is produced continuously, in substantial quantities, generating an unavoidable by-product of wastewater treatment with a difficult management.

Later on, the use of biofilm SBR systems (SBBR) to treat 4-CP adding pyrolyzed material obtained from biosolids at 450 °C under N₂ atmosphere was studied. The results were compared with a SBBR system with commercial activated carbon. The acclimation and start-up periods of the SBR were shortened when using carriers, which allowed to treat a 4-CP feed concentration three times higher than the treated during the start-up of the SBR with flocculent biomass. The maximum 4-CP load rate treatable by both SBBR was 653 mg 4-CP/g VSS-d, reaching a concentration inside the reactor of 170 mg/L. Although 4-CP was majorly degraded during the aerobic phase, a certain fraction of the 4-CP was removed during the anoxic filling phase in both SBBR. This fact can be related with the development of anoxic niches inside the granules. The biofilm developed in presence of pyrolyzed material showed diameters smaller than 150 μm, which facilitates the diffusion of substrate, nutrients and dissolved oxygen into the biofilm, reaching high specific 4-CP removal rates. The addition of activated carbon led to the formation of more compact and bigger aggregates ($\emptyset \leq 300 \mu\text{m}$), obtaining a more efficient and stable system under sever toxic conditions. The formation of these aggregates greatly enhanced the sludge settleability, reaching SVI values about 30 and 120 mL/g for the SBBR with activated carbon and pyrolyzed biosolids, respectively.

This technique solved the flocculent sludge separation problem detected at increasing 4-CP concentrations which showed SVI values up to 227 mL/g.

The adsorption capacity of the commercial activated carbon and the pyrolyzed biosolids decreased by 90 and 39%, respectively, during the experimentation. These results suggest that pyrolyzed biosolids have a higher regeneration capacity. Nevertheless, activated carbon showed a higher adsorption capacity for 4-CP than the pyrolyzed biosolids. Due to this fact the medium was run out of carbon and energy source, which favored the rapid formation of the biofilm. After one month of operation, 50 and 25% of the activated carbon and pyrolyzed biosolids were colonized, respectively, which indicates that the high adsorption capacity and adsorption rate showed by the activated carbon accelerated its formation. The complete colonization of the carriers was achieved after two months.

One of the most promising intensification methods of activated sludge systems is the bioaugmentation with specialist degrading bacteria. The genus *Pseudomonas*, among others, is especially relevant due to its high metabolic versatility. In this work, the removal capacity of two species of *Pseudomonas* (*Comamonas testosteroni* and *Pseudomonas putida*) was evaluated to be used for the bioaugmentation of SBR later on. Firstly, in order to enhance the removal capacity of 4-CP by both species, the effect of temperature, acclimation and the use of cosubstrates in binary mediums (4-CP/phenol and 4-CP/glucose) and a ternary medium (4-CP/phenol/glucose) was analyzed. These experiments were carried out in batch cultures using oxygen-saturated mediums at 30 °C, 120 rpm and neutral pH.

Phenol was efficiently removed by *C. testosteroni* as sole carbon and energy source treating a wide interval of concentrations (80 - 240 mg/L). The values for degradation rates of phenol at 30 °C (20 - 36 mg/L·h) are nearly ten times those obtained at 15 °C (2-3.3 mg/L·h) over the range of initial phenol concentration studied. An increase of the temperature leads to a dramatic reduction of the lag time and to a much sharper decay of phenol. Therefore, all other assays were carried out at 30°C. The specific 4-CP removal rate was $6.1 \pm 0.2 \mu\text{g 4-CP/g VSS}\cdot\text{h}$, which indicates that 4-CP cannot be treated in absence of other substrates by *C. testosteroni*. High efficiencies were obtained in all the experiments carried out in presence of both cosubstrates. Nevertheless, higher 4-CP removal efficiencies can be obtained in presence of phenol

than with glucose at the same initial concentrations. The increase of the concentration of both cosubstrates enhanced the mineralization, reaching TOC removal efficiencies about 80 and 70% treating 20 mg/L of 4-CP in presence of phenol and glucose, respectively.

The complete or partial biodegradation of 4-CP can be determined from the 4-CP/biomass (S/X) concentration ratio at the point where no further phenol removal is observed. In this work it was established that partial-removal was found for $S/X \geq 0.31$, while complete 4-CP removal was achieved at $S/X \leq 0.11$. Finally, the simultaneous addition of phenol and glucose greatly increases the 4-CP removal efficiencies, reaching 4-CP uptake rates three times higher than those obtained in presence of the mentioned cosubstrates separately.

The influence of temperature on the phenol removal by *P. putida* was similar than when using *C. testosteroni*. However, the removal efficiency, the uptake rate and the maximum treatable concentration of phenol were higher with *P. putida*. The decrease of the temperature from 30 to 15 °C led to a significant decrease of the phenol removal efficiency from 100 to 40% during the cometabolic treatment of phenol (185 mg/L) and 4-CP (25 mg/L), which provoked a dramatic decrease of the 4-CP removal efficiency, being negligible at 15 °C. The results obtained also showed that even though 4-CP is triggered by the phenol consumption since phenol supplies the electrons required for the initial monooxygenase step of 4-CP removal. The poor biodegradability of 4-CP by *P. putida* without cosubstrates conducted to low specific initial uptake rates of 21 ± 13 ng 4-CP/mg VSS·h. This consumption rate was increased when cosubstrates (cyclohexanol, phenol or glucose) were added. The addition of glucose or phenol as growth substrates reported the best efficiencies for the cometabolic 4-CP and TOC removal. Specific initial 4-CP removal rates clearly decreased when phenol concentration was increased. This fact suggests the occurrence of competitive inhibition phenomena owing to the similar chemical structure of phenol and 4-CP since the oxidative systems involved in their degradation are similar. It was found that during the diauxic removal of phenol and 4-CP, the latter was transformed rapidly only after phenol was almost fully depleted, reaching average removal rates for 4-CP of 1.8 mg 4-CP/mg VSS·h. On the other hand, no lag phase in 4-CP biodegradation took place in any case when glucose was added, which allowed to obtain specific initial 4-CP

removal rates ten times higher the reported with phenol. However, similar average 4-CP uptake rates were obtained with both cosubstrates.

With regard to the partial or total degradation of 4-CP during its cometabolic degradation by *P. putida*, a similar behavior than previously reported for *C. testosteroni* was observed. When phenol was added as cosubstrate the total or partial removal was found for S/X values below and above 0.45, respectively. Taking into account that biomass is triggered related to the cosubstrate consumption, S/X ratios were calculated at the cosubstrate exhaustion point for the cometabolic degradation of 4-CP with glucose. While complete degradation of 4-CP was obtained for $S/X \leq 0.19$, partial-removal was found for $S/X \geq 0.65$.

Taking into account that better results were obtained with *P. putida*, this strain was selected to carry out the bioaugmentation experiments. Preliminarily, the influence of the acclimation and bioaugmentation on the start-up of discontinuous reactors was studied. The results showed that a maximum removal efficiency of 35% can be achieved by non-adapted mixed liquor or *P. putida* when treating 80 and 50 mg/L of 4-CP, respectively. However, the removal rate was greatly increased after their acclimation to the simultaneous presence of phenol and 4-CP. The bioaugmentation with non-adapted *P. putida* did not enhance the efficiencies obtained by acclimated mixed liquor. Which indicates that the bioaugmentation of well-adapted biological reactors have to be addressed with an adapted strain with phenol and/or 4-CP bearing mediums, obtaining the complete removal of both compounds in 8 h.

The study about the 4-CP treatment with and without phenol was carried out in thermostatic SBR using sequences of 12 h, including the following phases: anoxic filling (1 h), aerobic reaction (9.5 h), settling (1 h) and drawing (0.5 h). The reactors were operated at a constant HRT of 10.5 h, 30 °C, 120 rpm and neutral pH.

The bioaugmentation of the mixed liquor with *P. putida* allowed to obtain high removal rates for both phenol and 4-CP. This system showed a high stability even at high toxicity values, reaching a 4-CP load rate of 75 mg 4-CP/g VSS·d. This fact could be related with the high survival of the strain and a possible genetic transference with the microorganisms contained in the activated sludge. Both compounds were removed exclusively during the aerobic reaction phase in the SBR inoculated with *P. putida*

solely. However, a partial degradation of phenol during the anoxic filling phase was obtained when using mixed liquor as inoculum, which efficiency decreased from 24 to 5% when 4-CP feed concentration was increased from 525 to 1,575 mg/L.

The presence of 4-CP in the medium caused the aggregation of free living bacteria of *P. putida* generating aggregates between 1.0 and 2.0 mm after some months. The toxic shock of 4-CP provoked the variation of the cell morphology from bacillus to coccus, which led to spherical colonies in the bioaugmented SBR. The autoaggregation capacity was also observed in the bioaugmented SBR, in which spherical colonies were observed. The initialisation of the colonization process started with a reversible adhesion between *P. putida* and the mixed liquor by means of long distance forces, then irreversible adhesion occurred when both surfaces contacted. Finally, the strain was covered with exopolysaccharides presented in the flocs of the mixed liquor.

The treatment of 4-CP as sole carbon and energy source by *P. putida* in the SBR led to the inactivation of the strain, which caused the destabilization of the system. The highest 4-CP load treatable by the bioaugmented SBR (150 mg 4-CP/g VSS·d) was much higher than that reached in the SBR inoculated with mixed liquor since higher loads than 70 mg 4-CP/g VSS·d caused a dramatic decrease of the efficiency. It can be concluded that the bioaugmentation of SBR enhances the capacity of this system to withstand high toxic shocks. In part, this fact is due to the abovementioned autoaggregation capacity and the inclusion of the strain inside the flocs of the activated sludge. Although, bioaugmented and non-bioaugmented SBR showed similar values of specific initial 4-CP removal rates, the former reported higher average uptake rates which reduced the minimum time required to achieve the depletion of 4-CP.

I. INTRODUCCIÓN

El hombre construyó alcantarillados y emisarios para enviar “lejos” sus desechos líquidos, levantó chimeneas para mandar “lejos” sus desechos gaseosos y basureros para ocultar sus desechos sólidos “lejos”.

Finalmente llegó el momento en que ya no hay más “lejos”.

El incremento demográfico y la creciente industrialización han acentuado la preocupación social por la calidad medioambiental a lo largo de la segunda mitad del siglo XX. La creciente actividad industrial lleva inexorablemente asociado un incremento en el volumen de residuos, si bien, en los últimos años se han introducido mejoras en los procesos de producción encaminadas a su reducción o reutilización. Estos residuos, de no tratarse adecuadamente, terminan contaminando el entorno, afectando a la calidad del aire, de las aguas y del suelo, lo que supone un notable riesgo para la salud humana y el medioambiente. Las aguas constituyen uno de los compartimentos ambientales más comprometidos, debido a su relativa escasez y su uso intensivo, especialmente en las últimas décadas.

1.1. Aguas Residuales Industriales

Tradicionalmente las corrientes de agua han sido utilizadas por el hombre como lugar idóneo para eliminar los desechos de distintas actividades. El perjuicio que esto ocasiona se pone de manifiesto a partir de la segunda mitad del siglo XIX, cuando el problema de la contaminación empieza a hacerse notar de una manera generalizada, debido al desarrollo experimentado por la población mundial, a la creciente proliferación de concentraciones humanas y a la expansión de la industria.

La contaminación de las aguas deriva esencialmente del vertido de efluentes domésticos e industriales, que configuran los dos grandes campos en el ámbito de las aguas residuales. Por un lado, las aguas residuales urbanas se definen como las aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial. A su vez, por aguas residuales domésticas se entienden las aguas residuales procedentes de áreas residenciales y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades del hogar (Real Decreto-Ley 11/1995).

Por su parte, las aguas residuales industriales engloban todas las procedentes de instalaciones empleadas para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial (Real Decreto-Ley 11/1995).

Estos dos tipos de aguas presentan características distintas. Mientras que la composición de las aguas residuales urbanas no varían sustancialmente de unas poblaciones a otras, las aguas residuales industriales presentan características muy diversas, dependiendo de las operaciones y procesos que las generen.

La cantidad de agua que precisan las industrias es muy variable, dependiendo en gran medida del proceso de producción que se lleve a cabo. Así, se pueden diferenciar industrias como la química, la de refino de petróleo o la conservera, que son grandes consumidoras de agua, de otras, como las dedicadas a productos de alta tecnología, cuyas necesidades son, en general, sensiblemente menores. El grado y el tipo de contaminación son, por tanto, función de la actividad industrial desarrollada y de los procesos empleados. La complejidad de las aguas residuales industriales dificulta su clasificación, ya que existen tantas como procesos diferentes. No obstante, una posible clasificación puede variarse en la tipología de los contaminantes, según:

- Efluentes con alta DBO y que no contienen agentes tóxicos, como los procedentes de las industrias agroalimentarias, curtidos y destilerías, entre otros.
- Aguas con altas DBO y toxicidad, como las de fabricación de pastas celulósicas, refinerías de petróleo, alpechines, vinazas, etc.
- Aguas con baja DBO y alta toxicidad, típicas, por ejemplo en la industria química, farmacéutica, metalúrgica y minería.
- Vertidos térmicos, como los de acerías y plantas energéticas.

La heterogeneidad de las aguas residuales industriales se traduce en una diversidad de tratamientos para su depuración. La selección del método más adecuado se realiza teniendo en cuenta tanto las características específicas de los efluentes, como los requerimientos de depuración, sometidos, en todo caso al análisis de costes, resultante de las características técnicas, las disponibilidades de espacio, necesidades de personal y mantenimiento y condiciones de operación.

A diferencia de las aguas urbanas, en las que una mayoría de los compuestos orgánicos son biodegradables, y en las que la diversidad de residuos no hace necesaria la adición de nutrientes, el tratamiento de las aguas industriales puede ser complejo si

contienen compuestos difíciles de degradar mediante procesos biológicos (compuestos recalcitrantes, refractarios o incluso tóxicos para los microorganismos) o cuya degradación biológica se produce tan lentamente que convierte en ineficaces a este tipo de sistemas (compuestos persistentes). Por lo tanto, son muchos los casos en los que se requieren tratamientos más específicos y avanzados.

En la actualidad se plantea la necesidad de desarrollar procesos eficientes que combinen una alta eficacia de tratamiento con bajos costes de construcción, operación y mantenimiento. En el tratamiento de efluentes industriales con cargas moderadas-altas de contaminantes a costes razonables normalmente se requiere la combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. Los sistemas de filtración, adsorción y coagulación son adecuados en el tratamiento preliminar para la eliminación de sólidos, color, olor, y cierta clase de compuestos, reduciendo de este modo la carga contaminante inicial (Agalias *et al.*, 2007; El-Shafey *et al.*, 2005). En muchos casos la aplicación de la tecnología biológica anaerobia combinada con diferentes opciones aerobias como unidad complementaria, ofrece una alternativa interesante por obtenerse efluentes de buena calidad con menores costes que los asociados a los procesos aerobios convencionales (Torres, 2001). No obstante, los efluentes resultantes de dichos procesos no suelen cumplir los límites de vertido, requiriendo el empleo de métodos de oxidación química y/o biológica (Mavros *et al.*, 2008).

La reutilización del agua se configura como una alternativa dirigida a disminuir la presión sobre los recursos hídricos, al tiempo que proporciona un mejor uso del agua previamente tratada cuyos requisitos de calidad dependen de los usos previstos (Real Decreto 1620/2007). En este contexto, los tratamientos terciarios de purificación y/o desinfección, además de las nuevas generaciones de reactores biológicos híbridos adquieren una especial relevancia.

1.2. Depuración de Aguas Contaminadas con Fenoles y Clorofenoles

Al amparo de los avances científicos, los tratamientos de aguas residuales han ido incorporando una atención creciente a la eliminación de una serie de contaminantes específicos, entre los que destacan pesticidas, compuestos fenólicos, derivados halogenados y metales pesados, desarrollando tecnologías capaces de eliminarlos.

A pesar de su elevada toxicidad, diferentes industrias han empleado numerosos compuestos orgánicos clorados, entre los que cabe mencionar a los policlorobifenilos (PCBs), que se han utilizado ampliamente debido a sus singulares características (aislantes eléctricos, estabilidad térmica, resistencia a ácidos y a bases, resistencia al fuego, etc.), por lo que se emplean en transformadores, condensadores, intercambiadores de calor y preparación de refrigerantes y aceites lubricantes.

Los clorofenoles son probablemente, junto con los fenoles, los contaminantes orgánicos más importantes presentes en aguas de origen industrial. Cinco de los cuales (2-clorofenol; 2,4-diclorofenol; 2,4,6-triclorofenol; 2,4,5-triclorofenol; 2,3,4,6-tetraclorofenol) aparecen como contaminantes prioritarios en la USEPA (Yuan y Keane, 2003) y habitualmente, se presentan en aguas residuales de industrias tales como refinerías, petroquímicas, fabricación de adhesivos y fitosanitarios, coquerías, papeleras, farmacéuticas, síntesis de resinas, nylon, plásticos, antioxidantes, aditivos para lubricantes, colorantes y desinfectantes, entre otras. Generalmente, se encuentran en concentraciones inferiores a 0,5 g/L y en la mayoría de los casos presentan una alta toxicidad.

El más utilizado es el pentaclorofenol, que actualmente está registrado en Estados Unidos únicamente como plaguicida de uso restringido para la conservación de la madera. Sin embargo, sus usos han sido muy diversos, empleándose como herbicida, alguicida, defoliante, conservador de madera, germicida, fungicida y molusquicida (Benítez *et al.*, 2003). Aunque en la actualidad el empleo de cloro como blanqueante no está permitido (Ley 16/2002, IPPC), durante años el blanqueo se ha realizado vía cloración de la lignina residual en las pastas químicas, proceso en el que se forman una amplia variedad de compuestos clorofenólicos, los cuales pueden provocar una contaminación importante de las aguas (Torrades *et al.*, 2003). Los clorofenoles con menor contenido en cloro, 2,4-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol se han empleado como pesticidas y herbicidas. Entre los monoclorofenoles destaca el 4-clorofenol (4-CF) debido a su utilización en la síntesis de productos farmacéuticos, desnaturizante de alcoholes y disolvente selectivo para preparar aceites minerales de refino. Dicho compuesto se ha detectado en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales en Europa y en las aguas procedentes de

plantas de generación de energía como resultado de la desinfección por cloración (WHO, 1989).

Unido al gran interés que la eliminación de compuestos organoclorados de las aguas residuales ha suscitado durante los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de tratamientos. Se pueden distinguir dos vías de eliminación: los tratamientos no destructivos, que permiten la recuperación de los compuestos, y los destructivos, en los que los compuestos son transformados. La Tabla 1.1 muestra la amplia variedad de procesos aplicables al tratamiento de organoclorados. En ella se incluyen sistemas con diferente grado de aplicabilidad, efectividad y coste.

Tabla 1.1. Técnicas de tratamiento de compuestos organoclorados.

TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS	TÉCNICAS DESTRUCTIVAS
Adsorción:	Tratamientos térmicos
Carbón activo	Oxidación:
Arcillas	Oxidación húmeda
Resinas	Oxidación húmeda catalítica
Bioadsorbentes	Oxidación supercrítica
Extracción líquido - líquido	Oxidación avanzada
	Procesos no fotoquímicos
	Procesos fotoquímicos
	Reducción
	Tratamientos sonoquímicos
	Tratamientos electroquímicos
	Tratamientos biológicos:
	Anaerobios
	Anóxicos
	Aerobios

1.2.1. Tratamientos No Destructivos

Consisten en operaciones físicas de separación, en las cuales el contaminante es concentrado o aislado para proceder posteriormente a su recuperación o a su eliminación de manera eficaz. Las propiedades de los compuestos fenólicos y clorofenólicos, principalmente su estabilidad y solubilidad en medio acuoso, dificultan su degradación. Entre las técnicas no destructivas destacan la extracción con disolventes o la adsorción con carbón activo, que pueden llevarse a cabo con recuperación del adsorbato.

1.2.1.1 Adsorción

Debido a la elevada capacidad del carbón activo para adsorber compuestos orgánicos, éste ha sido ampliamente utilizado para la retención de fenoles y clorofenoles (Deshpande *et al.*, 1997; Varghese *et al.*, 2004; Namasivayan *et al.*, 2007; Derylo-Marczewska *et al.*, 2008). Este hecho está relacionado con sus propiedades físicas (elevada área superficial, volumen de poros y porosidad), además de la importancia que la química superficial tiene en la eliminación de dichos compuestos (Jung *et al.*, 2001). La elevada capacidad de adsorción de este material depende, en gran medida, del método de activación y de la naturaleza del precursor empleado.

Debido al coste del carbón activo, también se han empleado otros adsorbentes, tales como arcillas, zeolitas naturales y materiales silíceos. Además, en las dos últimas décadas se ha prestado atención a la preparación de materiales carbonosos obtenidos a partir de residuos industriales y agrícolas, como lodos de depuradora, turba, deshechos alimentarios, etc. Esta opción ofrece la ventaja de valorizar residuos que, tras un proceso de activación, muestran elevada capacidad de adsorción de compuestos fenólicos y clorofenólicos (Ahmaruzzaman, 2008; Smith *et al.*, 2009).

El principal inconveniente de la adsorción es la transferencia de los compuestos tóxicos al adsorbente, el cual queda convertido en un residuo, cuya adecuada gestión resulta necesaria. Cuando éste se regenera, los contaminantes retenidos pasan a otra fase, líquida o gaseosa, que es necesario tratar.

1.2.1.2 Extracción

La extracción de fenoles mediante disolventes constituye el método más económico y eficaz para la recuperación de los mismos cuando la concentración es elevada. En el caso de los compuestos fenólicos y clorofenólicos en disolución acuosa, Benedetti *et al.* (1987) emplearon un sistema de extracción líquido-líquido utilizando como solvente un ácido carboxílico. El principal inconveniente del empleo de esta tecnología es que las pérdidas de disolvente pueden ser significativas, creándose un problema de contaminación secundaria (Bravo *et al.*, 1998).

1.2.2. Tratamientos Destructivos

1.2.2.1 Tratamientos térmicos

La incineración es una técnica comercialmente implantada, pero que presenta dificultades en su ejecución (Xia *et al.*, 2003). La elevada estabilidad térmica de las corrientes residuales de organoclorados dificulta su combustión completa, ya que requiere alcanzar una temperatura mayor de 1700 K, con las consiguientes limitaciones técnico-económicas. Carpenter y Wilson (1988) reseñaron que en sistemas convencionales de incineración tiene lugar una destrucción incompleta, que da lugar a la aparición de una serie de productos altamente tóxicos, tales como PCDDs y PCDFs.

1.2.2.2 Tratamientos de oxidación

Los tratamientos de oxidación de organoclorados están basados en la mineralización de los compuestos hasta CO₂ y HCl (Felis *et al.*, 1999). Dentro de esta línea, cabe destacar la oxidación con oxígeno, oxidación húmeda y supercrítica y los procesos de oxidación avanzada (POA's).

i. Oxidación húmeda

Consiste en la oxidación de la materia orgánica en disolución acuosa por medio de una corriente de aire u oxígeno molecular, en un intervalo de presión de 5-200 atm y a temperaturas entre 150-350°C, lo que afecta a la economía del proceso (Centi *et al.*, 2000). Aunque la oxidación de la materia orgánica puede ser completa, debido a limitaciones económicas, generalmente la oxidación es parcial, dando lugar a productos

intermedios de reacción que deben eliminarse con un tratamiento posterior. Debido a su elevada eficacia, la oxidación húmeda ha sido ensayada en la eliminación de clorofenoles, destacando los trabajos realizados por Baillod *et al.* (1982), Keen y Baillod (1985), García-Molina *et al.* (2006, 2007) y Suárez Ojeda *et al.* (2008).

El empleo de catalizadores en el proceso permite operar en condiciones más suaves de presión y temperatura, reduciendo algunos de los inconvenientes más importantes. Qin *et al.* (2001) estudiaron la oxidación húmeda catalítica de 4-CF con distintos catalizadores, lo que permitió suavizar las condiciones de operación a 180 °C y 26 bars, con una conversión completa del compuesto. Recientemente, Chaliha *et al.* (2008) lograron conversiones superiores al 50% empleando metales de transición como catalizadores (Fe, Co y Ni), a 80 °C y 2 bar. Respecto al tratamiento de fenol, uno de los sistemas catalíticos más ampliamente estudiados es el de Fe o Cu soportados sobre CA (Santos *et al.*, 2002, 2004; Quintanilla *et al.*, 2006, 2007).

ii. Oxidación supercrítica

La oxidación supercrítica se lleva a cabo a presión y temperatura superiores a las del punto crítico del agua (221,2 bar y 374,4 °C). En estas condiciones el agua constituye un medio único de reacción y, tanto la solubilidad como la difusión del oxígeno y de los contaminantes orgánicos a tratar aumentan sustancialmente, siendo factible la oxidación completa de la mayoría de los compuestos orgánicos. Las principales desventajas de este sistema radican en las altas temperaturas y presiones requeridas, que conllevan altos costes de inversión y operación (Gloya y Li, 1995; Matatov-Meytal y Sheintuch, 1998; Qin *et al.*, 2001). Diversos trabajos han demostrado una alta eficacia para el tratamiento de clorofenoles mediante oxidación supercrítica (Li *et al.*, 1992; Savage *et al.*, 1994) y oxidación crítica catalítica (Lin y Wang, 2001). Sun *et al.* (2007) obtuvieron conversiones de 2-clorofenol del 80% en 10 s a 450 °C y 250 bar.

iii. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POA's) surgen como alternativa a los tratamientos convencionales cuando en el efluente existen compuestos tóxicos o refractarios a la biodegradación. Glaze y Kang (1989) definieron los POA's como aquellos tratamientos que promueven la generación de radicales hidroxilo en una

cantidad suficiente para la purificación del agua, en condiciones de presión y temperatura cercanas a las ambientales. Los radicales hidroxilo son poderosos oxidantes químicos ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$, 25°C) (Munter *et al.*, 2001), aunque no son selectivos en la oxidación (Ince y Apikyan, 2000).

Los POA's presentan ciertas características singulares respecto a otros métodos de eliminación de contaminantes, entre las que destacan las siguientes (Munter *et al.*, 2001):

- Se alcanza un alto grado de mineralización.
- Los productos de reacción son, en general, más biodegradables, por lo que se reduce la toxicidad del efluente.
- Son procesos poco selectivos, por lo que se pueden aplicar para la eliminación simultánea de un gran número de compuestos.
- Los radicales hidroxilo son altamente inestables debido a su elevada reactividad, por lo que deben ser generados *in situ* continuamente mediante reacciones químicas, fotoquímicas o electroquímicas.

El principal inconveniente que presentan estos procesos es el elevado coste de los agentes empleados, como ozono, H_2O_2 y luz ultravioleta, aunque en este último caso pueden reducirse empleando luz solar (Esplugas *et al.*, 2002). La integración de estos tratamientos con sistemas biológicos es una alternativa encaminada a aprovechar la eficacia de estos procesos reduciendo el coste de tratamiento (Andreozzi *et al.*, 1999). El objetivo de los POA's dentro de esta estrategia no es la mineralización completa sino la reducción o eliminación de la toxicidad. La oxidación de los compuestos orgánicos presentes en aguas residuales mediante POA's, generalmente conduce a la formación de productos orgánicos oxigenados, como ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, que son más fáciles de degradar por los microorganismos (Marco *et al.*, 1997).

La clasificación más extendida de los POA's distingue entre procesos fotoquímicos, en los que se emplea la radiación UV para la generación de radicales, y no fotoquímicos (Munter, 2001), como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Clasificación de los POA's.

<i>Procesos no fotoquímicos</i>	<i>Procesos fotoquímicos</i>
Ozonización en medio alcalino (O_3/HO^-)	Fotólisis con radiación ultravioleta
Ozonización con peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2)	UV/ H_2O_2
Proceso Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) y relacionados	UV/ O_3
Oxidación electroquímica	Foto-Fenton y relacionados
Radiólisis γ y tratamiento con haces de electrones	Fotocatálisis heterogénea
Plasma no térmico	
Descarga electrohidráulica-ultrasonido	

Proceso Fenton

Se basa en la generación de radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 y sales de Fe^{2+} . Este proceso se ha empleado para el tratamiento de 4-CF, logrando reducir notablemente la toxicidad del efluente e incrementando su biodegradabilidad (Chamarro *et al.*, 2001). En dicho estudio se comprobó que la extensión de la reacción depende de la concentración del H_2O_2 , mientras que la cinética del proceso es función de la concentración de Fe^{2+} .

Las principales ventajas de este proceso son su simplicidad en cuanto a instalación y operación, la eficacia del H_2O_2 y el bajo coste de las sales de Fe^{2+} . Por otro lado, presenta una serie de inconvenientes, como el pH de trabajo (en torno a 3,0), el elevado coste del H_2O_2 , y la contaminación derivada de la presencia de iones de hierro en el efluente final (Lücking *et al.*, 1998).

Para evitar el problema de la pérdida del hierro y la consecuente necesidad de separarlo del efluente, se han empleado catalizadores sólidos, que se han ensayado para el tratamiento de fenoles y clorofenoles (Lücking *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Pérez-Moya *et al.*, 2007). A pesar de que el tratamiento de fenoles y clorofenoles mediante Fenton heterogéneo es altamente efectivo (Lücking *et al.*, 1998), la lixiviación de la fase activa provoca la desactivación del catalizador, lo que ha

propiciado el desarrollo de diferentes soportes tales como el CA, las arcillas y la alúmina (Molina *et al.*, 2006; Zazo *et al.*, 2007, 2009).

Ozonización

A pesar del coste energético para su generación, las elevadas eficacias de eliminación de contaminantes han propiciado un creciente interés por el empleo del ozono en tratamientos de oxidación (Abe y Tanaka, 1996).

Los estudios sobre el tratamiento de 4-CF mediante este sistema han mostrado que el empleo de un pH básico acelera la cinética del proceso (Benítez *et al.*, 2000). Este hecho no se debe únicamente al aumento de la velocidad de generación de radicales, sino que además, el aumento de la concentración de iones clorofenolato hace que la reactividad sea mayor (Hoigné y Bader, 1983). No obstante, la ozonización no permitió mineralizar efluentes contaminados con 4-CF, generando una serie de compuestos refractarios al proceso (Trapido *et al.*, 1997).

Radiación ultravioleta

El empleo de radiación UV supone una tecnología efectiva para el tratamiento de efluentes con bajas concentraciones de clorofenoles. Generalmente la combinación de estos sistemas con H₂O₂ u O₃ reporta una mejora de los rendimientos obtenidos (Pera-Titus *et al.*, 2004). Sin embargo, en el tratamiento de 4-CF se observaron velocidades de eliminación de 4-CF similares con y sin adición de H₂O₂ (Benítez *et al.*, 2000).

Radiación UV/H₂O₂

En este proceso los radicales hidroxilo se generan por descomposición de la molécula de H₂O₂ mediante radiación luminosa ($\lambda \leq 400$ nm). Debido a que la fotólisis del H₂O₂ en las condiciones de operación es muy lenta, es necesario el empleo de altas concentraciones de H₂O₂ y tiempos largos de exposición a la radiación (Pera-Titus *et al.*, 2004). Entre los numerosos estudios recogidos en la literatura sobre el tratamiento de compuestos clorados destaca el de Trapido *et al.* (1997), en el que estudiaron el tratamiento de 4-CF mediante (UV/H₂O₂), concluyendo que esta técnica resulta efectiva operando con exceso de H₂O₂ (H₂O₂:4-CF, 100:1) en medio ácido.

Radiación UV/O₃

El proceso consiste en la generación *in situ* de H₂O₂ al irradiar con UV una solución saturada en O₃. Este método ha sido ampliamente estudiado en el campo del tratamiento de aguas clorofenólicas. Trapido *et al.* (1997) analizaron su aplicabilidad para el tratamiento de 4-CF, concluyendo que no aporta mejoras sustantivas en la cinética de eliminación respecto a la observada en la ozonización simple. Contrariamente, Benítez *et al.* (2000) observaron un aumento significativo de la constante cinética de degradación de dicho compuesto al emplear la combinación UV/O₃.

Foto-Fenton

El empleo de radiación UV permite mejorar la eficiencia del proceso Fenton. No se han encontrado diferencias significativas en la velocidad de degradación de monoclorofenoles mediante este método respecto a las obtenidas mediante sistemas UV o UV/H₂O₂, aunque en el caso de los compuestos policlorados la mejora fue significativa (Benítez *et al.*, 2000).

Fotocatálisis heterogénea

Este proceso catalítico se basa en el desarrollo de reacciones de oxidación-reducción para formar radicales libres en la superficie de un sólido semiconductor, al mismo tiempo excitado con la energía de la radiación a una determinada longitud de onda. Estudios recientes han mostrado que el 4-CF puede ser eficazmente eliminado mediante fotocatalisis heterogénea empleando TiO₂. Aunque el compuesto fue completamente eliminado, se detectó la presencia de compuestos orgánicos no clorados refractarios al tratamiento, principalmente aldehídos y ácidos carboxílicos (Satuf *et al.*, 2008).

1.2.2.3 Tratamientos reductores

La reducción química consiste en el empleo de un agente reductor, normalmente a presión y temperatura elevadas y en presencia de un catalizador. Esta técnica está ampliamente implantada en procesos industriales en los que, en la mayoría de los casos, se emplea hidrógeno como agente reductor, pudiéndose utilizar también otros, como

hidruros metálicos, ácido fórmico y sus sales, hidracina y alcóxidos. Los tratamientos reductores más empleados en la industria son la hidrogenación, hidrodesulfuración, hidrodesnitrificación, hidrodesoxigenación e hidrodeshalogenación. En general, estos procesos (a excepción de la hidrodecloración y en menor medida la hidrodesnitrificación) no se han aplicado en la eliminación de tóxicos en aguas. Este tipo de tratamientos no constituyen soluciones finalistas sino pasos previos de cara a un tratamiento biológico posterior.

La hidrodecloración consiste en la rotura del enlace carbono-cloro de una molécula orgánica clorada mediante hidrogenación, convirtiéndola en el correspondiente compuesto orgánico sin cloro, que se elimina al medio como HCl. Para ello se requiere un catalizador, siendo los más habituales los de metales nobles (Pd, Pt y Rh) soportados sobre carbón activo, alúmina o zeolitas. La hidrodecloración mediante catalizadores de Pd soportado sobre carbón activo se ha empleado para la eliminación de compuestos muy diversos (tetracloruro de carbono, cloroformo, tricloroetileno, triclorobenceno, etc.) (Kovenklioglu *et al.*, 1992). Se ha estudiado dicho tratamiento para la transformación de 4-CF en compuestos fácilmente biodegradables empleando condiciones suaves de presión y temperatura (1 atm y 30°C) (Calvo *et al.*, 2004, 2005, 2006; Díaz *et al.*, 2008).

1.2.2.4 Tratamientos sonoquímicos

Los tratamientos sonoquímicos emplean ondas ultrasónicas de alta potencia (20 – 2.000 kHz) y aprovechan la cavitación electrohidráulica para alcanzar elevadas temperaturas ($T > 800$ °C) y presiones locales muy altas ($P > 100$ bar) que, mediante la generación, por disociación de la molécula de agua, de radicales $\cdot\text{H}$ y $\cdot\text{OH}$, provocan la degradación de la materia orgánica. Nagata *et al.* (2000) estudiaron la degradación de varios clorofenoles utilizando esta técnica, tanto en atmósfera de aire como de argón. La eliminación de 4-CF mediante esta técnica se ve favorecida por el aumento de la concentración del tóxico y del tiempo de exposición (Hao *et al.*, 2004; Hamdaoui *et al.*, 2005; Nanzai *et al.*, 2008). Jiang *et al.* (2006) consiguieron la máxima eficacia de eliminación de 4-CF operando con una potencia de 30 W a una frecuencia de 200 kHz.

1.2.2.5 Tratamientos electroquímicos

Existen diversos trabajos sobre la eliminación de clorofenoles mediante tratamientos electroquímicos, en los que los radicales hidroxilo se generan mediante la aplicación de una corriente eléctrica sobre el efluente acuoso (Vinodgopal *et al.*, 1995; Brillas *et al.*, 1998; Azzam *et al.*, 2000; Martínez-Huitile y Brillas, 2009). Azzam *et al.* (2000) comprobaron que las mayores velocidades de eliminación de 4-CF, empleando un ánodo de titanio, se obtienen a pH superior a 12. En la combinación de tratamientos electroquímicos con reactivo Fenton (electro-Fenton) o fotoelectro-Fenton, Brillas *et al.* (1998) concluyeron que únicamente el segundo de ellos resulta eficiente para la mineralización de 4-CF.

1.2.3. Depuración Biológica de Aguas Contaminadas con Fenoles y Clorofenoles

Frente al coste de la mayoría de los tratamientos empleados para el tratamiento de compuestos fenólicos y clorofenólicos, los sistemas biológicos se presentan como una solución eficaz y relativamente económica. Una de las características de los procesos biológicos frente al resto de tratamientos es su versatilidad en el tratamiento de aguas residuales industriales, tanto por el caudal a tratar como por la concentración de materia orgánica que pueden soportar.

Aunque los tratamientos biológicos constituyen una vía efectiva para la eliminación de una amplia gama de contaminantes, sin embargo, en el caso de los clorofenoles el proceso de biodegradación es muy lento y no permite alcanzar un alto grado de eliminación si la concentración es elevada (Matatov-Meytal y Sheintuch, 1998). A pesar de que mono y diclorofenoles han sido tratados mediante sistemas biológicos anaerobios, en el caso del 4-CF esta vía se ha mostrado ineficaz (Takeuchi *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de su toxicidad, dicho compuesto se ha logrado eliminar eficazmente mediante sistemas aerobios (Chiavola *et al.*, 2003; Moreno y Buitrón, 2004; Buitrón *et al.*, 2005; Sahinkaya y Dilek, 2007).

El tratamiento biológico de compuestos fenólicos se ve dificultado por el efecto tóxico sobre la población microbiana (Yurii *et al.*, 1998). No obstante, la biodegradación puede mejorarse mediante una correcta estrategia de aclimatación

(Buitrón *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002), por la que se da una respuesta que finalmente permite a la comunidad microbiana eliminar el estrés o encontrar nuevas vías para mantener sus funciones (Rittmann y McCarty, 2001). Promoviendo transformaciones fisiológicas en el metabolismo microbiano, como cambios en los niveles, regulación y producción de enzimas y mutaciones, se selecciona y multiplica una población especializada (Wiggings *et al.*, 1987). Cuando la degradación es posible, la eliminación se desarrolla bajo uno de los siguientes mecanismos (Janssen *et al.*, 2001):

- Utilización del compuesto halogenado como sustrato susceptible de ser oxidado con oxígeno u otro aceptor de electrones.
- Metabolismo fermentativo en el cual un intermedio no halogenado se utiliza como aceptor de electrones.
- Empleo de un compuesto halogenado como aceptor de electrones con liberación de un haluro.
- Co-metabolismo y liberación de un haluro asociado a algún proceso metabólico.

La eliminación biológica de compuestos fenólicos y clorofenólicos supone un avance importante en lo que respecta a la solución de las emisiones de dichos compuestos, desarrollando sistemas biológicos como método de tratamiento único o en combinación con otras técnicas de tratamiento.

1.2.3.1 Sistemas anaerobios y aerobios

Los reactores anaerobios han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de clorofenoles, principalmente para la eliminación de policlorados. Sin embargo, la velocidad de degradación de monoclorofenoles en condiciones anaerobias es significativamente inferior a la observada para fenoles policlorados. Generalmente, la decloración de clorofenoles *orto*-clorados es más rápida que para el resto de monoclorofenoles, siendo el 4-CF el más difícilmente biodegradable en condiciones anaerobias (Takeuchi *et al.*, 2000). Existen estudios sobre la aplicabilidad de reactores anaerobios para el tratamiento de mono- y diclorofenoles en presencia (Woods *et al.*, 1989; Ning *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2001; Sponza and Ulukoy, 2005) y ausencia (Krumme y Boyd, 1988) de fuentes de carbono adicionales. Habitualmente, la

degradación anaerobia de clorofenoles tiene lugar bajo condiciones metanogénicas (Puyol *et al.*, 2009a), aunque también se ha evaluado su biodegradabilidad en condiciones desnitrificantes (Melin *et al.*, 1993; Bae *et al.*, 2002).

El reactor anaerobio más ampliamente utilizado para el tratamiento de clorofenoles es el de manto de lodos con flujo ascendente (en inglés, upflow anaerobic sludge blanket, UASB). En estos sistemas se han empleado diferentes fuentes de dadores de electrones para conseguir la dechloración reductiva (Hendriksen *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993; Tartakovsky *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2004; Lanthier *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2006; Puyol *et al.*, 2009b). No obstante, también se han utilizado otros sistemas, como los reactores granulares de manto expandido con filtro anaerobio (en inglés, expanded granular sludge blanket, EGSB) (Collins *et al.*, 2005), de lecho fijo (Bali y Sengül, 2003; Bajaj *et al.*, 2008; Puyol *et al.*, 2009b) y digestores anaerobios convencionales (Takeuchi *et al.*, 2000).

Debido a que los microorganismos aerobios crecen a una mayor velocidad que los anaerobios, la degradación de compuestos tóxicos es más efectiva en condiciones aerobias. Además, mientras que los microorganismos anaerobios transforman los tóxicos de partida en otros compuestos recalcitrantes, en muchos casos, los sistemas aerobios consiguen su mineralización (Kim *et al.*, 2002). En este sentido, el acoplamiento de sistemas anaerobios-aerobios puede constituir una configuración óptima para el tratamiento de fenoles policlorados.

A pesar de que los reactores biológicos aerobios convencionales de fangos activos se han aplicado al tratamiento de efluentes fenólicos y clorofenólicos (Edgehill y Finn 1983a; Moos *et al.*, 1983), los denominados sistemas biológicos avanzados han mostrado una mayor capacidad para la eliminación de dichos compuestos. En la Tabla 1.3 se resumen las cargas tratadas y las eficacias de eliminación de clorofenoles obtenidas empleando diferentes reactores aerobios. El empleo de superficies fijas o móviles como soportes para el desarrollo de biopelículas aumenta la capacidad para soportar el choque tóxico. Entre estos sistemas se incluyen los contactores biológicos, tanto parcialmente (Tokuz, 1991; Sameer *et al.*, 2002) como completamente sumergidos (Reynolds *et al.*, 1997), reactores de tubos perforados (Eker y Kargi, 2006), biofiltros discontinuos secuenciales (Buitrón y Ortiz, 1998), reactores discontinuos secuenciales de biopelícula (Lu y Chen, 1992; Shin *et al.*, 1999) y reactores de lecho empaquetado

(Kim *et al.*, 2002). Los materiales plásticos son los soportes más ampliamente utilizados en reactores a escala industrial. No obstante, el CA es el más empleado en estudios científicos sobre el tratamiento de fenoles y clorofenoles, ya que, además de soporte es un buen adsorbente de estos compuestos (Buitrón *et al.*, 2001; Perron y Welander, 2003). También se ha empleado la roca volcánica como soporte en sistemas biológicos de biopelícula para el tratamiento de compuestos fenólicos (Buitrón y Ortiz, 1998).

La contaminación de aguas subterráneas por compuestos clorofenólicos supone un problema singular en el que el tratamiento debe ser efectivo a bajas temperaturas. Para ello se han empleado reactores biológicos de lecho fluidizado (Valo *et al.*, 1990; Jarvinen *et al.*, 1994; Puhakka *et al.*, 1995b; Melin *et al.*, 1997, 1998a, b) y SBR (Schmidt *et al.*, 1999; Farabegoli *et al.*, 2008).

Tabla 1.3. Cargas aplicadas y eficacias obtenidas en el tratamiento de clorofenoles mediante reactores biológicos aerobios continuos (Adaptado de Field y Sierra-Álvarez, 2007).

Reactor	Clorofenoles	Carga volumétrica, (mg/L d)	Degradación (%)	Referencias
Inmovilizado con biopelícula	PCF	9,6	47,0	Karamanev y Samson (1998)
Con membranas	PCF	185	94,2 ^b	Visvanathan <i>et al.</i> (2005)
Lecho fluidizado	PCF	120	99,9	Melin <i>et al.</i> (1997)
Lecho fluidizado	PCF, TeCF y TCF	2130	80 (CFs)	Jarvinen <i>et al.</i> (1994) Melin <i>et al.</i> (1998a, b)
Lecho fluidizado	PCF, TeCF y TCF	1000	99,9	Puhakka <i>et al.</i> (1995)
Lecho fluidizado	4-CF	98,4	98	Galíndez-Mayer <i>et al.</i> (2008)
Lecho fluidizado nitrificante	2,4,6-TCF	21	82 ^b	Nevalainen <i>et al.</i> (1993)
Lecho empaquetado	2,4-DCF	85,5	97,8	Quan <i>et al.</i> (2004)
Lecho empaquetado	4-CF, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF	1454 ^a	75,2	Zilouei <i>et al.</i> (2006)
Lecho empaquetado y tanque agitado	4-CF y 2,4,6-TCF	48	99,9	Kim <i>et al.</i> (2002)
Air-lift percolador	PCF, TeCF y TCF	54	87,5 ^b	Langwaldt <i>et al.</i> (1998)
Fangos activos	4-CF	1344	11-99,9	Konya <i>et al.</i> (2007) Kagi <i>et al.</i> (2006) Kagi <i>et al.</i> (2007)
Fangos activos	PCF	40	99,5	Moos <i>et al.</i> (1983)
Fangos activos (bioaumentado)	PCF	100	97,5	Edgehill y Finn (1983a)

^aCalculado a partir de la máxima velocidad de crecimiento y la generación de biomasa, asumiendo una proporción SSV/SST del 87,5%.

^bPorcentaje de dechloración (basado en las medidas de cloro inorgánico).

La aplicabilidad a escala industrial de sistemas con cepas puras y métodos enzimáticos para el tratamiento de aguas contaminadas por clorofenoles es limitada

debido a las condiciones de trabajo requeridas, el reducido porcentaje de mineralización y la necesidad en muchos casos de emplear cosustratos. En los cultivos mixtos, sin embargo, las especies presentes en el fango biológico pueden interactuar entre sí, lo que permite la aparición de procesos simbióticos. Buitrón *et al.* (1998) mostraron como un cultivo mixto era capaz de degradar una mezcla de fenol y clorofenoles a una velocidad dos órdenes de magnitud superior a la que lo hacen las bacterias aisladas a partir del mismo lodo.

1.3. Reactores Discontinuos Secuenciales

1.3.1. Definición, Historia y Aplicaciones

El reactor secuencial de flujo discontinuo, en inglés Sequencing Batch Reactor (SBR), es un sistema de depuración biológica encuadrado como una modalidad de fangos activos. A diferencia de los sistemas de fangos activos convencionales, en los que se requieren distintos tanques en los que de forma simultánea y en continuo se realizan cada una de las etapas de tratamiento, en los SBR todas las operaciones (etapa anóxica, oxidación aerobia, sedimentación, etc.) se realizan en un solo tanque modificando las condiciones de operación (Mace y Mata-Álvarez, 2002).

Los SBR son sistemas conocidos desde hace décadas, ya que existen referencias de comienzos del siglo XX. A partir de la década de los 70 la tecnología SBR empezó a aplicarse esporádicamente en Canadá, Estados Unidos, Australia y algunos países de Europa. Los avances en los sistemas de control durante los 80 permitieron resolver la problemática de operación de estos procesos intermitentes, impulsando el resurgimiento de los sistemas discontinuos. La difusión de los resultados obtenidos con plantas a escala real, tanto en términos de rendimientos, como económicos demuestran que la tecnología SBR resulta competitiva frente a sistemas convencionales de tratamiento. Dicha tecnología ha experimentado un auge importante a nivel mundial en los últimos años, imponiéndose en el tratamiento de los vertidos de algunos sectores industriales, como el alimentario (Mace y Mata-Álvarez, 2002).

Frecuentemente, los caudales de entrada de aguas residuales en las plantas de tratamiento pueden variar en un amplio intervalo diario, por lo que el sistema de

tratamiento debe permitir modificar las condiciones de operación y tener una elevada adaptabilidad a caudales y variaciones de carga. Una de las ventajas del SBR es la posibilidad de actuar sobre la carga aplicada, lo que influye directamente sobre el metabolismo de las poblaciones bacterianas. Trabajando con bajas cargas, se favorece el fenómeno global de síntesis y consumo de compuestos almacenados, conduciendo a una menor generación de biomasa que la obtenida a altas cargas donde se favorece su replicación (Van Loosdrecht, 1997). Estas respuestas implican diferencias significativas entre el comportamiento de una operación en continuo o discontinuo.

A lo largo de estos años de desarrollo del sistema SBR han sido numerosas las experiencias en depuración de aguas de distinto origen y composición. Uno de los campos en los que la tecnología SBR se ha aplicado satisfactoriamente es el tratamiento de aguas residuales urbanas y efluentes del tratamiento de lodos en estaciones depuradoras de aguas residuales (Vandaele *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2005a). Sin embargo, el empleo de estos sistemas se ha consolidado en el tratamiento de aguas residuales industriales, principalmente de aquellas en que la variabilidad de los efluentes constituye un factor importante, como son los casos de la industria vinícola (Torrijos y Moletta, 1997), cervecera (Wang *et al.*, 2007a), lixiviados de vertedero (Klimiuk y Kulikowska, 2006), alimentaria (Belanger *et al.*, 1986; Subramanian *et al.*, 1994), ganadera (Tilche *et al.*, 2001), farmacéutica (Ileri *et al.*, 2003), de curtidos (Ganesh *et al.*, 2005) y papelera (Pokhrel y Viraraghavan, 2004). La tecnología SBR también se ha utilizado con diferentes grados de implantación, desarrollo o investigación en otras actividades, como centros de lavado de coches y de ocio, plantas químicas, industrias azucareras, aguas grises, industria petroquímica, biodegradación de compuestos químicos (BTX, TNT, clorofenoles, cresoles, etc.) (Mace y Mata-Álvarez, 2002). La aplicabilidad de los SBR en el tratamiento de efluentes difícilmente biodegradables demuestra la flexibilidad del sistema para tratar efluentes con caudales fluctuantes y composición heterogénea.

1.3.2. Descripción del Sistema

La tecnología SBR combina en un mismo tanque las operaciones de homogenización, aeración y sedimentación. El sistema consta de, al menos, cuatro etapas cíclicas bien definidas: llenado, reacción, decantación y vaciado (Fig. 3.1).

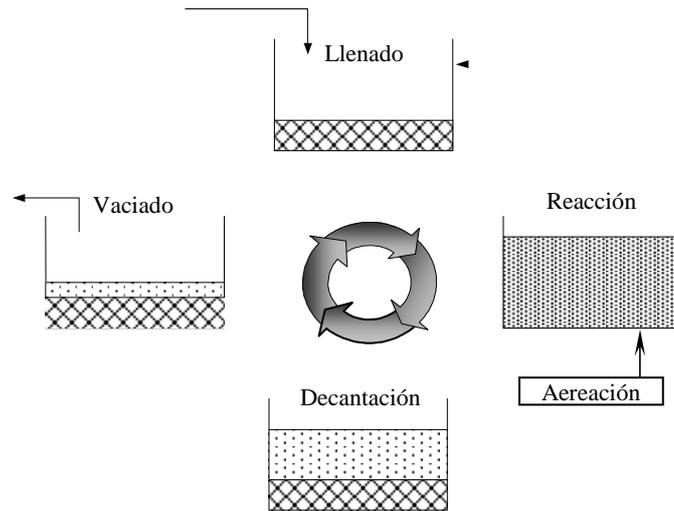


Fig. 3.1. Etapas generales del sistema SBR.

Dependiendo del tratamiento requerido para las aguas el llenado puede ser dinámico, si se produce durante el período de reacción, o estático, si se realiza en condiciones anóxicas. En algunos casos, el influente se alimenta en adiciones sucesivas a lo largo del ciclo. Para el tratamiento de fenoles se ha comprobado que el llenado estático mejora el proceso (Yu *et al.*, 1996). Durante la segunda etapa, o etapa de reacción, el agua residual se mezcla y aerea continuamente, favoreciendo el proceso de degradación biológica. En la siguiente etapa, de decantación, cesa la aereación y la agitación para permitir la sedimentación de los lodos. El agua tratada se retira del tanque mediante un sistema de extracción de sobrenadante superficial durante la etapa de vaciado. Eventualmente, se puede purgar el lodo generado para controlar el tiempo medio de residencia celular.

Los tiempos de retención empleados y las cargas aplicadas a este tipo de reactores oscilan dentro de intervalos amplios. Generalmente, un sistema SBR opera con un tiempo de retención hidráulico entre 1 y 10 d y un tiempo de residencia celular de 10 a 30 d. La concentración de sólidos en suspensión totales (SSTLM) se suele mantener entre 3,5 y 10 g/L. El control general del proceso puede llevarse a cabo automáticamente utilizando sensores o temporizadores, permitiendo la modificación de estos parámetros de manera dinámica.

A continuación se recogen algunas de las ventajas que los sistemas SBR presentan sobre otros más tradicionales y de uso más frecuente:

- Menor espacio requerido. Debido a la ausencia de decantadores primarios, balsas de homogenización, cámaras anóxicas y anaerobias y decantadores secundarios se ahorra espacio.
- Menor inversión. No sólo en obra civil, sino también en equipos, como bombas de recirculación, agitadores sistemas de recirculación de fangos, etc. (USEPA, 1999).
- Menor coste de mantenimiento. Debido a las bajas necesidades de reactivos, menor presencia de motores y partes móviles, facilidad de manejo y automatismo de la planta. Además, en un SBR los fangos tienen menor contenido de agua que en un sistema clásico, por lo que ocupan menos volumen. La menor utilización de reactivos mejora la aplicabilidad de los lodos generados como compost (Herrera, 2002).
- Proceso totalmente automatizado, lo que facilita el control del sistema.
- Alta flexibilidad. En un sistema SBR puede variarse el tiempo de retención hidráulico con la programación de los ciclos, adecuándose a variaciones de carga, caudal o cambios estacionales. Además, resulta sencilla su adaptación a normativas más severas, sin necesidad de cambios, ni nuevas implementaciones.
- Posibilidad de realizar un control previo del vertido antes de su descarga; ya que permite actuar sobre el ciclo.
- Menor escape de sólidos. En el reactor SBR la decantación se produce de forma estática, sin flujo ascendente de agua como en los sistemas en continuo.
- Buena sedimentabilidad del lodo. El llenado rápido produce un aumento de la carga másica, que favorece el crecimiento de bacterias formadoras de flóculos con buenas características de sedimentación. El llenado anóxico reduce la formación de bacterias filamentosas.
- Eliminación de nutrientes. Posibilidad de cumplir las normativas más exigentes en cuanto a la eliminación de nitrógeno y fósforo. En la misma balsa se pueden

conseguir condiciones anaerobias, anóxicas y aerobias, con rendimientos de eliminación superiores al 98% (Herrera, 2002).

- Exclusión de materias flotantes. La extracción del efluente por debajo del nivel de flotación evita el escape de materias flotantes o grasas.
- En muchas ocasiones se obtienen rendimientos más elevados que con otro tipo de tratamientos biológicos (Okada *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1998; Sahinkaya y Dilek, 2002).

Como desventaja, los sistemas SBR son técnicamente más sofisticados que los convencionales, especialmente para grandes plantas, requiriendo dispositivos de control más complejos, que precisan un mayor mantenimiento (Vargas *et al.*, 2000; Betancur *et al.*, 2004). Con el control general de la planta, tanto las eficiencias como la capacidad de carga del reactor se incrementan con respecto a modos de operación tradicionales, lo que frecuentemente se traduce en una mejora de la calidad de los efluentes a un coste más bajo.

1.3.3. Tratamiento de Aguas Conteniendo Fenoles y Clorofenoles mediante SBR

El sistema SBR se ha empleado con éxito en el tratamiento de una amplia gama de compuestos fenólicos y clorofenólicos. No obstante, debido a la elevada toxicidad que presentan los fenoles policlorados, su aplicación se ha estudiado más para monoclorofenoles (Tabla 1.4), habiéndose investigado la influencia de distintas variables operativas sobre el proceso de biodegradación de los mismos en este tipo de sistemas. El empleo de largos t_{HR} y tiempos medios de residencia celular (Θ) aumenta el consumo específico de dichos compuestos, consiguiendo mayores reducciones de la ecotoxicidad (Chiavola *et al.*, 2003; Nalbur y Alkan, 2007).

Es de especial interés el efecto que la presencia de cosustratos ejerce sobre la extensión y velocidad de la degradación de compuestos clorofenólicos, tanto por su naturaleza (Basu y Oleszkiewicz, 1995), como por su concentración (Nalbur y Alkan, 2007). Uno de los cosustratos más empleados es la peptona con la que se ha logrado tratar eficazmente mezclas complejas de clorofenoles (Sahinkaya *et al.*, 2002, 2005, 2007).

Tabla 1.4. Estudios de degradación de mono- y diclorofenoles en SBR.

Referencia	Compuesto/Concentración (mg/L) ^a	Determinación de intermedios	Ecotoxicidad	Variable analizada	Empleo de cosustratos
Basu y Oleszkiewicz (1995)	2-CF/30	-	-	Temperatura	Dextrosa o fenol
Sahinkaya <i>et al.</i> (2002)	4-CF+2,4DCF /525+127	-	-	Comparar FBR y SBR	Peptona
Chiavola <i>et al.</i> (2003)	3-CF/75	-	-	Estrategia de operación	No
Tarighian <i>et al.</i> (2003)	4-CF/200	-	<i>Artemia salina</i>		Glucosa o fenol
Chiavola <i>et al.</i> (2004)	3-CF/175	-	-	Cometabolismo	Fenol
Moreno y Buitrón (2004)	4-CF/100	-	-	Origen del inóculo	No
Moreno-Andrade y Buitrón (2004)	4-CF/200	5-CHMS	-	Aclimatación	No
Buitrón <i>et al.</i> (2005)	4-CF	-	-	Estrategia de operación	No
Hu <i>et al.</i> (2005a)	4-CF	-	-	Secuencia	Acetato
Sahinkaya <i>et al.</i> (2006)	4-CF+2,4-DCF /220+110	5-CHMS	-	Concentración peptona	Peptona (0-300 mg/L)
Nalbur y Alkan (2007)	2-CF, 2,4DCF /240, 135	-	-	Tiempo medio de residencia celular,	Peptona, butírico, extracto de levadura y glucosa
Sahinkaya <i>et al.</i> (2007)	4-CF+2,4-DCF /220+110	4-CC 5-CHMS	-	Tiempos de llenado	Peptona (0-300 mg/L)
Moreno-Andrade y Buitrón (2008)	4-CF	-	Microtox	Estrategia de control	No

^aReferida al interior del reactor.

La selección del inóculo y su aclimatación durante la puesta en marcha del sistema resultan de gran importancia para el tratamiento de compuestos difícilmente biodegradables. Empleando una estrategia de tiempo variable, el mejor inóculo para el tratamiento de 4-CF son los lodos de EDAR (58 mg 4-CF/g SSV·h). Sin embargo, con una estrategia de tiempo fijo los mejores resultados se obtienen con un inóculo de lodo de depuradora de aguas industriales (25 mg 4-CF/g SSV·h). Es conocido que una adecuada aclimatación es la clave para lograr la degradación de algunos compuestos recalcitrantes (Spain y Van Veld, 1983). Tras la aclimatación del inóculo, el tiempo mínimo requerido para degradar 50 mg/L de 4-CF se redujo de 40 h a 50 min (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004), logrando alcanzar una velocidad máxima específica de eliminación de 41,17 mg 4-CF/g SSV·h (Sahinkaya y Dilek, 2005).

Una de las características más notables de las aguas fenólicas y clorofenólicas es la gran variabilidad en la concentración de los tóxicos, por lo que la selección de las estrategias de operación y control de sistemas SBR resulta especialmente importante, siendo la estrategia de control mediante el tiempo óptimo observado más eficiente que la de tiempo variable basada en respirometría (Buitrón *et al.*, 2005).

1.4. El Marco Regulatorio de las Aguas Residuales

Desde que en 1967 se aprobara la primera Directiva de carácter ambiental, la protección y conservación del medio ambiente ha sido una de las prioridades de la Unión Europea, incorporándose a los Tratados como una verdadera política comunitaria, cuyo principal objetivo es la prevención, de acuerdo con las previsiones de los sucesivos programas comunitarios de acción en materia de medio ambiente y desarrollo sostenible (Ley 16/2002).

En España, el interés por la protección del medio ambiente ha aumentado de manera notable desde la aprobación de la Constitución, en la que se recoge el derecho de todos los españoles a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de su persona, así como el deber de conservarlo, encomendando a los poderes públicos velar por la utilización racional de los recursos naturales y sancionar el incumplimiento de la normativa vigente, así como exigir la reparación del daño causado (Constitución Española, 1978, Art. 45).

Respecto al estado de las aguas, la Directiva 2006/11/CE, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas al medio acuático, considera urgente la imposición de una acción simultánea por parte de los Estados miembros, para la protección del medio acuático, principalmente frente a la contaminación causada por aquellas sustancias recogidas en su lista I, que engloba aquellos compuestos y sustancias de especial interés por su toxicidad, persistencia y bioacumulación, entre los que se encuentran compuestos organohalogenados y sustancias que puedan originar especies de esta clase en el medio acuático (Directivas 2006/11/CE, 2006/118/CE y 2008/105/CE).

Siguiendo su política de gestión del agua y considerando la importancia para la salud pública de las aguas destinadas al consumo, se publicó la Directiva 98/83/CE, en la que aparecen parámetros tóxicos y microbiológicos, determinados por un nivel guía,

valores que se consideran satisfactorios y una concentración máxima admisible, que un agua destinada al consumo debe cumplir. La Directiva incluye los parámetros relativos a sustancias no deseables, entre los que se recogen los fenoles (Directiva 98/83/CE, Anexo III).

A los listados de sustancias que aparecen en las Directivas anteriores se añadieron seis nuevos compuestos clorados, entre los que se incluye el pentaclorofenol, con el propósito de conseguir una eficaz lucha contra la contaminación de las aguas por parte de la UE (Directivas 98/83/CE y 2008/105/CE).

El punto culminante de esta recopilación legislativa lo ha supuesto la Directiva 96/61/CE traspuesta al ordenamiento jurídico español como la Ley 16/2002, de prevención y control integrado de la contaminación (IPPC), la cual establece medidas para evitar las emisiones de actividades contaminantes en el agua, para alcanzar un nivel elevado de protección del medio ambiente (Ley 16/2002). En su Anexo III se recoge una lista de las principales sustancias contaminantes tomadas en consideración, en las que los compuestos organohalogenados reciben una mención específica.

En el caso concreto de la Comunidad de Madrid (CM), se aprobó la Ley 10/1993 que tiene por objeto regular los vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento. Teniendo en cuenta las características de la CM, con alta densidad de población, una gran actividad económica y un porcentaje muy elevado de suelo urbano, se hace necesario el desarrollo legislativo específico que establezca las normas adecuadas para regular el vertido de aguas residuales industriales. Para ello, en su Anexo II quedan establecidos los valores máximos instantáneos entre los que se encuentra la concentración de compuestos fenólicos (2 mg/L).

Tal y como se ha mencionado, diversas normativas recogen específicamente límites de vertido para los compuestos fenólicos y clorofenólicos. No obstante, otros parámetros de carácter global también afectan al vertido de dichos compuestos, como en la Ley 10/93 de vertidos de la CM, el límite de toxicidad biológica para un vertido, con un valor máximo de 25 unidades de toxicidad (UT). Cabe mencionar en este punto que una concentración de 4-clorofenol de 100 mg/L arroja una ecotoxicidad en torno a 55 UT.

Debido a la contaminación del suelo agrícola por fenoles y clorofenoles, estos se han recogido en la lista de sustancias objetivo de las Directivas sobre aguas subterráneas 80/68/CEE y 2006/118/CE. Algunos países europeos han establecido límites concretos, tanto para el fenol, como para el 4-CF. Los estándares de calidad ambiental recomendados por la agencia ambiental inglesa para el 4-CF coinciden para aguas continentales y saladas, estableciendo un máximo de media anual de 50 µg/L y de concentración máxima permitida de 250 µg/L. Los límites establecidos para el fenol son de 30 y 300 µg /L, respectivamente. En la Tabla 1.5 se muestran los valores para España.

Tabla 1.5. Límites legales en España para compuestos fenólicos en aguas.

Norma	Tipo de aguas	Límite (C ₆ H ₅ OH)
		A1: 0,001 mg/L
	Anexo I: Calidad exigida a las aguas superficiales que sean destinadas a la producción de agua potable	A2: 0,005 mg/L
RD 927/1988	Anexo II: Calidad exigida a las aguas dulces superficiales para ser aptas para el baño	A3: 0,1 mg/L
	Anexo III: Calidad exigible a las aguas continentales cuando requieran protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces	0,05 mg/L
		Los fenoles no deben estar presentes en concentraciones que alteren el sabor del pescado
RD 1138/1990	Anexo C: Caracteres relativos a sustancias no deseables	0,5 µL (Excluidos los fenoles naturales que no reaccionan con el cloro).
L 10/93 CM	Anexo II: Valores máximos instantáneos de los parámetros de contaminación	2 mg/L

Además de los límites específicos establecidos en la legislación, los vertidos fenólicos y clorofenólicos deben recibir una especial atención por su persistencia y bioacumulación. La conservación del estado de las aguas, por tanto, es una de las políticas relevantes en temas ambientales, lo cual impulsa el estudio sobre nuevas técnicas de descontaminación.

**II. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE
OPERACIÓN, PUESTA EN MARCHA Y
ACLIMATACIÓN DE REACTORES
DISCONTINUOS**

“There is plenty of room at the bottom”, Dr. Feynman (1959).

2.1. Introducción

Las plantas de tratamiento de aguas residuales generalmente reciben efluentes complejos en los cuales compuestos recalcitrantes y biogénicos a menudo coexisten. La competencia entre sustratos por las enzimas o cofactores (Hu *et al.*, 2005a) y su ecotoxicidad, puede dar lugar a procesos sinérgicos y antagónicos, por lo que, las interacciones entre compuestos son múltiples. Por lo tanto, es importante conocer cómo afecta la presencia y concentración de los cosustratos a la eficiencia de degradación de los compuestos difícilmente biodegradables. Numerosos trabajos han concluido que la degradación de compuestos específicos se lleva a cabo mediante una determinada fracción de la biomasa (Hu *et al.*, 2005a,b; Ellis *et al.*, 1996; Tomei *et al.*, 2003), lo cual implica que la presencia de sustratos biogénicos no garantiza la mejora de la eliminación de los compuestos difícilmente biodegradables (Hu *et al.*, 2005a). De este modo, Kulkarni y Chaudhari (2006) mostraron que la velocidad de degradación del *p*-nitrofenol disminuye con la adición de glucosa. En otro estudio, Hu *et al.* (2005a) concluyeron que la adición de un sustrato biogénico disminuye la velocidad de degradación de 4-CF y aumenta la del 2,4-diclorofenol, lo cual indica que la respuesta a la presencia de cosustratos depende de la naturaleza de los compuestos estudiados. Por lo tanto, es necesario particularizar el efecto que provoca la presencia de diferentes compuestos sobre la degradación de clorofenoles en sistemas multisustrato.

Los cosustratos más ampliamente utilizados en la biodegradación de 4-CF son la glucosa y el fenol. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo mediante cepas puras como *A. eutrophus* (Hill *et al.*, 1996), *P. putida* (Kim *et al.*, 2002; Loh y Wang, 1998; Wang y Loh, 1999a; Wang y Loh, 2001) o *C. testosteroni* (Bae *et al.*, 1997b; Chen *et al.*, 2003; Hollender *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004). Sin embargo, su influencia sobre la degradabilidad de monoclorofenoles mediante fangos activos únicamente se ha estudiado para el 2-clorofenol (Basu and Oleszkiewicz, 1995) y el 3-clorofenol (Chiavola *et al.*, 2004). El catecol se seleccionó como uno de los cosustratos analizados en el presente estudio por su naturaleza química similar a la del fenol. A pesar de que la ecotoxicidad del catecol es mayor que la del fenol ($EC_{50} = 8$ mg/L y 15.9 mg/L, respectivamente), ensayos previos mediante SBR mostraron que su biodegradabilidad es mayor que la del fenol (Suárez *et al.*, 2006). Por otro lado, varios trabajos sobre el

hidrotratamiento de 4-CF en fase acuosa han presentado el ciclohexanol como el compuesto final de degradación, empleando condiciones suaves de operación, más deseable debido a su menor ecotoxicidad respecto a la del resto de compuestos intermedios (Vaidya y Mahajani, 2004; Díaz *et al.*, 2008), por lo que su empleo como cosustrato resulta de interés para futuros estudios sobre el acoplamiento de dicha técnica con sistemas biológicos aerobios.

Un aspecto importante a estudiar es la influencia de la concentración del cosustrato seleccionado sobre la eficacia de degradación del compuesto difícilmente biodegradable, sin embargo, no se han encontrado estudios que analicen dicho efecto sobre el rendimiento de eliminación de 4-CF mediante fangos activos.

Debido a que existen diversas fuentes de aguas residuales que contienen 4-CF, estas presentan un amplio intervalo de pH, lo que hace necesario conocer el rango de pH en el que el fango biológico es efectivo. Otra de las variables importantes en la puesta en marcha de reactores biológicos es la selección del inóculo ya que tiene una gran influencia sobre la actividad específica de degradación de 4-CF (Moreno y Buitrón, 2004). Sin embargo, no se han encontrado referencias sobre la influencia de la concentración de inóculo sobre la capacidad de degradación de 4-CF.

Por otro lado, la degradación biológica de fósforo en aguas residuales que contengan 4-CF solamente ha sido estudiada en un sistema convencional de fangos activos en continuo concluyendo que el 4-CF inhibe su degradación (Kargi *et al.*, 2005). El estudio de las necesidades de P para el tratamiento biológico de dichas aguas permite conocer la capacidad de eliminación de P mediante este sistema así como la optimización de la dosis requerida en aquellas aguas deficitarias en P.

A pesar de que el 4-CF es el menos biodegradable de los monoclorofenoles (Boyd y Shelton, 1984), su biodegradabilidad puede mejorarse mediante la aclimatación del inóculo ya sea anaerobio (Boyd y Shelton, 1984; Ye y Shen, 2004) o aerobio (Buitrón y Capdeville, 1995; Buitrón *et al.*, 1998), por lo que muchos trabajos sobre la degradación de clorofenoles emplean biomasa aclimatada con fenol. Buitrón *et al.* (1998) lograron aumentar la velocidad específica de consumo de 4-CF, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol aclimatando previamente el lodo a 40 mg/L de fenol durante 70 días. Debido a que los organismos aerobios crecen más rápido que los anaerobios, en las

comunidades aerobias el periodo de aclimatación normalmente va desde horas a días (Wiggings *et al.*, 1987; Timothy *et al.*, 1989); sin embargo, para organismos anaerobios, este periodo puede extenderse desde semanas hasta meses (Horowitz *et al.*, 1983). No obstante, en éste y otros estudios se ha observado que, generalmente, los compuestos orgánicos clorados no pueden tratarse como única fuente de carbono y energía para lo cual es necesario el empleo de cosustratos (Wang y Loh, 1999a, 2000; Bali y Sengul, 2002). En el caso de emplear cepas puras es necesario añadir fenol como sustrato de crecimiento par inducir las enzimas responsables de la degradación del 4-CF (Wang y Loh, 1999a; Hill *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Kim y Hao, 1999; Hao *et al.*, 2002). A pesar de los buenos resultados obtenidos, el empleo de cepas presenta como principales inconvenientes la necesidad de añadir un cosustrato, lo cual puede provocar problemas adicionales de contaminación, la posible contaminación del inóculo y la dificultad para lograr la mineralización del 4-CF. Por lo que, el empleo de sistemas de fangos activos es particularmente importante cuando el objetivo del tratamiento es la completa mineralización de los compuestos. La principal ventaja de este tipo de sistemas es que está compuesto por un consorcio microbiano donde pueden darse interacciones entre las especies presentes, lo cual permite alcanzar velocidades de eliminación de clorofenoles de 1 o 2 órdenes de magnitud superiores a las obtenidas mediante las cepas aisladas a partir del cultivo mixto (Buitrón *et al.*, 1998).

En el presente estudio se evalúa el empleo de cosustratos, la influencia de su concentración, el pH, la concentración de inóculo, los requerimientos de micronutrientes y la adaptación a fenol para mejorar la puesta en marcha de reactores biológicos para el tratamiento de 4-CF.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Reactores Discontinuos

Se emplearon reactores discontinuos de 1L construidos en vidrio con un volumen de trabajo de 0,75 L, los cuales fueron continuamente agitados y aereados. El sistema de aereación se compone de compresores de aire y difusores cerámicos. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (19 ± 2 °C).

2.2.2. Fuente de Inóculo

Las fuentes de inóculo y la aclimatación de éste fueron diferentes para cada uno de los apartados del presente Capítulo. En la Tabla 1.2 se recogen las condiciones iniciales del inóculo tanto en concentración como en aclimatación.

Tabla 1.2. Condiciones iniciales del inóculo para cada estudio

Apartado	Concentración (mg/L)	Fuente
1.3.1. "Evaluación del Empleo de Cosustratos"	3000	No aclimatado
1.3.2. "Influencia de la Concentración de Fenol como Cosustrato"	500	Preaclimatado a fenol
1.3.3. "Influencia del pH sobre la Biodegradación de 4-CF"	500	Preaclimatado a fenol
1.3.4. "Influencia de la Concentración de Inóculo sobre la Puesta en Marcha de Reactores Discontinuos"	50-1250	Aclimatado a fenol y 4-CF
1.3.5. "Eliminación de Nutrientes durante la Degradación Cometabólica de 4-CF"	3000	No aclimatado
1.3.6. "Influencia de la Preaclimatación a Fenol en la Puesta en Marcha de Reactores"	500	No aclimatado/ preaclimatado

El empleo de lodos industriales se ha presentado como una mejor fuente de inóculo que los municipales para el tratamiento de clorofenoles (Boyd y Shelton, 1984), por lo que como lodo no aclimatado se utilizó una mezcla de lodos industriales (1:1, w:w) procedentes de dos plantas SBR empleadas para el tratamiento de aguas residuales industriales de origen diverso en un caso y de aguas residuales cosméticas en la otra.

La aclimatación del lodo a la degradación de fenol se llevó a cabo en un reactor SBR alimentado con fenol como única fuente de carbono y energía. En el apartado 1.3.4. "Influencia de la Concentración de Inóculo sobre la Puesta en Marcha de Reactores Discontinuos" se empleó un lodo completamente adaptado a la degradación conjunta de fenol y 4-CF en un reactor SBR, y poder analizar su efecto sobre la degradación de ambos compuestos.

2.2.3. Composición del Agua Tratada

Los influentes alimentados a los reactores se prepararon según se ha descrito en el Capítulo II. Las concentraciones de fenol y 4-CF tratadas variaron en cada ensayo. Además, se añadió una fuente de nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes (cloruro de hierro (III) 6-hidrato, cloruro cálcico anhidro, cloruro potásico, sulfato magnésico) empleando una proporción DQO:N:P:micronutrientes de 100:0,5:0,1:0,05 (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Sales empleadas como fuente de micronutrientes y sus concentraciones.

Compuesto	Concentración
Sulfato Amónico	100:0,5 (DQO:N)
Ácido Fosfórico, 85%	100:0,1 (DQO:P)
Cloruro de Hierro(III) 6-hidrato	100:0,05 (DQO:Fe)
Cloruro Cálcico anhidro	100:0,05 (DQO:Ca)
Cloruro Potásico	100:0,05 (DQO:K)
Sulfato Magnésico	100:0,05 (DQO:Mg)

2.2.4. Métodos Analíticos

2.2.4.1 Análisis físicos

La determinación de los sólidos en suspensión totales y volátiles se realizó según el procedimiento establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA-AWWA-WPCF, 1992). Para más información del procedimiento ver el apartado de Análisis Físicos del Capítulo II.

2.2.4.2 Análisis químicos

El procedimiento para el análisis de COT y de los compuestos orgánicos mediante HPLC se recogen en el apartado de Análisis Químicos del Capítulo II.

2.2.4.3 Análisis estadístico

Los resultados mostrados son los valores medios obtenidos en ensayos realizados por duplicado. En todos los casos el error estándar fue menor del 10%.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Evaluación del Empleo de Cosustratos

El principal objetivo de este estudio es conocer la influencia que tiene la adición de diferentes cosustratos sobre la degradación del 4-CF con un fango no adaptado analizando además la degradación de COT y de los cosustratos, así como la influencia del ratio $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$ y la extensión de la deoloración.

Se trataron dos concentraciones de 4-CF (20 y 80 mg/L) a lo que se añadieron diferentes cosustratos (catecol, c-hexanol, fenol y glucosa). La concentración de cosustratos se modificó para establecer diferentes ratios de $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$ desde 1:0,25 hasta 1:2. Se observó que el tiempo requerido para lograr eliminar completamente el 4-CF depende de las concentraciones de 4-CF y del cosustrato empleado. En la Fig. 3.1 se muestra la evolución de la concentración de c-hexanol tratando 12 y 24 mg/L de éste conjuntamente con 4-CF (20 y 80 mg/L). Debido a la inhibición del lodo por la presencia de 4-CF, se observó una disminución de la velocidad de degradación al aumentar la concentración de 4-CF, la cual es más acusada al tratar una mayor concentración de c-hexanol.

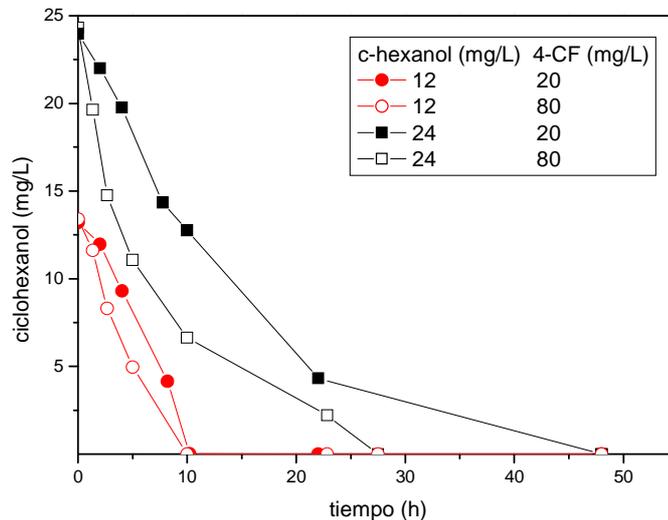


Fig. 3.1. Evolución de la concentración de ciclohexanol empleado como cosustrato en la degradación de 4-CF.

En la Fig. 3.2 se muestran los rendimientos de degradación de COT y 4-CF tratando 80 mg/L de 4-CF, empleando diferentes cosustratos. Como puede observarse

en la parte izquierda de la Fig. 3.2 la adición de cosustratos mejoró los rendimientos de eliminación de COT, observándose una ligera mejora cuando el ratio $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$ se aumentó de 1:0,25 a 1:0,5. Por otro lado, los rendimientos de eliminación de 4-CF no lograron aumentarse añadiendo cosustratos, reduciéndose en el caso del catecol cuando este se añadió en un ratio 1:0,5. Sin embargo, cuando los cosustratos se añadieron en una proporción menor (1:0,25), los rendimientos aumentaron considerablemente, alcanzando porcentajes de eliminación superiores al 80 % al emplear ciclohexanol, fenol o glucosa como cosustratos.

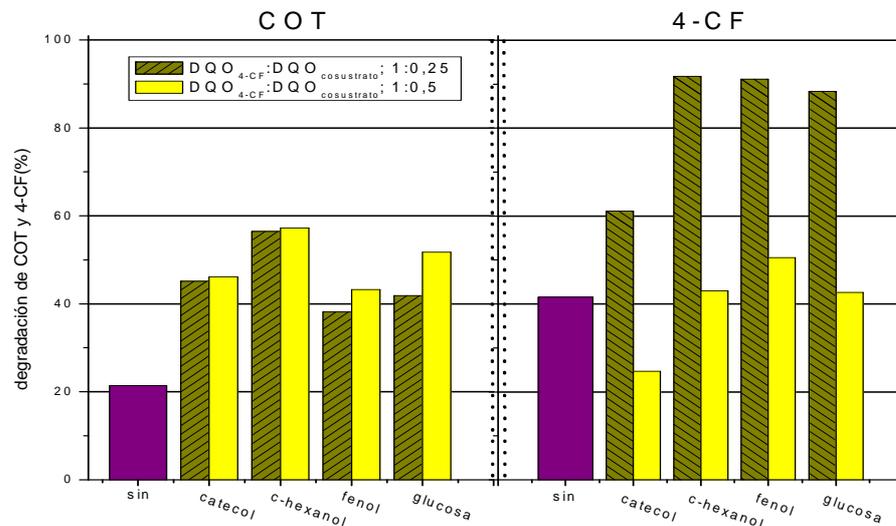


Fig. 3.2. Eficacias de eliminación de COT y 4-CF tras 48 h de la puesta en marcha de reactores añadiendo diferentes proporciones de varios cosustratos (1:0,25 y 1:0,5; $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$). Condiciones iniciales: $[4-CF] = (80 \text{ mg/L})$.

El efecto de la adición de cosustratos al tratar 20 mg/L mostró diferencias significativas respecto a lo observado al tratar 80 mg/L. También en este caso la adición de los cosustratos provocó un aumento de los rendimientos de eliminación de COT, debido en parte al aporte de COT más fácilmente biodegradable por dichos compuestos. En este caso los mejores resultados se obtuvieron para una proporción $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$ de 1:1, lo cual podría estar relacionado con el aumento de la ecotoxicidad o la competencia al aumentar dicha proporción a 1:2, reduciendo así la actividad biodegradativa del consorcio microbiano.

Sin embargo, los rendimientos de eliminación de 4-CF obtenidos aumentaron significativamente añadiendo una proporción de cosustrato 1:2. Es especialmente

notable el aumento de la eficacia observada al aumentar la proporción de fenol de 1:1 (32,2%) a 1:2 (83,6%). Además, el aumento de la proporción de cosustratos (1:2) hace que la eliminación de 4-CF sea mayor disminuyendo los rendimientos de eliminación de COT, lo cual indica que para altas proporciones se favorece la transformación del 4-CF generando una mayor concentración de productos finales no mineralizados.

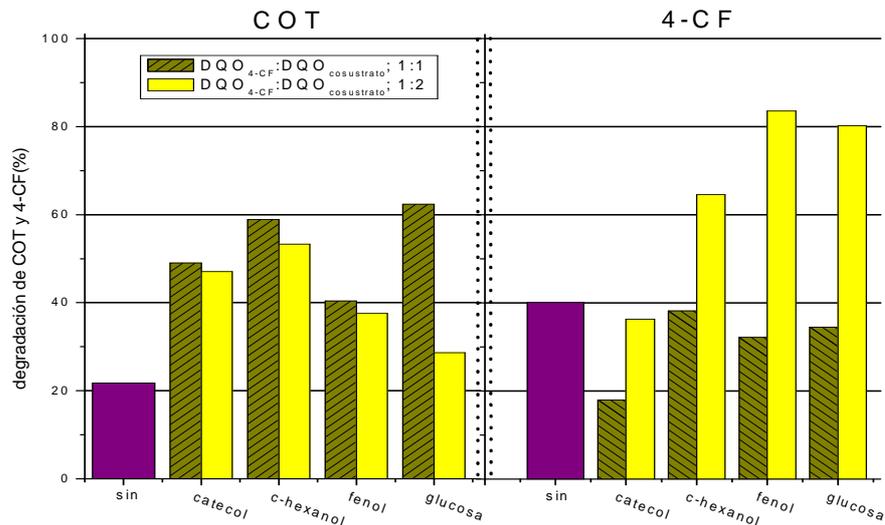


Fig. 2.3. Eficacias de eliminación de COT y 4-CF tras 10 h de la puesta en marcha de reactores añadiendo diferentes proporciones (1:1 y 1:2; $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$) de varios cosustratos. Condiciones iniciales: $[4-CF] = (20 \text{ mg/L})$.

Si se compara la evolución de la concentración de COT medido y teórico, calculado teniendo en cuenta la evolución de la concentración de los compuestos de partida, se observa que la fracción del COT que representan los compuestos intermedios no mineralizables aumenta a lo largo de la reacción (Fig. 2.4). Por lo que la transformación de los compuestos de partida parece ser una mejor fuente energética que la degradación de aquellos intermedios producidos tras ella, ya que, estudios previos han mostrado que muchos de ellos tienen una mayor toxicidad que los compuestos de partida, provocando en algunos casos la muerte celular (Farrel y Quilty, 1999).

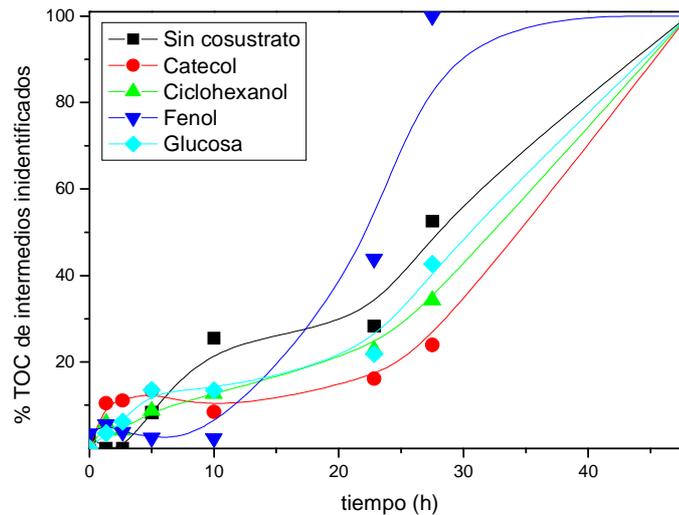


Fig. 2.4. Evolución del porcentaje COT debido a la generación de compuestos intermedios no identificados. Condiciones iniciales: $[4\text{-CF}] = 20 \text{ mg/L}$; ratio $\text{DQO}_{4\text{-CF}}:\text{DQO}_{\text{cosustrato}} = 1:1$).

El análisis de la capacidad de dechloración, calculada a partir de la evolución de la concentración de 4-CF y CI, permite determinar el grado de dechloración de los compuestos intermedios recalcitrantes. En la Fig. 2.5 se muestra la evolución del % de la concentración de CI teóricos calculados a partir de la evolución de la concentración de 4-CF que se midió experimentalmente. El grado de dechloración de los intermedios parece estar relacionado con el ratio $\text{DQO}_{4\text{-CF}}:\text{DQO}_{\text{cosustrato}}$ empleado. Para una concentración inicial de 4-CF de 80 mg/L, la reducción del ratio $\text{DQO}_{4\text{-CF}}:\text{DQO}_{\text{cosustrato}}$ de 1:0,5 a 1:0,25 provocó un aumento del % de dechloración de alrededor del 50% hasta alcanzar prácticamente la dechloración total. El aumento del % de dechloración se relaciona con el aumento de las eficacias de eliminación de 4-CF. Lo cual puede estar relacionado con el hecho de que alguno de los compuestos intermedios clorados se consideran compuestos “suicida” (Farrel y Quilty, 1999).

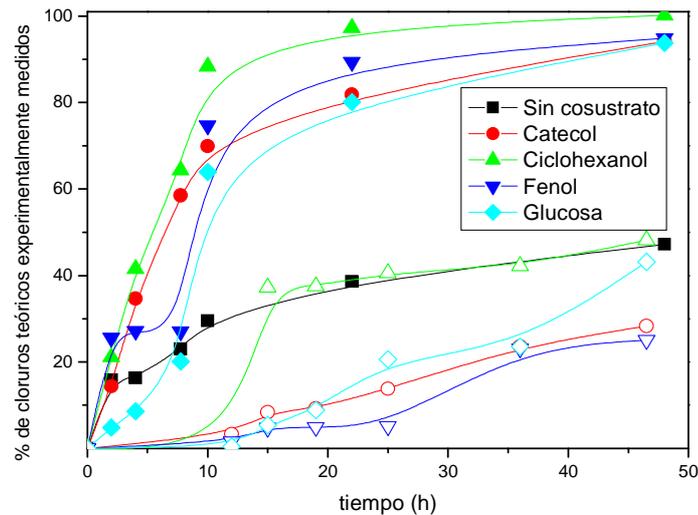


Fig. 2.5. Porcentaje de cloruros teóricos medidos tratando 80 mg/L de 4-CF junto con diferentes cosustratos. Símbolos cerrados: 1:0,25; $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$; símbolos abiertos: 1:0,5; $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$.

En un sistema SBR es importante conocer la velocidad a la que se da la degradación para poder establecer la duración de cada ciclo y de las etapas de las que se compone. En la Fig. 2.6 se muestra la evolución de la concentración de 4-CF tratando una concentración inicial de 80 mg/L y añadiendo diferentes cosustratos en una proporción 1:0,5. El tipo de cosustrato empleado influye notablemente en la velocidad de degradación, observando una variación de las velocidades medias desde 0,43 a 0,84 mg/L·h empleando catecol y fenol respectivamente. En la mayoría de los casos pueden observarse dos periodos atendiendo a las velocidades de degradación: una primera etapa de una duración aproximada de 15 h en la que la degradación es muy lenta debido a la inhibición que provoca la adición de los compuestos tóxicos y una segunda en la que la velocidad de consumo se acelera una vez finalizada la aclimatación. Puede concluirse por tanto que en todos los casos la aclimatación del lodo mejora las eficacias de degradación, lo cual permitiría reducir la duración del ciclo de tratamiento en un sistema SBR.

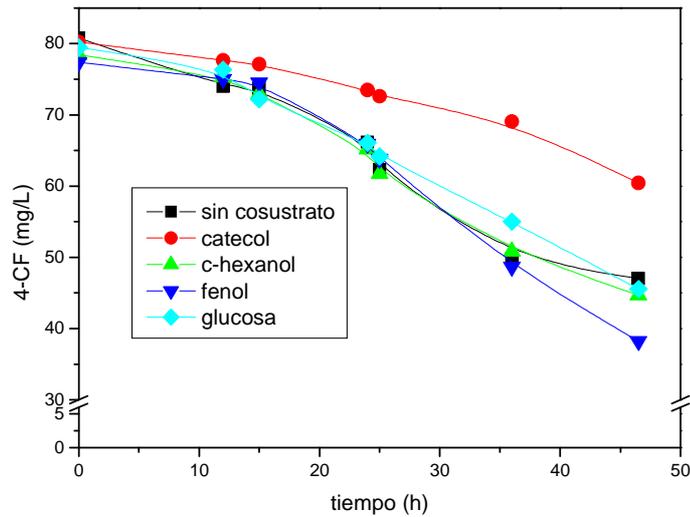


Fig. 2.6. Evolución de la concentración de 4-CF añadiendo diferentes cosustratos con un ratio $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustrato}$ de 1:0,5 tratando 80 mg/L de 4-CF durante la puesta en marcha.

2.3.2. Influencia de la Concentración de Fenol como Cosustrato

El estudio del tratamiento conjunto de fenol y 4-CF resulta interesante puesto que pueden aparecer conjuntamente en efluentes resultantes del tratamiento de clorofenoles mediante hidrodecloración (Calvo *et al.*, 2004), tratamiento biológico anaerobio (Berestovskaya *et al.*, 1995; Puyol *et al.*, 2009a,b), o de la cloración de aguas residuales que contengan fenoles (WHO, 1989).

En el presente estudio se analiza la influencia de la concentración de fenol sobre la eficacia de eliminación de 4-CF para lo cual se realizaron cuatro experimentos en los que se trataron diferentes concentraciones iniciales de 4-CF (20 - 100 mg/L) añadiendo concentraciones de fenol de hasta 100 mg/L.

Como puede observarse en la Fig. 2.7, el aumento de la concentración de fenol reduce el tiempo mínimo requerido para eliminar el 4-CF. Para concentraciones de fenol mayores de 25 mg/L no se observaron diferencias significativas en dicho tiempo. Sin embargo, para mayores concentraciones de fenol las velocidades iniciales de degradación de 4-CF fueron menores. La modificación del patrón de degradación puede estar relacionado con procesos cometabólicos entre ambos compuestos. Teniendo en cuenta los trabajos previos de Gottschalk (1986) y Spain y Gibson (1988) en los que se

concluye que el 4-CF se transforma en 4-clorocatecol mediante una monooxigenasa, en este caso el NADPH generado tras la oxidación de fenol podría emplearse para la regeneración de dicha monooxigenasa (Sáez y Rittmann, 1993).

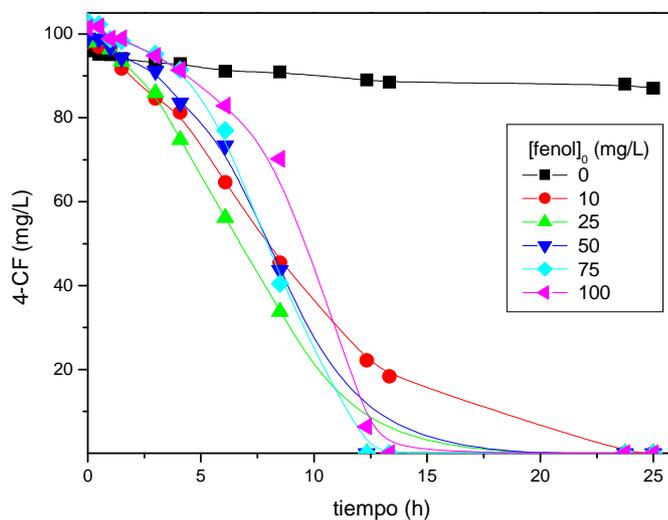


Fig. 2.7. Evolución de la concentración de 4-CF añadiendo diferentes concentraciones de fenol. Concentración inicial: [4-CF] = 100 mg/L; [fenol] = 0 - 100 mg/L.

Las velocidades de eliminación de fenol fueron muy superiores a las obtenidas para el 4-CF. Lo cual puede estar relacionado con la menor toxicidad del fenol, empleado en este caso como cosustrato. En la Fig. 2.8 se muestra la evolución de la concentración normalizada de fenol ($[fenol]_0 = 10 - 100$ mg/L) tratando cometabólicamente 100 mg/L de 4-CF.

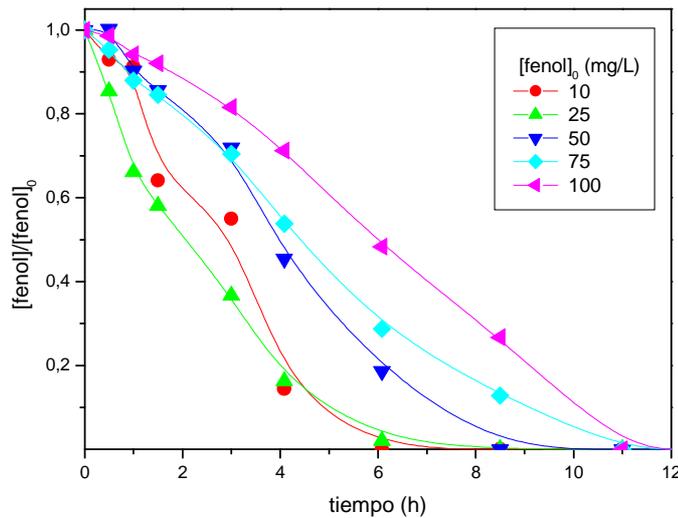


Fig. 2.8. Evolución de la proporción de $[fenol]/[fenol]_0$ a lo largo de los ensayos tratando 4-CF (100 mg/L) con diferentes concentraciones de fenol (10-100 mg/L).

A partir de las curvas de consumo de fenol durante el tratamiento de diferentes concentraciones de éste junto con diferentes concentraciones de 4-CF se obtuvieron las velocidades medias de consumo de fenol (Fig. 2.9). Las velocidades de consumo de fenol se ajustaron satisfactoriamente a un modelo de Monod Ec.[2.1]:

$$V = \frac{V_{MAX} \cdot S}{S + K_S} \quad [2.1]$$

Los valores obtenidos para los parámetros de ajuste se resumen en la Tabla 1.3. Los valores de K_S aumentaron a medida que la concentración de 4-CF tratada se aumentó. Por otro lado, los valores de V_{MAX} no mostraron grandes diferencias para cada una de las concentraciones de 4-CF tratadas. Estos resultados indican que se trata de un proceso de inhibición competitiva. Este tipo de inhibición habitualmente sucede con sustratos tóxicos o recalcitrantes, la cual desaparece cuando se consume el sustrato inhibitorio.

Tabla 1.3. Valores de los parámetros de ajuste según el modelo de Monod para las velocidades de consumo de fenol tratando conjuntamente 4-CF.

[4-CF] ₀ (mg/L)	K _s (mg/L)	V _{max} (mg/L·h)	R ²
20	3,32 ± 1,08	9,92 ± 0,36	0,987
30	5,73 ± 1,70	8,61 ± 0,40	0,984
60	28,33 ± 1,59	11,97 ± 0,23	0,999
100	56,10 ± 5,63	12,92 ± 0,61	0,998

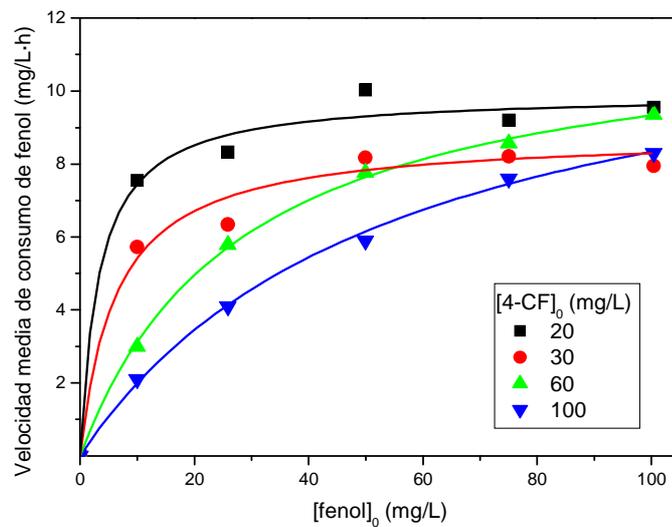


Fig. 2.9. Velocidades medias de consumo de fenol tratando conjuntamente diferentes concentraciones de fenol (10 - 100 mg/L) y de 4-CF (20 - 100 mg/L). Ajustes de dichos valores según el modelo de Monod.

En todos los experimentos realizados se detectó una fracción de COT residual refractaria. Únicamente en aquellos ensayos en los que se trataron 20 mg/L de 4-CF y se añadió una concentración de fenol de 10 a 50 mg/L se logró eliminar el 100% del COT (Fig. 2.11). La adición de fenol provocó un aumento de la conversión de COT (Fig. 2.10). Este hecho se debe al aumento del grado de mineralización en la degradación tanto del fenol como del 4-CF, por lo que la adición de fenol mejora la capacidad de eliminación de aquellos intermedios poco biodegradables.

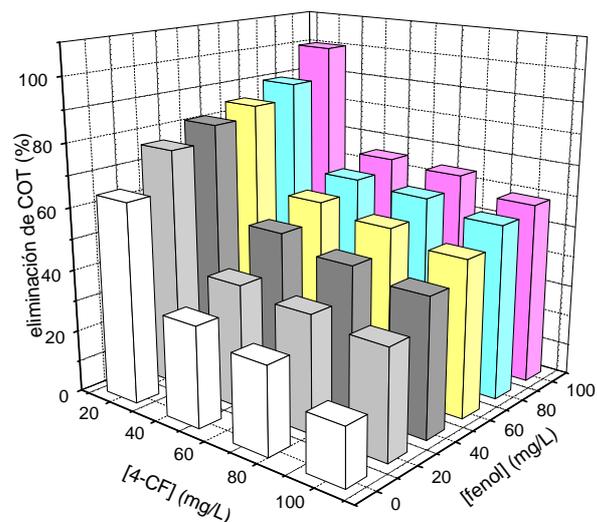


Fig. 2.11. Rendimientos de consumo de COT en función de las concentraciones de fenol y 4-CF tratadas conjuntamente.

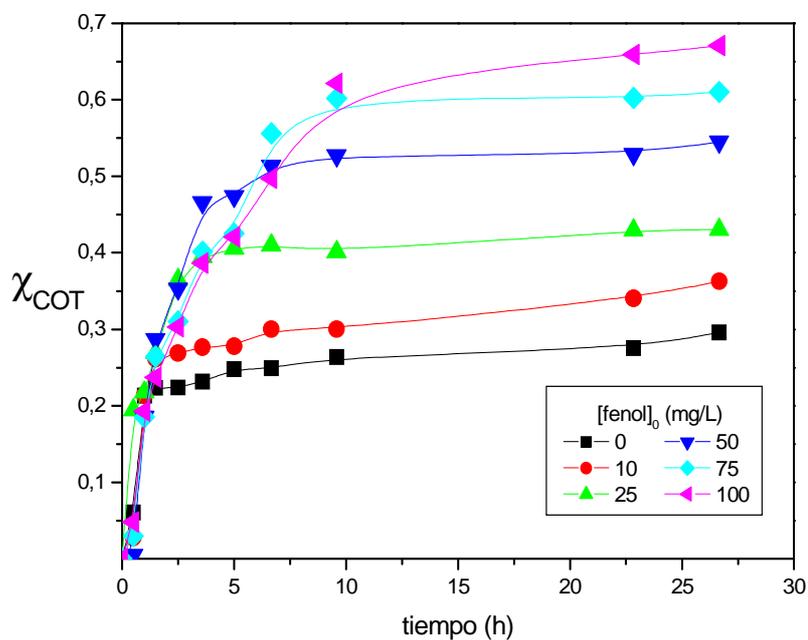


Fig. 2.10. Evolución de la conversión de COT durante la degradación de 4-CF (60 mg/L) y fenol (0-100 mg/L).

En la Fig. 2.12 se muestran las velocidades medias de consumo de COT tratando diferentes concentraciones de fenol y 4-CF. Se observa que la concentración de fenol ejerce una mayor influencia sobre dicha velocidad, siendo menos evidente el efecto de la concentración de 4-CF.

En el rango de concentraciones tratadas en el presente estudio la relación entre la concentración de fenol y la velocidad de consumo de COT es lineal, independientemente de la concentración de 4-CF tratada.

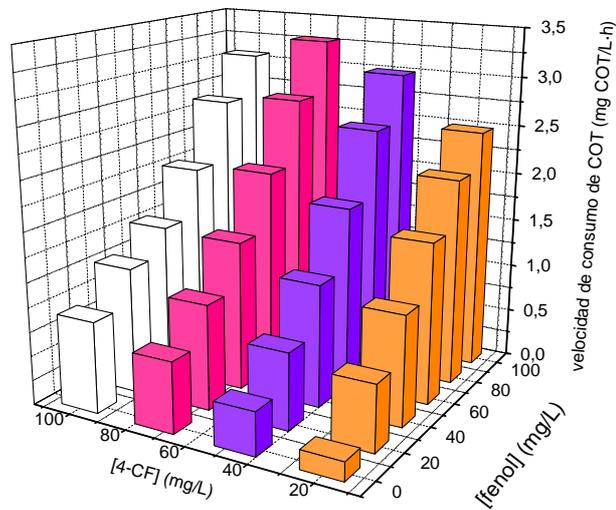


Fig. 2.12. Relación entre la velocidad media de consumo de COT y la concentración de fenol añadida.

Sabiendo que los compuestos iniciales se degradan totalmente, puede afirmarse que son los intermedios de degradación los que limitan la extensión de la degradación aerobia de influentes compuestos por fenol y 4-CF. Dicha hipótesis está de acuerdo con trabajos previos en los que se concluye que la fracción de materia carbonosa residual podría deberse a compuestos refractarios generados durante el proceso de degradación biológica de los tóxicos tratados (Obaja *et al.*, 2003; Arrojo *et al.*, 2004).

2.3.3. Influencia del pH sobre la Biodegradación de 4-CF

En el presente estudio se analizó la capacidad de degradación de 4-CF como única fuente de carbono y energía simulando un agua residual ácida (pH = 3,5), neutra

(pH = 7,0) y básica (pH = 10,5), empleando como inóculo 500 mg/L de un lodo biológico adaptado a la degradación de fenol.

La evolución de la concentración fue similar a los tres pHs, sin embargo, el rendimiento de degradación de 4-CF fueron mayores a pH 7,0, obteniendo los menores rendimientos a pH 3,5 (Fig. 2.13). Parte de los compuestos de degradación del 4-CF poseen un carácter ácido (5-cloro-2-hidroximucónico semialdehído, ácido fórmico, 4-hidroxi-2-oxovaleriano, ácido pirúvico, etc.), los cuales podrían ser la causa del descenso acusado del pH al comienzo del ensayo (Fig. 2.14). Debido a ello, el aumento de la concentración de 4-CF tratada provocó una mayor caída del pH (Fig. 2.14). Posteriormente, el pH aumenta debido al consumo de los metabolitos ácidos generados, exceptuando los ensayos de mayor concentración de 4-CF donde el pH descendió a lo largo de todo el experimento.

En los ensayos a pH 10,5 se produjo un descenso pronunciado del pH. Tras un segundo ajuste al pH deseado, se observó un descenso paulatino del mismo hasta valores próximos a 8,5 el cual se mantuvo a lo largo del estudio. Este hecho parece mostrar cierta capacidad amortiguadora de los microorganismos al establecerse condiciones básicas, lo que explica los buenos rendimientos de degradación obtenidos. Este proceso de amortiguación no se evidenció en los ensayos a pH 3,5.

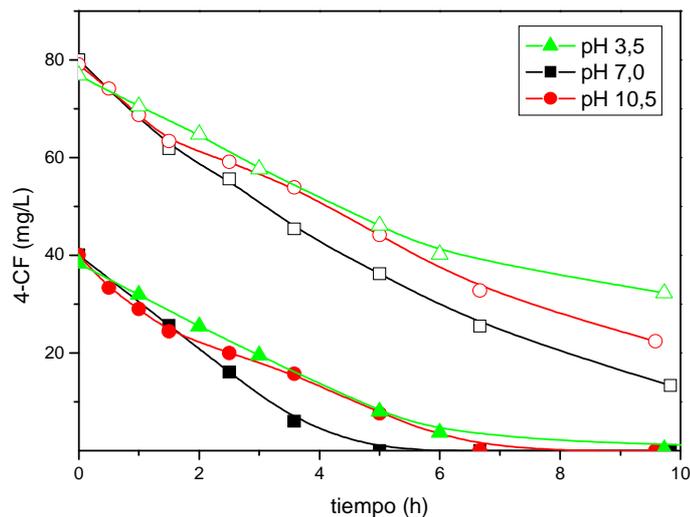


Fig. 2.13. Evolución de la concentración de 4-CF tratando 40 y 80 mg/L a diferente pH.

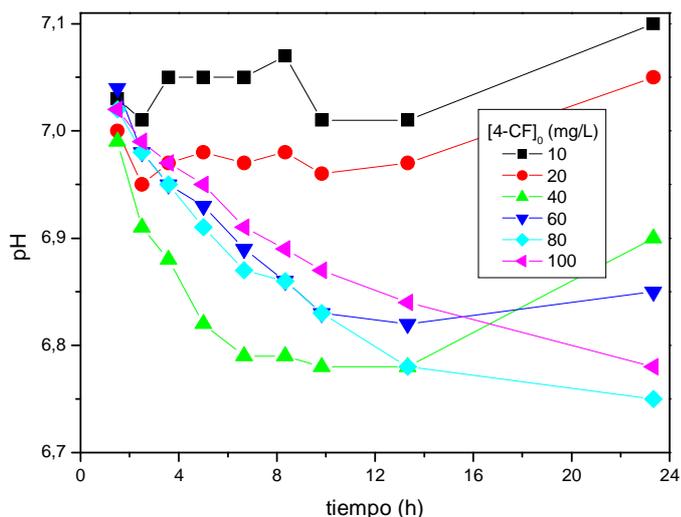


Fig. 2.14. Comparativa de la evolución del pH tratando concentraciones de 4-CF entre 10 y 100 mg/L a pH inicial 7,0.

En el conjunto de experimentos realizados a los tres pH ensayados se eliminó en 24 h el 100% del 4-CF tratando concentraciones de 10 a 100 mg/L. Por lo que la adaptación del licor mezcla a un compuesto de naturaleza química similar al 4-CF, supone una buena estrategia para mejorar su capacidad degradativa. Además, la población microbiana resultó ser eurícara para el valor inicial de pH. No obstante, las mayores velocidades de eliminación de 4-CF se obtuvieron a pH 7,0 cuya evolución de la concentración normalizada de 4-CF se muestra en la Fig. 2.15.

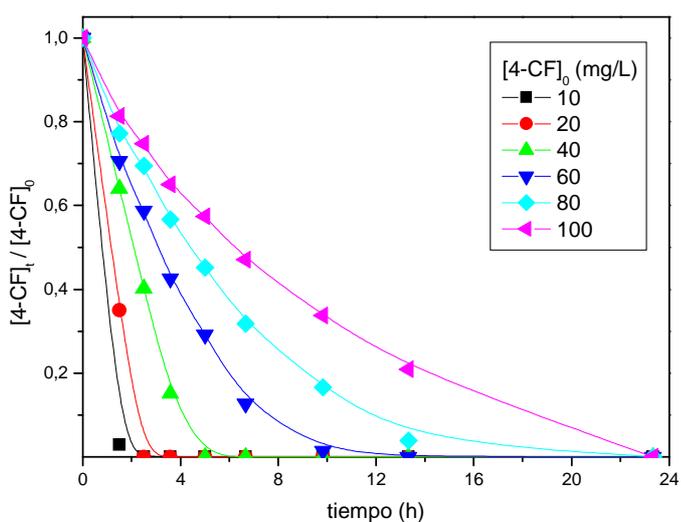


Fig. 2.15. Evolución de la concentración normalizada de 4-CF tratando diferentes concentraciones iniciales a pH 7.

Análisis cinético de la degradación de 4-CF a diferentes pHs empleando lodo previamente aclimatado a fenol

Para establecer una comparativa más precisa se modelizó la evolución de la concentración de 4-CF tratando diferentes concentraciones de este a los tres pHs estudiados empleando para ello el modelo de Haldane descrito a continuación:

La ecuación que rige la producción de biomasa a lo largo del tiempo viene definida por la siguiente expresión:

$$\frac{dSSVLM}{dT} = \mu \cdot SSVLM \quad [2.2]$$

El desarrollo de μ en el caso del modelo de Haldane en función de la concentración de 4-CF y de la constante de saturación se recoge en la Ec. 2.3.

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{C_{4-CF}}{k_s + C_{4-CF} + C_{4-CF} \cdot \left(\frac{C_{4-CF}}{K_I} \right)^2} \quad [2.3]$$

La expresión para μ (Ec. 2.3) puede introducirse en la Ec. 2.2, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\frac{dSSVLM}{dT} = \mu \cdot SSVLM = \mu_{MAX} \frac{C_{4-CF}}{k_s + C_{4-CF} + C_{4-CF} \cdot \left(\frac{C_{4-CF}}{K_I} \right)^2} SSVLM \quad [2.4]$$

Por otro lado, la velocidad de consumo de 4-CF puede expresarse como la diferencial de la concentración de éste respecto al tiempo, o bien empleando una expresión donde se integra el coeficiente de rendimiento de producción de biomasa a partir del 4-CF (Y_{XS}).

$$\Gamma = -\frac{dC_{4-CF}}{dT} = \frac{\mu SSVLM}{Y_{SSVLM} C_{4-CF}} \quad [2.5]$$

Si se combinan las ecuaciones 4 y 5 se obtiene la Ec. 2.6.

$$\Gamma = \frac{\mu_{MAX} SSVLM}{Y_{XS}} \cdot \frac{C_{4-CF}}{K_S + C_{4-CF} + C_{4-CF} \cdot \left(\frac{C_{4-CF}}{K_I} \right)^2} \quad [2.6]$$

Para ajustar los datos con este modelo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la concentración de SSTLM y el Y_{XS} se han considerado constantes a lo largo del proceso degradativo.

$$-\frac{dC_{4-CF}}{dT} = \Gamma_{MAX} \frac{C_{4-CF}}{K_S + C_{4-CF} + C_{4-CF} \cdot \left(\frac{C_{4-CF}}{K_I} \right)^2} \quad [2.7]$$

donde C_{4-CF} es la concentración de 4-CF (mg/L), K_S es la constante de saturación media (mg/L), Γ es la velocidad de eliminación de 4-CF (mg 4-CF/L·min) y Γ_{MAX} la máxima.

Los resultados de los ajustes se recogen en la Tabla 1.4 Los valores de K_S mostraron un valor máximo a diferentes concentraciones para pH 3,5 y 10,5. Sin embargo, a pH 7,0 los valores de K_S muestran una tendencia creciente con las concentraciones de 4-CF. Las mayores V_{MAX} se obtuvieron a pH 7,0, llegando a alcanzar 32,6 mg 4-CF/L·h al tratar 100 mg/L de 4-CF. Para los valores de K_I la tendencia resulta similar a la de V_{MAX} , si bien en este caso la concentración de 4-CF a la que se alcanzan los mayores valores de K_I para pH 3,5 y 10,5 coinciden, para concentraciones mayores a 40 mg/L los valores de K_I a pH 7 son muy superiores, lo que refuerza la conclusión de que pH 7,0 es el óptimo de trabajo.

Tabla 1.4. Valores de los parámetros de ajuste según el modelo de Haldane para las velocidades de consumo de 4-CF a diferentes pHs.

[4-CF] ₀ (mg/L)	pH 3,5			pH 7,0			pH 10,5		
	K_S (mg/L)	V_{max} (mg/L·h)	K_I (mg/L)	K_S (mg/L)	V_{max} (mg/L·h)	K_I (mg/L)	K_S (mg/L)	V_{max} (mg/L·h)	K_I (mg/L)
10	9,45	5,05	40,09	--	--	--	0,38	4,88	12,48
20	92,15	7,78	7,29	1,32	14,04	9,12	3,39	10,05	13,55
40	42,51	9,41	282,78	3,19	12,02	81,45	3,98	7,43	168,22
60	27,08	13,48	98,99	34,84	18,58	149,3	16,89	10,03	89,10
80	5,09	25,54	36,96	68,18	20,27	400,22	387,83	23,15	37,38
100	5,09	27,30	39,515	220,14	32,62	1643,8	5,10	27,30	39,52

Los satisfactorios ajustes mediante el modelo de Haldane pone de manifiesto la presencia de procesos inhibitorios. De igual modo, los rendimientos de eliminación de COT evidencian la falta de aclimatación del lodo empleado. Además, el pH mostró una clara influencia sobre la extensión de la oxidación biológica del COT. Obteniendo los mejores resultados para el ensayo con pH inicial 7,0, alcanzando eliminaciones del 100% para concentraciones de 4-CF menores a 20 mg/L (Fig. 2.16a). Las eficacias obtenidas en la eliminación de COT indican que los metabolitos generados únicamente se degradan eficientemente a pH neutro. Sin embargo, mayores concentraciones de 20 mg/L produjeron un claro descenso en las eficacias de eliminación reduciéndose al 51,2% al tratar 80 mg/L de 4-CF (Fig. 2.16b).

Respecto a los ensayos a pH 3,5, los rendimientos de eliminación de COT fueron muy bajos, por lo que, en este caso la influencia del pH sobre la capacidad degradativa de los metabolitos generados provocó una drástica reducción en la extensión de la biodegradación. Por tanto, la neutralización previa de efluentes ácidos que contengan 4-CF mejora considerablemente los rendimientos de eliminación de COT.

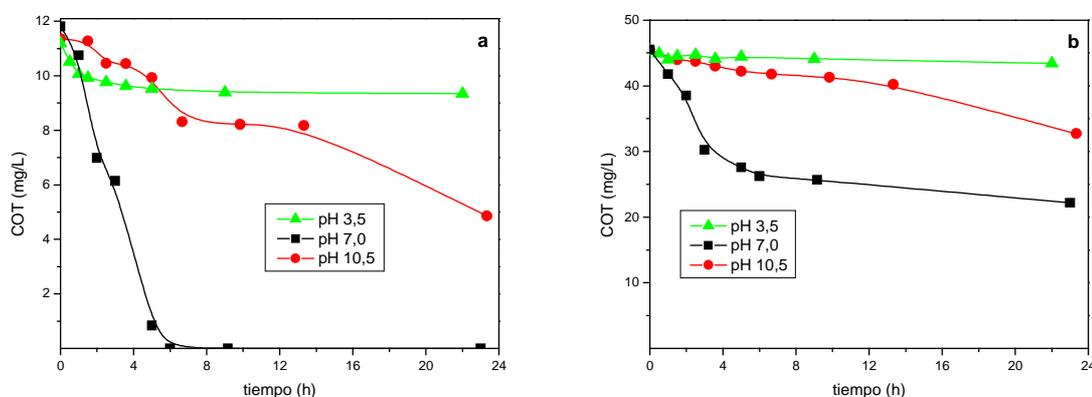


Fig. 2.16. Comparativa de la eliminación de COT a pH inicial 3,5, 7,0 y 10,5 durante la biodegradación de 20 mg/L (a) y 80 mg/L (b) de 4-CF.

Uno de los compuestos intermedios de la degradación aerobia del 4-CF es el 4-CC. La degradación de este compuesto supone una etapa clave a partir de la cual se producirá la rotura del anillo aromático en posición *orto* o *para*, lo que definirá los compuestos intermedios generados a partir de él y la extensión de su oxidación biológica. Como muestra la Fig. 2.17 la concentración máxima de 4-CC alcanzada aumenta a medida que la concentración de 4-CF tratada es mayor. Además, dicho máximo se ve desplazado en el tiempo a medida que se aumenta la concentración inicial

de 4-CF debido a la disminución de la velocidad inicial de degradación del compuesto de partida. Las concentraciones medidas en los ensayos a pH 3,5 fueron mayores a las detectadas a pH 10,5 y a su vez éstas fueron superiores a las detectadas a pH 7,0. Estos resultados indican que el pH influye en las velocidades de síntesis y catabolismo de este compuesto lo cual puede deberse a la pérdida de eficacia de la enzima 4-clorocatecol 2,3-dioxigenasa. En los ensayos a pH 3,5 y 10,5 se detectó una acumulación de 4-CC al final de cada experimento que no fue degradado tras 24 h, lo que explica la reducida eliminación de COT.

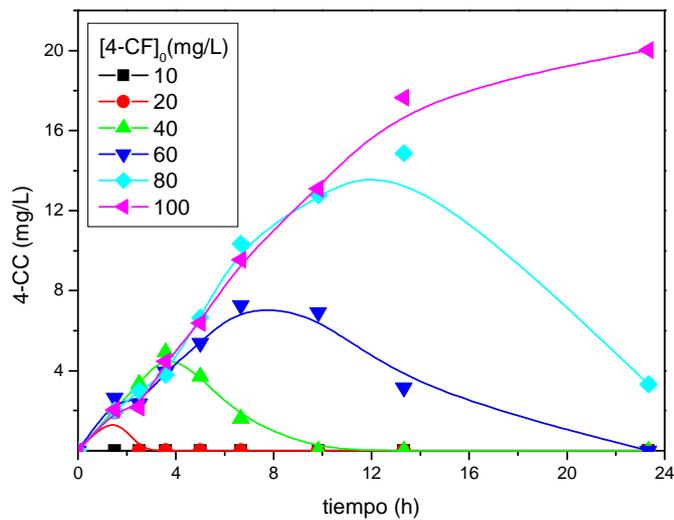


Fig. 2.17. Evolución de la concentración de 4-CC a partir de diferentes concentraciones iniciales de 4-CF a pH 7.

2.3.4. Influencia de la Concentración de Inóculo sobre Puesta en Marcha de Reactores Discontinuos

Un aspecto importante para la puesta en marcha de reactores biológicos es la cantidad de lodo requerida como inóculo. Para su estudio se emplearon tres concentraciones diferentes de 4-CF (20, 50 y 100 mg/L) inoculando diferentes concentraciones de lodo. La concentración de biomasa se mantuvo constante a lo largo de todos los experimentos, por lo que, la producción de biomasa resultó despreciable.

Debido a la toxicidad del 4-CF, el aumento de la concentración del mismo provocó un descenso de la eficacia de eliminación (Fig. 2.18a). En todos los casos el aumento de la concentración de inóculo mejoró los rendimientos de eliminación, sin

embargo, no se logró eliminar totalmente el 4-CF tras 24 h de ensayo, siendo necesario inocular al menos 100 mg/L de SSVLM para obtener la completa eliminación de 20 mg/L.

Por otro lado, el análisis de la eficiencia de eliminación de 4-CF por unidad de biomasa revela como, el aumento de la concentración inicial de inóculo disminuye la cantidad de tóxico degradada tras 24 h por unidad de biomasa (Fig. 2.18b). Este hecho puede deberse a posibles procesos de competencia por sustrato, ya que el intervalo de F/M estudiado va desde 3,24 hasta 0,03 g DQO/g SSVLM, por lo que en unos casos se exceden los límites de F/M recomendados para sistemas de fangos activos y en otros la cantidad de sustrato disponible por unidad de biomasa es muy baja, reduciendo la accesibilidad al sustrato, la velocidad de eliminación y la eficiencia en términos de biomasa.

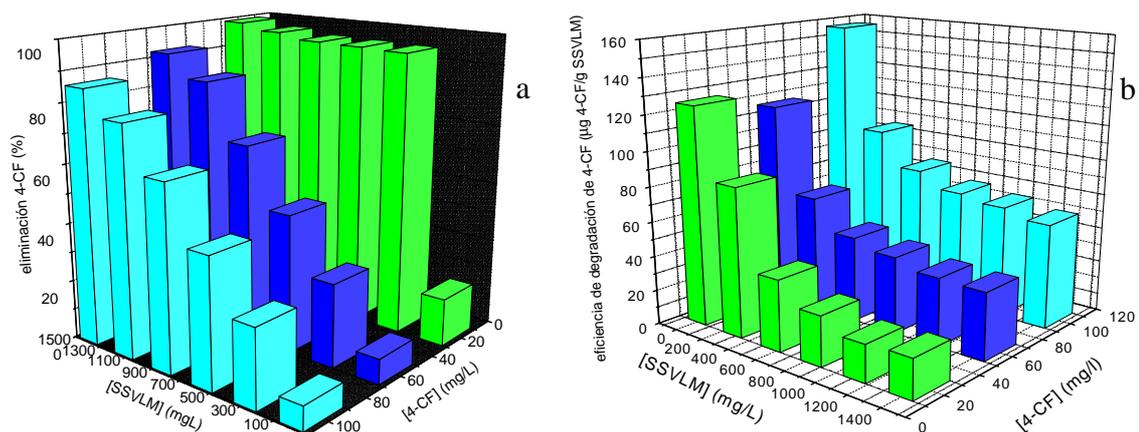


Fig. 2.18. Eficacia (a) y eficiencia (b) de eliminación por unidad de biomasa (μg 4-CF/g SSVLM) de 4-CF tras 24 h de experimento.

La influencia del ratio F/M también se observó en la degradación de COT (Fig. 2.19), observando grandes diferencias en los rendimientos de eliminación del mismo para cada valor de F/M. Dichas diferencias pueden deberse a las diferentes concentraciones de biomasa empleadas.

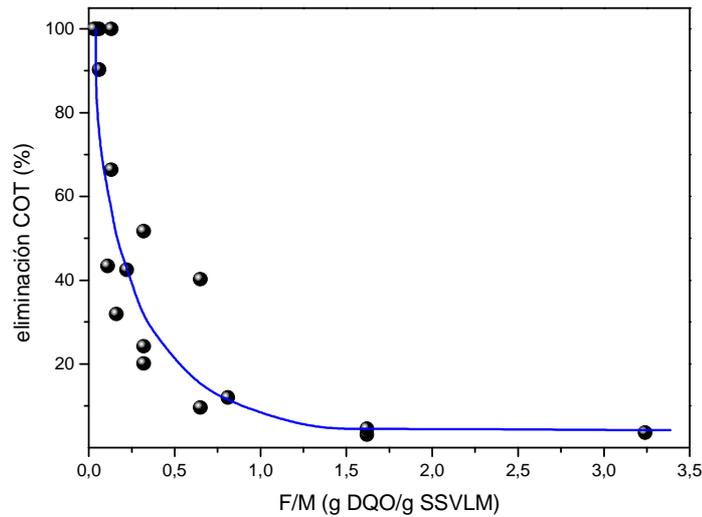


Fig. 2.19. Eficacias de eliminación de COT obtenidas tras 24 h de ensayo empleando diferentes ratios F/M y concentraciones de inóculo.

El análisis de la velocidad media de consumo de COT en función de la concentración de 4-CF representada en la Fig. 2.21 muestra como para concentraciones iniciales de éste superiores a 50 mg/L la relación entre ambas es lineal. Sin embargo, tratando 20 mg/L la proporcionalidad entre la velocidad media de consumo de COT y biomasa se mantiene hasta una concentración de biomasa inferior a 500 mg/L a partir de la cual el perfil de la velocidad de consumo tiende a una asintota, por lo que, un aumento mayor de la concentración de inóculo no aumenta significativamente la velocidad de degradación de COT. Este hecho apoya la hipótesis de una posible limitación por disponibilidad de sustrato.

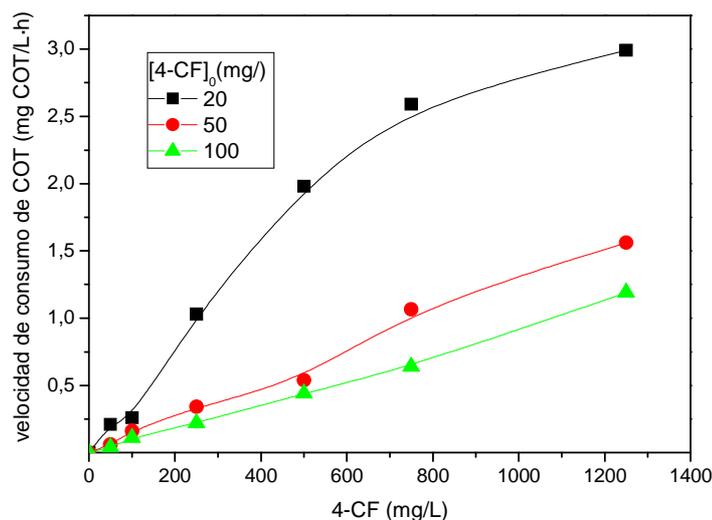


Fig. 2.21. Relación entre la velocidad de consumo de COT y la concentración de biomasa empleada tratando diferentes concentraciones de 4-CF.

El análisis conjunto de la velocidad de consumo de 4-CF y COT muestra como el 4-CF se consume más rápidamente que el COT (Fig. 2.22). Dichas velocidades difieren en mayor medida al emplear concentraciones de biomasa mayores, lo cual indica una posible acumulación de compuestos intermedios en el medio en aquellos ensayos en los que se emplea una mayor concentración de inóculo. El análisis de la evolución de la concentración de 4-CC indica que el aumento de la velocidad de consumo de 4-CF respecto a la de fenol hace que se alcancen mayores concentraciones de 4-CC en el medio (Fig. 2.22).

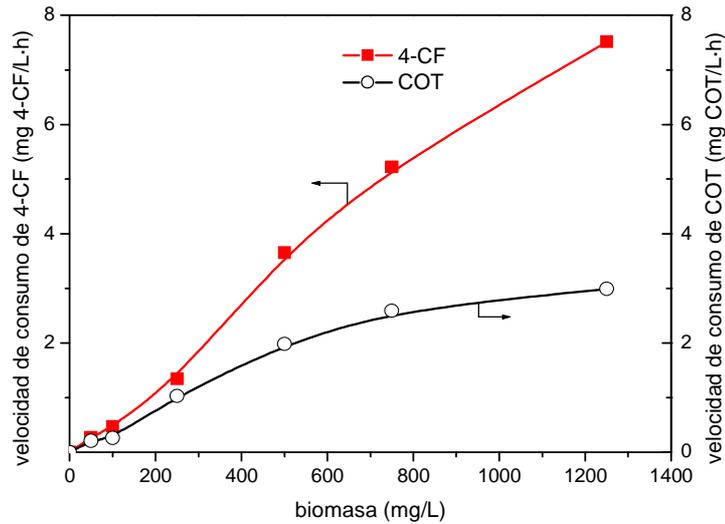


Fig. 2.22. Evolución de las velocidades medias de consumo de 4-CF y COT tratando 20 mg/L de 4-CF empleando diferentes concentraciones de inóculo (50-1250 mg/L).

El empleo en este caso de una fuente de inóculo preaclimatada a la degradación de 4-CF permitió eliminar de 4-CC. Por lo que, la fracción de COT refractaria observada al final de cada ensayo está relacionada con otros compuestos intermedios no identificados.

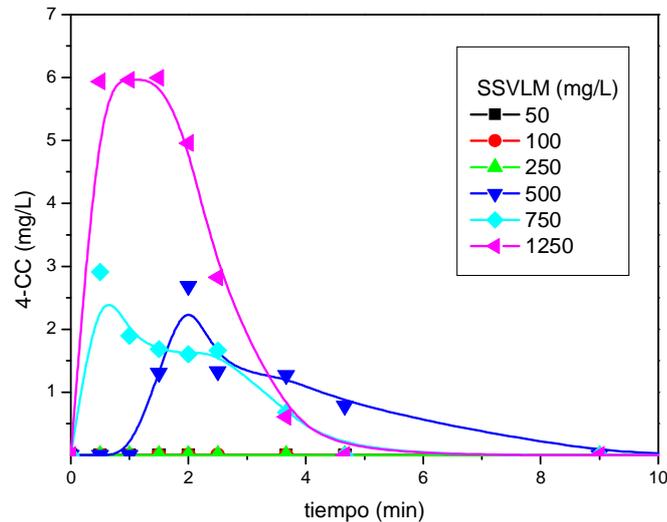


Fig. 2.23. Evolución de la concentración de 4-CC generado durante el tratamiento de 20 mg/L de 4-CF empleando diferentes concentraciones de inóculo.

2.3.5. Eliminación de Nutrientes durante la Degradación Cometabólica de 4-CF

Muchas de las aguas industriales presentan como inconveniente para su tratamiento biológico la falta de nutrientes necesarios para llevar a cabo adecuadamente los procesos metabólicos. La presencia de tóxicos en dichas aguas puede afectar al consumo de nutrientes, por lo que la cantidad de nutrientes añadida también se verá afectada.

La Tabla 2.5 resume la relación calculada entre la DQO teórica inicial y el P requerido durante el tratamiento de dos concentraciones de 4-CF (20 y 80 mg/L) añadiendo cosustratos en diferentes proporciones $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$ (1:0,25 - 1:2). Como puede observarse la adición de cosustratos hace que el P consumido sea mayor que el que se requiere en la degradación de 4-CF como único sustrato. Los mayores rendimientos de eliminación de P se obtuvieron al añadir glucosa como cosustrato. A pesar de que el tratamiento de 4-CF en SBR con fenol como cosustrato se llevará a cabo empleando diferentes relaciones $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$, teniendo en cuenta el consumo de P obtenido, se utilizará una relación 10 veces menor a la empleada comúnmente, estableciendo una relación DQO/P de 100/0,1, para evitar así la acumulación de P en el medio. En el caso del N, se empleará la relación clásica N/P de 5/1 (Metcalf y Eddy, 2000).

Tabla 2.5. Relación entre DQO consumida y P requerido (DQO:P; 100:x; w:w) tratando 20 y 80 mg/L de 4-CF sin cosustratos y añadiendo diferentes cosustratos.

[4-CF] (mg/L)	$DQO_{4-CF}/DQO_{cosustr.}$	sin cosustrato	catecol	c-hexanol	fenol	glucosa
20	1:2	0,07	0,19	1,21	1,49	1,46
	1:1		0,37	1,15	1,35	1,44
80	1:0,5	0,05	0,08	0,30	0,14	0,76
	1:0,25		0,07	0,06	0,04	0,19

El consumo de P mostró una gran variabilidad, alcanzando rendimientos de eliminación entre el 38 y 95% tratando 20 mg/L de 4-CF y entre el 2,5 y 40% para 80 mg/L. Por lo que tanto la concentración de 4-CF como el cosustrato empleado mostraron un efecto importante sobre la degradación de PO_4^{3-} . Dicha influencia provocó

modificaciones en el consumo de PO_4^{3-} aún mayores que las presentadas por Kargi *et al.* (2005) al analizar el efecto del tiempo medio de residencia celular sobre su eliminación.

2.3.6. Influencia de la Adaptación a Fenol sobre el Tratamiento de 4-CF durante la Puesta en Marcha de Reactores

Con el objetivo de establecer una estrategia óptima durante la puesta en marcha de bioreactores para el tratamiento de 4-CF, en este apartado se estudia la influencia de la adaptación y la presencia de fenol en la oxidación del 4-CF.

En la Fig. 2.25 se resumen los rendimientos de eliminación de COT y 4-CF tras 24 h. Dichos resultados evidencian una notable influencia positiva de la aclimatación al fenol para todo el conjunto de ensayos, independientemente de la concentración de 4-CF tratada y de la presencia o no de cosustrato.

Respecto al análisis de la influencia de la concentración de 4-CF tratada, se observa que las eficacias de eliminación tanto de 4-CF como de COT al emplear un lodo aclimatado disminuyen considerablemente de 20 a 80 mg/L, mientras que para un lodo no aclimatado no se observaron diferencias significativas.

Del estudio de la influencia del empleo de cosustrato se concluye que el sistema mejora con la adición de fenol. Sin embargo, aunque el aumento de la eficacia de eliminación tanto de 4-CF como de COT fue notable para un lodo no adaptado, la adición de fenol empleando lodo aclimatado no provoca grandes mejoras de los rendimientos de eliminación.

El efecto tóxico del 4-CF hace que el aumento de su concentración de 20 a 80 mg/L provoque una disminución del rendimiento de eliminación de 4-CF y de la extensión de la oxidación. Dicho efecto fue mucho mayor en el caso de emplear lodo aclimatado, ya que los rendimientos obtenidos tratando concentraciones bajas de 4-CF tras la aclimatación a fenol son muy elevados respecto al lodo no adaptado, alcanzando eficacias similares cuando se tratan 80 mg/L.

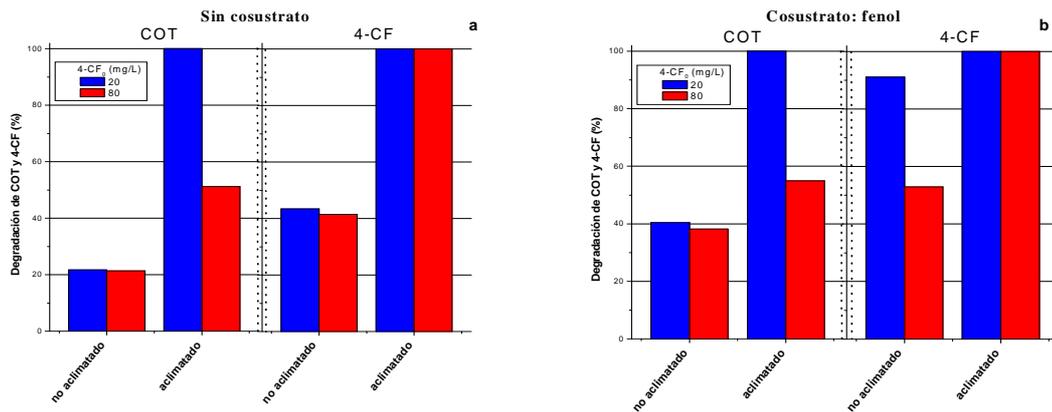


Fig. 2.25. Eficacias de eliminación de COT y 4-CF tras 24 h de la puesta en marcha de reactores empleando lodo no aclimatado y previamente aclimatado a fenol tratando 4-CF sólo (a) o con fenol (b). Condiciones iniciales: [4-CF] = (20 y 80 mg/L).

Del análisis anterior puede concluirse que los mejores resultados se obtienen simultaneando una aclimatación previa a fenol y el empleo de fenol como cosustrato durante la degradación de 4-CF. En la Fig. 2.26 se muestra la evolución de la concentración de 4-CF para todas las condiciones establecidas en el presente estudio. En ella puede verse la gran diferencia que existe entre las velocidades de degradación de un lodo aclimatado y no aclimatado. El aumento de la concentración de 4-CF tratada hace que, para aquellos ensayos en los que se logra la completa degradación de 4-CF, el tiempo mínimo requerido aumente considerablemente. La influencia del proceso cometabólico es mayor cuando se emplea lodo no aclimatado que cuando se aclimata. Si bien para los experimentos con lodo aclimatado se observan diferentes tendencias, no se observan diferencias significativas en el tiempo necesario para degradar el 4-CF. Este proceso puede deberse a que durante las primeras horas la actividad biodegradativa se centra en la degradación del cosustrato para, finalmente, degradar el 4-CF.

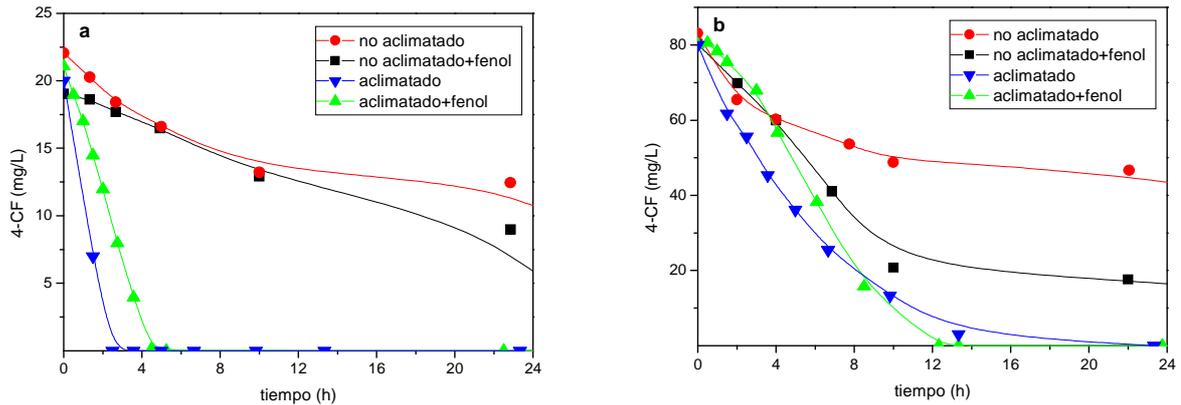


Fig. 2.26. Evolución de la concentración de 4-CF empleando lodo no aclimatado y aclimatado a fenol, y en presencia o no de fenol como cosustrato tratando 20 (a) y 80 (b) mg/L de 4-CF.

En la Tabla 2.6 se resumen las velocidades específicas medias de consumo de 4-CF. En aquellos ensayos en los que el lodo se adaptó previamente a fenol, dicha velocidad es dos órdenes de magnitud mayor que para el no aclimatado. La velocidad específica empleando un lodo no aclimatado fluctuó entre 3,4 y 13,2 mg 4-CF/g SSVLM·d al tratar 20 y 80 mg/L de 4-CF, dicha velocidad es notablemente mayor que el 1,8 mg 4-CF/g SSVLM·d obtenido por Buitrón *et al.* (1998), indicando la elevada capacidad de la mezcla de lodos biológicos industriales empleada en el presente estudio. El empleo de fenol como cosustrato también supone un método positivo para aumentar la velocidad de consumo pero, como se puntualizó anteriormente, para el experimento de 20 mg/L de 4-CF mediante lodo aclimatado, la adición de fenol provoca una reducción de la velocidad.

Tabla 2.6. Velocidad media específica de consumo de 4-CF (mg 4-CF/g SSVLM·d) empleando lodo no aclimatado y aclimatado a fenol, en presencia y ausencia de fenol.

Aclimatación a fenol	Cosustrato (fenol)	4-CF ₀ (mg/L)	
		20	80
No	No	3,36	13,20
No	Si	3,60	22,80
Si	No	415,68	414,16
Si	Si	333,36	544,32

III. TRATAMIENTO DE 4-CF CON BIOMASA SUSPENDIDA EN SBR

“You know my methods, Watson”,

Sir Arthur Conan Doyle, The Crooked Man (1859-1930).

3.1. Introducción

Los clorofenoles representan el grupo más importante de xenobióticos que aparecen en aguas residuales industriales de diferente procedencia, debido a su empleo como herbicidas, insecticidas, fungicidas, conservadores de la madera, resinas y lubricantes. Los sistemas SBR han sido empleados eficientemente en la eliminación de compuestos fenólicos y clorofenólicos de efluentes acuosos industriales. En este sentido, las principales estrategias para aumentar el rendimiento de eliminación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales mediante SBR incluyen la adición de fuentes de carbono externas, modificación de la secuencia de tratamiento o variables de operación y cambio de la estructura y composición del lodo biológico.

El empleo de cosustratos se ha establecido como un método adecuado para aumentar la velocidad de biodegradación de los clorofenoles y lograr la completa eliminación de dichos compuestos (Tarighian *et al.*, 2003; Sahinkaya y Dilek, 2006a). Las fuentes de carbono más ampliamente utilizadas en el tratamiento de aguas residuales industriales que contienen compuestos difícilmente biodegradables son los azúcares (Basu y Oleszkiewicz, 1995; Wang y Loh, 1999a; Tarighian *et al.*, 2003) y la peptona (Sahinkaya y Dilek, 2006a y b). En algunos casos se ha empleado fenol como cosustrato por su similitud en cuanto a naturaleza química, observándose una mejora en la eliminación de clorofenoles (Basu y Oleszkiewicz, 1995; Chiavola *et al.*, 2004). Además, fenol y clorofenoles pueden aparecer en los efluentes resultantes del tratamiento de clorofenoles mediante hidrodecloración catalítica (Calvo *et al.*, 2004) o en el tratamiento biológico de aguas residuales que contengan clorofenoles (Berestovskaya *et al.*, 1995).

El tratamiento de compuestos difícilmente biodegradables mediante SBR puede optimizarse empleando diferentes estrategias de operación. Estudios recientes han concluido que la etapa de llenado tiene una gran influencia sobre la eficacia de eliminación de dichos compuestos, obteniendo una elevada estabilidad durante largos periodos de operación a base de controlar la duración de la etapa de llenado (Betancur *et al.*, 2006; Moreno-Andrade y Buitrón, 2008). Por lo tanto, el tiempo de llenado es una variable importante en la degradación de compuestos clorofenólicos, ya que valores demasiado cortos llevan a un descenso de la velocidad de degradación, llegando a

provocar la inhibición del sistema por la acumulación de los clorofenoles en el medio (Sahinkaya y Dilek, 2007). Sin embargo, la influencia del caudal de alimentación no ha sido suficientemente estudiada ya que su efecto no se ha analizado individualmente.

La temperatura es otra de las variables con gran influencia sobre la biodegradación de clorofenoles. En general, el tratamiento de aguas contaminadas por clorofenoles no es propicio realizarlo a temperaturas bajas (Valo *et al.*, 1990; Stinson *et al.*, 1991; Piotrowski *et al.*, 1994), por lo que, la mayoría de los trabajos sobre el tratamiento de compuestos fenólicos clorados mediante SBR se han realizado a temperaturas próximas a la ambiente (15-25 °C). Melin *et al.* (1998a) demostraron que la temperatura tiene un efecto determinante sobre la velocidad de eliminación del 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol, de forma que, un aumento de la temperatura de operación de 10 °C aumenta más de 7 veces la velocidad de degradación de estos compuestos.

Una de las mayores dificultades para el tratamiento biológico de clorofenoles es el bajo crecimiento celular, el cual suele alcanzar una producción neta de 0,03 mg SSV/mg CF eliminado (Mäkinen *et al.*, 1993). Esto puede deberse a que dicho compuesto parece actuar como desacoplador metabólico o protonóforo, lo cual hace necesario el empleo de sistemas con una elevada capacidad de retención de biomasa, que pueden operar con elevadas cargas hidráulicas y concentración de biomasa. En este sentido, una de las técnicas más prometedoras para la intensificación de los sistemas SBR es la granulación aerobia (Beun *et al.*, 1999; Morgenroth *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2001c,d; de Bruin *et al.*, 2004). Los gránulos aerobios, comparados con los fangos activos floculentos, tienen una forma más definida, una estructura más compacta y robusta, permitiendo una puesta en marcha más rápida, mejor sedimentabilidad y mayor capacidad para soportar cargas elevadas (Chen *et al.*, 2008). Una definición para distinguir entre un gránulo aerobio y un simple flóculo con buena sedimentabilidad se propuso en los debates que tuvieron lugar durante el 1^{er} IWA-Workshop Aerobic Granular Sludge (Munich, 2004): “Los gránulos que forman un lodo granular aerobio son agregados de origen microbiano que no coagulan en condiciones de bajo estrés hidrodinámico y que sedimentan significativamente más rápido que los flóculos de lodo activo” (de Kreuk *et al.* 2005). A pesar de que hoy en día no se conoce con exactitud su mecanismo de formación, se sabe que son muchos los factores que

influyen en la formación y estructura del lodo granular aerobio, como los polímeros extracelulares, la velocidad superficial de aereación, la hidrodinámica del sistema y la carga aplicada (Zima *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Así, los sistemas SBR reúnen muchas de las condiciones necesarias para la formación de gránulos, mediante el empleo de:

- Periodos de ayuno: En el SBR pueden utilizarse tiempos de llenado relativamente cortos con periodos de sobrealimentación seguidos de periodos de ayuno (Beun *et al.*, 1999). De este modo, se seleccionan aquellos microorganismos formadores de gránulos, ya que estos almacenan materia orgánica en forma de poly- β -hidroxibutirato que pueden consumir posteriormente en el periodo de ayuno.

- Tiempos cortos de sedimentación: Mediante la presión hidráulica selectiva se favorece la retención de biomasa granular frente a la floculenta (Qin *et al.*, 2004).

- Estrés hidrodinámico: El aumento del esfuerzo cortante genera gránulos más regulares, redondeados y compactos, lo que mejora las características físicas de los mismos (Tay *et al.*, 2001c).

La experiencia en sistemas granulares a escala industrial es limitada, sin embargo, desde 1999, DHV Water, la Delft University of Technology (TUD), la STW (Dutch Foundation for Applied Technology) y la STOWA (Dutch Foundation for Applied Water Research) trabajan conjuntamente en el desarrollo de la tecnología de lodos granulares aerobios (Nereda™). Otra tecnología granular interesante es la ARGUS (Aerobic Granules Upgrade System) basada en el empleo de gránulos aerobios obtenidos en propagadores.

Los SBR granulares presentan una mayor estabilidad, flexibilidad y adaptabilidad a condiciones de operación fluctuantes que los SBR convencionales con biomasa floculenta, reduciendo los efectos adversos de sobrecargas y choques tóxicos. Estos sistemas permiten el tratamiento de elevadas cargas volumétricas, el desarrollo de procesos de nitrificación-desnitrificación simultánea (Beun *et al.*, 1999) y la reducción tanto del coste de operación como del espacio requerido en un 20 y 25%, respectivamente (de Kreuk *et al.*, 2004).

Los trabajos realizados con gránulos aerobios se han centrado principalmente en el proceso de formación y estabilidad de los mismos, la eficiencia en la eliminación de nutrientes bajo diferentes condiciones de operación y su capacidad para el tratamiento de compuestos tóxicos. A pesar de que el potencial de esta tecnología para el tratamiento de aguas residuales industriales se encuentra bajo estudio, existen trabajos que han mostrado su aplicabilidad para el tratamiento de aguas industriales procedentes del sector lácteo (Arrojo *et al.*, 2004), mataderos (Cassidy y Belia, 2005), industria cervecera (Schwarzenbeck *et al.*, 2004), metalúrgica (Tsuneda *et al.*, 2006) y farmacéutica (Inizan *et al.*, 2005).

La capacidad de los gránulos aerobios para eliminar la materia orgánica particulada presente en las aguas depende en gran medida del tamaño de los sólidos en suspensión, reduciéndose la eficacia del 80 al 40% cuando el tamaño de éstos aumenta de 25 a 50 μm (Schwarzenbeck *et al.*, 2004). La incorporación de las partículas a la matriz de la biopelícula y la actividad metabólica de los protozoos que cubren los gránulos son los principales mecanismos para la eliminación de los sólidos.

La inhibición provocada por la presencia de fenoles y clorofenoles en las aguas residuales puede reducirse mediante la granulación del lodo (Keweloh *et al.*, 1989), logrando una aclimatación a la presencia de dichos compuestos más rápida y manteniendo una estructura compacta y una buena sedimentabilidad de los gránulos incluso a elevadas concentraciones de estos tóxicos (Jiang *et al.*, 2004a), lo que hace que el tratamiento de aguas fenólicas mediante lodo granular sea más eficaz que el sistema de fangos activos floculentos (Tay *et al.*, 2005). Esta técnica permite el tratamiento de concentraciones de fenol de hasta 2 g/L (Adav *et al.*, 2007a), alcanzando velocidades específicas de degradación entre 49 (Adav *et al.*, 2007b) y 1 g fenol/g SSV·h (Tay *et al.*, 2005).

Existen trabajos sobre el tratamiento de derivados fenólicos, como hidroquinona, 4-nitrocatecol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 4-nitrofenol, 2,4,6-triclorofenol y 4-clorofenol (Shan *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b; Carucci *et al.*, 2008, 2010), empleando gránulos anaerobios. Así, durante el tratamiento cometabólico de 4-CF con acetato sódico se observó una elevada resistencia de los gránulos hasta concentraciones de 4-CF de 50 mg/L (Carucci *et al.*, 2008, 2010), empleando logrando la completa eliminación de este compuesto.

En el presente capítulo se estudia la eliminación simultánea de 4-CF y fenol en reactores secuenciales discontinuos evaluando el efecto de la temperatura en el funcionamiento del sistema, la evolución de los intermedios generados y la toxicidad a lo largo del proceso. Además, se estudia la aplicabilidad del sistema SBR para la eliminación de 4-CF como única fuente de carbono y energía, analizando la influencia del caudal de alimentación y la granulación de la biomasa sobre el sistema.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Reactores Discontinuos Secuenciales

Se emplearon reactores cilíndricos de 2,1 L (Fig. 3.1a) y de sección rectangular con fondo inclinado de 5 L (Fig. 3.1b) construidos en vidrio y polimetacrilato de metilo, respectivamente, aereados mediante compresores y difusores cerámicos, agitados mecánicamente mediante rotores tipo hélice y equipados con toma de muestras y llave inferior de purga de lodos. Los reactores de vidrio estaban termostatizados con una camisa exterior con recirculación de agua. La alimentación y extracción de influente y efluente de los reactores, así como la adición de NaOH (1 M) para controlar el pH, se realizó mediante bombas peristálticas (Gilson minipulse 3). Se trabajó a 20, 30 y 35 °C, con un t_{HR} de 10,5 d. Los reactores sin control de temperatura emplearon un t_{HR} de 25 d. Estos reactores sirvieron como sistemas de aclimatación de biomasa, la cual fue utilizada como fuente de inóculo para el resto de ensayos.

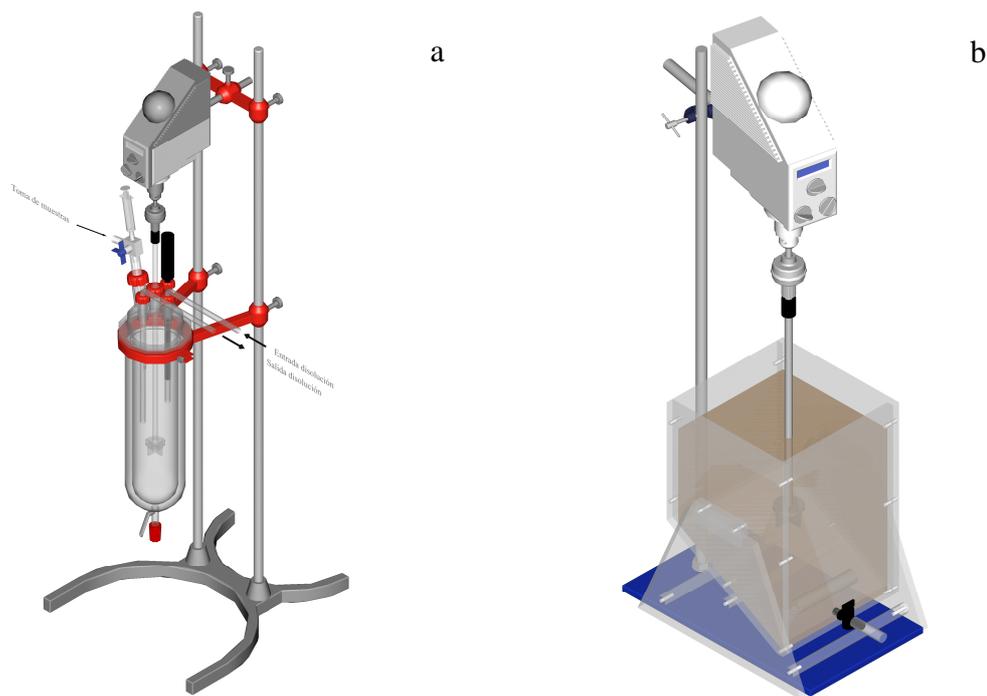


Fig. 3.1. Esquema de los SBR termostatzados (a) y de aclimatación de biomasa (b).

Los SBR se operaron en ciclos de 12 h, con las siguientes cinco etapas (Fig. 3.2): llenado anóxico (1 h), reacción aerobia (9,5 h), decantación (1 h) y vaciado (0,5 h). Los reactores operaron ininterrumpidamente llevando a cabo cíclicamente las etapas establecidas gracias a la automatización de los diferentes componentes mediante el empleo de programadores con temporizador (Bricolux).

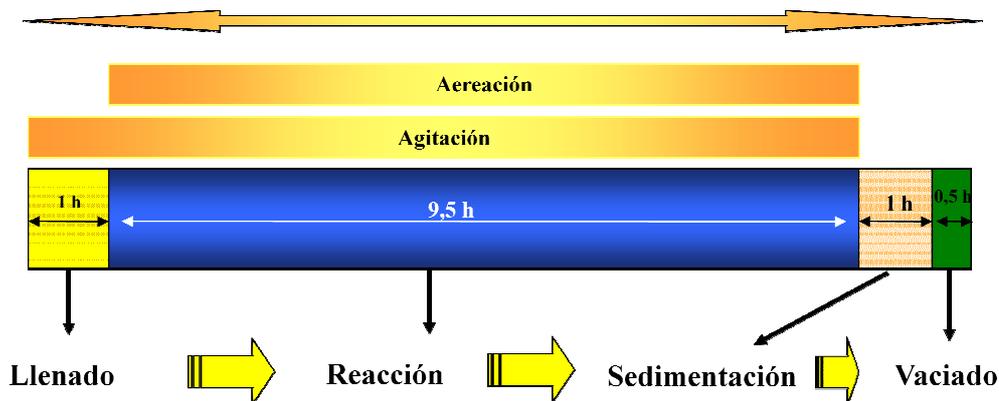


Fig. 3.2. Esquema de las fases empleadas en cada ciclo.

En el estudio de la influencia del caudal de alimentación sobre la degradación de 4-CF se operó con tres caudales (0,75, 0,24 y 0,1 L/h), empleando biomasa floculenta,

se mantuvo fijo el tiempo de llenado (1 h) y se trataron las mismas concentraciones de 4-CF en el interior del reactor para cada uno de los caudales estudiados, variando la concentración de 4-CF en el influente.

3.2.2. Fuente de Inóculo

El inóculo empleado en los reactores se tomó del reactor biológico de fangos activos de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales. La aclimatación del fango biológico se realizó durante dos meses a temperatura ambiente, empleando concentraciones de 4-CF en el interior del reactor de 5 mg/L. La concentración de biomasa en los reactores se mantuvo entre 2.000 y 3.000 mg SSV/L a lo largo de la experimentación.

3.2.3. Composición del Agua Tratada

La disolución alimentada contenía una concentración fija de fenol y concentraciones crecientes de 4-CF (Tablas 2.1 y 2.2), junto con una fuente de nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes necesarios para llevar a cabo eficientemente el proceso biológico de degradación. Se estableció una relación óptima en términos de DQO:N:P:micronutrientes de 100:0,5:0,1:0,05, con la que se observó una eliminación óptima de los diferentes compuestos. En la Tabla 3.1 se recoge la composición en nutrientes de los influentes tratados. El influente se mantuvo a 6 °C para evitar la volatilización de los compuestos tóxicos.

Tabla 3.1. Composición en nutrientes del influente tratado.

Compuesto	Concentración en influente
Sulfato amónico	100:0,5 (DQO:N)
Ácido fosfórico, 85%	100:0,1 (DQO:P)
Cloruro de hierro (III) 6-hidrato	
Cloruro cálcico anhidro	100:0,05 (DQO:cación)
Cloruro potásico	
Sulfato magnésico	
pH	7-10

La estrategia de mantener la concentración del sustrato primario (fenol) aumentando paulatinamente la del cometabolito (4-CF) ha sido previamente contrastada

por Wang *et al.* (2007). Para asegurar la estabilidad del sistema, antes de la toma de datos, el reactor operó con cada una de las concentraciones tratadas durante al menos 3 semanas.

Tabla 3.2. Condiciones de operación empleadas en los reactores termostatzados.

[4-CF] influente (mg/L)	[4-CF] reactores teórica (mg/L)	[Fenol] (mg/L)	T (°C)	Tiempo (d)
105	5			0 - 60
420	20		20	61 - 101
840	40	525	30	102 - 139
1.050	50		35	140 - 169
1.470	70			170 - 200
2.100	100			201 - 240

3.2.4. Métodos Analíticos

3.2.4.1 Análisis físicos

Sólidos en suspensión totales y volátiles del licor mezcla

La determinación de los sólidos en suspensión totales (SSTLM) y volátiles (SSVLM) se realizó según el procedimiento establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA-AWWA-WPCF, 1992). Se emplearon filtros de fibra de vidrio (Filtros de microfibra de vidrio: ALBET[®] ref. FV-C) y una estufa (GALLENKAMP, Hotbox Oven with Fan, size 1) para el secado hasta peso constante.

Las sustancias que se descomponen entre 105 y 550 °C se consideran sólidos volátiles. Los sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla (SSVLM) se emplean como medida de la fracción orgánica de los sólidos en suspensión (biomasa principalmente).

V₃₀

El método consiste en dejar reposar 1 L de licor mezcla durante 30 min en un decantador Imhoff. Los resultados se expresan en mL de fango/L de licor mezcla. Durante la observación macroscópica de la sedimentabilidad del fango pueden distinguirse tres tipos de flóculos:

- Flóculos pequeños y dispersos con decantación lenta. Su sedimentación presenta una fase de contracción poco definida, con una amplia interfase fango-sobrenadante. Este tipo de flóculos es característico de fangos muy mineralizados, independientemente del rendimiento obtenido en la depuración.
- Los flóculos más grandes se aglomeran y sedimentan rápidamente con una interfase fango-sobrenadante bien definida. La fase de fango se contrae progresivamente. Este es el comportamiento de un fango activo trabajando a baja o media carga en condiciones de oxigenación adecuadas.
- Flóculos poco definidos que permanecen en suspensión o sedimentan muy lentamente. Es característico de episodios con proliferación de bacterias filamentosas que impiden la agregación de los flóculos.

Índice volumétrico de fangos

El índice volumétrico de fangos (IVF) o índice de Mohlman se define como el volumen ocupado por un gramo de fango seco después de 30 min de decantación. Los valores de este índice suelen ser inferiores a 150 mL/g, incrementándose cuando se producen problemas de decantación del fango.

$$\text{IVF (mL/g)} = V_{30} \text{ (mL/L)} / \text{SSTLM (g/L)}$$

La cohesión entre los flóculos determina la capacidad de sedimentación del fango y la clarificación del efluente depurado. Dichos flóculos tienen un aspecto más o menos globuloso y se aglomeran formando redes constituyendo agregados que sedimentan mejor.

3.2.4.2 Análisis químicos

Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (OD) es un parámetro fundamental en los tratamientos biológicos aerobios. Analizando su evolución puede calcularse la velocidad de consumo de oxígeno, la cual está directamente relacionada con la actividad del lodo.

El oxígeno se aporta al reactor biológico esencialmente vía aeración forzada del agua. La concentración de OD se midió mediante un oxímetro marca YSI incorporated.

Carbono orgánico total (COT)

El contenido en carbono de las muestras de agua se determinó mediante un analizador de COT Shimadzu, TOC-Vcsh. Este analizador permite determinar la concentración de carbono total (C_T) y carbono inorgánico (C_I), calculando por diferencia el COT.

Para la determinación del C_T la muestra a analizar se oxida con aire a 680 °C en un tubo de cuarzo relleno de catalizador de Pd/Alumina. El CO_2 generado se cuantifica mediante un detector infrarrojo. Para la cuantificación del C_I , se inyecta una nueva fracción de muestra a un depósito donde se acidifica con ácido fosfórico (25% en peso). En estas condiciones, el carbono inorgánico asociado a la presencia de carbonatos y/o bicarbonatos se desprende de la alícuota en forma de CO_2 que se cuantifica mediante el mismo detector.

Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) constituye una técnica ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a sustancias traza (Skoog et al., 1994).

Se empleó un cromatógrafo HPLC/PAD (Prostar, Varian), con detector UV/VIS. Para la cuantificación de fenol y 4-CF se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua mQ (40:60), con un caudal de 1 mL/min. Como estacionaria se empleó una fase inversa C-18 con tamaño de partícula de relleno de 1,4'' (Valco Microsorb-MW 100-5 C-18), empaquetada en una columna de 25 cm de longitud con un diámetro interior de 4,6 mm. En el caso del 4-CC la fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo:ácido acético (75 mM) en una proporción 30:70.

En la Tabla 3.3 se recogen los valores de los principales parámetros para el análisis de los compuestos orgánicos mediante HPLC.

Tabla 3.3. Condiciones empleadas en los análisis por HPLC

Métodos	Fenol + 4-CF	Fenol + 4-CF + 4-CC
Caudal (mL/min)	1	0,8
T ^a columna (°C)	40	40
Long. de onda (nm)	210 y 280	210 y 270
Volumen muestra (μL)	100	100
Tiempo (min)	10	20
Fase móvil	ACN:mQ (40:60)	ACN:Acético (30:70)

Cromatografía iónica

La cuantificación de especies como PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , etc., se realizó mediante cromatografía iónica. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Metrohm 790 Personal IC, empleando una columna Metrosep A Supp5-250 de 25 cm de longitud y 4 cm de diámetro interno. Como eluyente se utilizó una mezcla acuosa de hidrógeno-carbonato de sodio 1mM y carbonato de sodio 3,2 mM (1:1, vol.), con un caudal de 0,7 mL/min.

3.2.4.3 Análisis biológicos

Bioindicación

La observación de la microbiota que compone el fango activo puede determinar el grado de aclimatación o desarrollo de éste, permitiendo la detección de problemas operativos, como: deficiencias en la aereación, sobrecarga, efectos tóxicos, etc. El estudio microscópico del lodo se realizó mediante un microscopio óptico (Nikon, YS100).

Los microorganismos más importantes en las reacciones de oxidación de la materia orgánica son principalmente bacterias, protozoos, rotíferos, algas y hongos. El papel fundamental de los protozoos en los procesos biológicos es la depredación de bacterias. Los rotíferos aparecen habitualmente en procesos de autooxidación o respiración endógena, indicando con su presencia un proceso de depuración altamente eficiente.

La observación microscópica junto a la V_{30} , proporcionan la información necesaria para la caracterización del flóculo. Además del flóculo bacteriano propiamente dicho, en la observación microscópica, aparecen cuerpos no floculados (restos vegetales y minerales), bacterias libres o asociadas formando filamentos y microfauna o flora protozoaria (protozoos, pequeños metazoos, algas, etc.).

Ecotoxicidad

El ensayo de toxicidad empleado en el presente trabajo fue el Test Microtox® el cual se basa en el empleo de una bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) como indicador de toxicidad. Se trata de un método estandarizado descrito en la norma ISO 11348-3.

Debido a que la bacteria se suministra liofilizada es necesario rehabilitarla mediante la adición de disolución reconstituyente, suministrada por *Azur Environmental*. Su sensibilidad al pH obliga a ajustar previamente el mismo en el intervalo 6-8. Además, al tratarse de un organismo marino, es preciso añadir un regulador de la presión osmótica (disolución NaCl 2% en peso). La determinación de la ecotoxicidad se llevó a cabo según el Microtox® Basic Test.

Para cuantificar la toxicidad de la muestra se emplea el índice IC_{50} (mg/L), que se define como la concentración efectiva de la muestra (EC_{50} en el caso de ser disoluciones de un compuesto determinado) que causa una inhibición del 50% en el metabolismo de la bacteria. El tiempo de contacto que establece el método es de 15 min, aunque en el caso de compuestos orgánicos, también se hace referencia al dato obtenido a los 5 minutos. El valor de IC_{50} es inversamente proporcional a la toxicidad biológica de la muestra, que se expresa en unidades de toxicidad (U.T.). La relación entre ambos parámetros viene dada por:

$$U.T. = \frac{100}{IC_{50}}$$

Respirometría

Los ensayos respirométricos se llevaron a cabo mediante un respirómetro tipo LSS (P2004-02908) en el que la medida de OD se realiza en fase líquida. Los ensayos se realizaron tanto *in situ* como en botellas respirométricas. El respirómetro contó con

sensores de OD (Mettler, IMPRO-6000) acoplados a un transductor (Mettler, 4050E), placas agitadoras, baño termostatzado y sistemas de aereación con difusores cerámicos acoplados.

En el balance de materia de los respirómetros tipo L solamente hay que tener en cuenta la fase líquida:

$$\frac{d[OD]}{dt}V_L = Q_{in} \cdot S_{in} - Q_{out} \cdot S_{out} + V_L \cdot K_L a \cdot (OD^* - OD) - V_L \cdot VECO \quad [3.1]$$

donde, Q_{in} y Q_{out} son los caudales de entrada y salida, S_{in} y S_{out} son las concentraciones de sustrato en la entrada y la salida, $K_L a$ es el coeficiente volumétrico global de transferencia de oxígeno, OD^* indica la concentración de saturación de OD en las condiciones de operación, y $VECO$ es la velocidad específica de consumo de oxígeno. En el caso particular de los LSS, no es necesario tener en cuenta los flujos másicos:

$$\frac{d[OD]}{dt}V_L = V_L \cdot K_L a \cdot (OD^* - OD) - V_L \cdot VECO \quad [3.2]$$

Teniendo en cuenta que el intervalo de concentración de OD empleado está próximo a la saturación, y que, durante el periodo de registro de datos no se aporta oxígeno, el término de transferencia de la fase gas en la Ec. 3.2 puede eliminarse:

$$\frac{d[OD]}{dt}V_L = -V_L \cdot VECO \quad [3.3]$$

La variación de volumen por la toma de muestras puede considerarse despreciable frente al volumen de reacción, por lo que la velocidad específica de consumo de oxígeno ($VECO$) es la derivada de la curva de concentración de OD:

$$\frac{d[OD]}{dt} = VECO \quad [3.4]$$

Con el fin de evitar la difusión de oxígeno al medio de reacción y poder considerar dichas simplificaciones es necesario que el respirómetro esté herméticamente cerrado y no exista interfase líquido-gas. Para poder reoxigenar cíclicamente el sistema cerrado, el respirómetro cuenta con un dispositivo para recircular el líquido (Fig. 3.3). En el periodo de aereación, el líquido y el aire excedentario se desplazan por el sistema

auxiliar que cuenta con un depósito de rebose en línea. Al parar la aeración, el líquido desplazado vuelve al reactor por gravedad. Mediante este sistema las respirometrías pueden realizarse automáticamente con sucesivos ciclos de aereación a lo largo del experimento. Para realizar las respirometrías *in situ* los SBR contaron con una válvula de aliviadero por la que evacuar el aire sobrante.

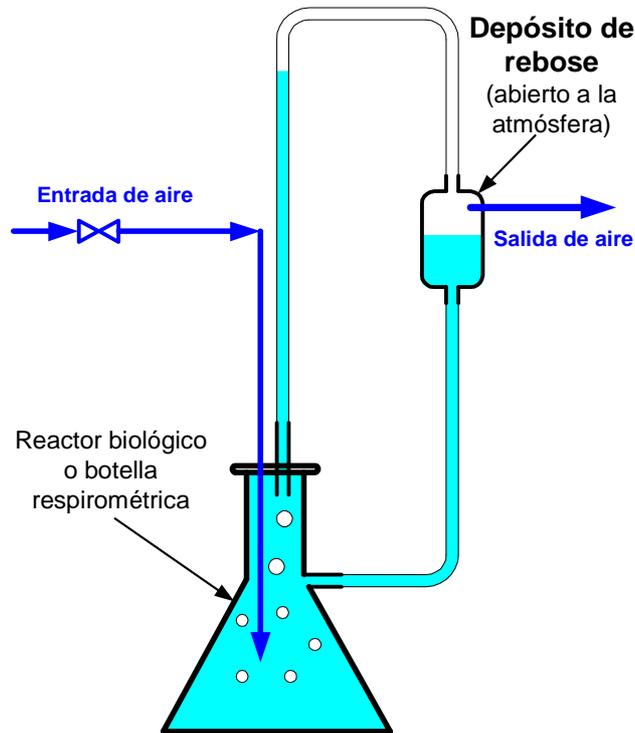


Fig. 3.3. Esquema del sistema de recirculación del respirómetro.

En la Fig. 3.4 se resume el diagrama de funcionamiento del respirómetro discontinuo, el cual se rige por valores de consigna de concentraciones mínima y máxima de OD. A partir de las pendientes de caída de OD entre dichos valores se obtiene la VECO.

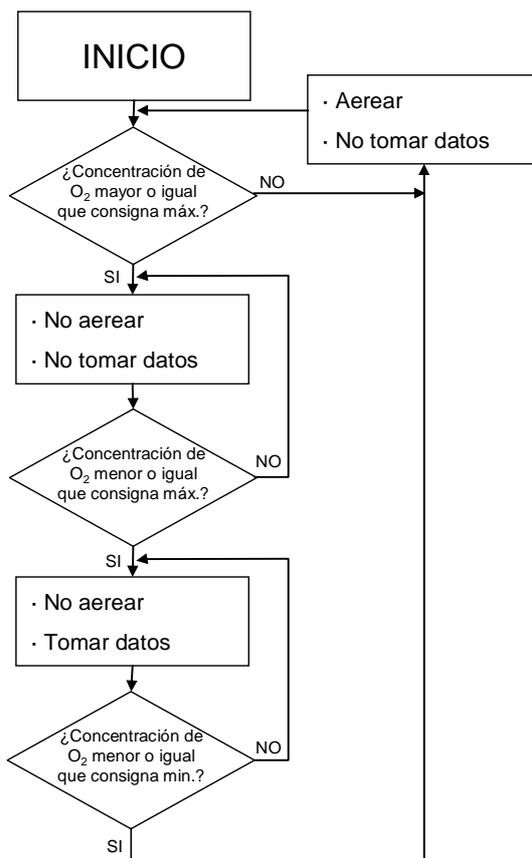


Fig. 3.4. Diagrama básico de funcionamiento del respirómetro.

3.2.5. Análisis Estadístico

Los resultados mostrados son los valores medios obtenidos en ensayos duplicados. En todos los casos el error estándar fue menor del 10%.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Biodegradación Cometabólica de 4-CF a Temperatura Controlada

3.3.1.1 Aclimatación del fango

La etapa de aclimatación del fango tuvo lugar en un tiempo de 60 días. Durante dicha etapa, la concentración máxima de 4-CF alcanzada en el interior del reactor fue de 5 mg/L para favorecer la inducción pero evitar la inhibición de enzimas, modificaciones genéticas y el crecimiento de organismos específicos sin provocar una inhibición severa de la biomasa (Moreno y Buitrón, 2004). La Fig. 3.5 muestra la degradación de fenol y 4-CF a 20 y 35 °C durante el periodo de aclimatación. La aclimatación a la degradación

de fenol fue más rápida que para el 4-CF, consiguiéndose velocidades de degradación de fenol superiores a las de 4-CF. Este hecho está relacionado con las diferentes ecotoxicidades de ambos compuestos (EC_{50} fenol = 18,2 y EC_{50} 4-CF = 1,9 mg/L).

Buitrón y colaboradores han logrado reducir el tiempo de aclimatación empleando la VECO como variable para establecer la duración del ciclo de tratamiento (Buitrón *et al.*, 2005; Moreno y Buitrón, 2004; Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). En el presente estudio se ha mantenido la secuencia de tratamiento constante. Esta estrategia de tiempo fijo permite analizar la influencia de la temperatura sobre la capacidad de adaptación de la biomasa, manteniendo el resto de variables constantes.

La aclimatación del fango en el caso del fenol fue más rápida a 35 °C, observándose a dicha temperatura, una velocidad específica de eliminación de fenol, calculada a partir de los perfiles de concentración del compuesto (Fig. 3.5a), sensiblemente mayor que a 20 °C (4,28 y 1,18 mg fenol/g SSV·h, respectivamente). Por otro lado, no se observó una influencia significativa de la temperatura sobre la duración del periodo de aclimatación ni sobre la velocidad media de eliminación del 4-CF (Fig. 3.5b), alcanzándose una velocidad de desaparición de 0,58 mg 4-CF/g SSV·h a las tres temperaturas ensayadas.

El incremento de la temperatura induce un aumento de la velocidad de volatilización de los compuestos monoaromáticos (Farhadian *et al.*, 2008); sin embargo, los resultados de los ensayos abióticos mostraron que, en las condiciones de operación, no se dieron pérdidas de los compuestos por volatilización. La adsorción por el fango biológico se comprobó, así mismo, despreciable (Fig. 3.5). Por lo tanto, la reducción de la concentración de los compuestos estudiados puede imputarse exclusivamente a su biodegradación.

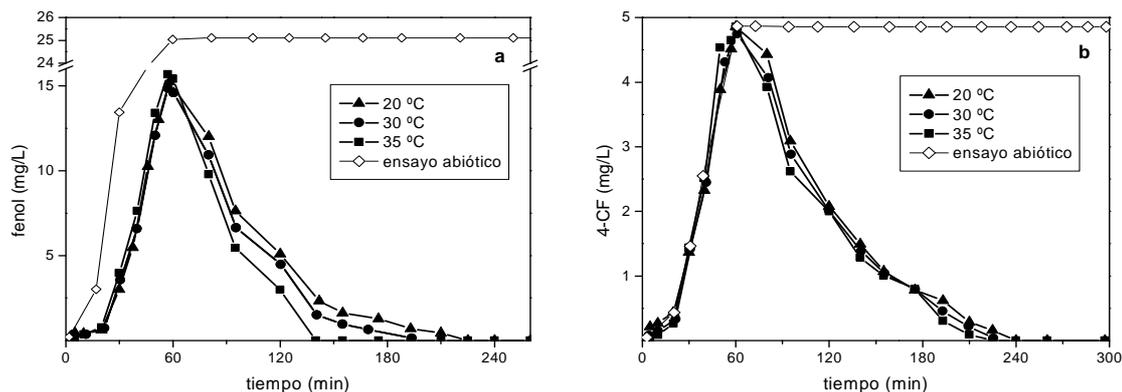


Fig. 3.5. Evolución de la concentración de fenol (a) y 4-CF (b) en un ciclo de tratamiento tras la aclimatación a 20 y 35 °C. Influyente: [fenol] = 525 mg/L; [4-CF] = 105 mg/L.

Debido a la degradación de 4-CF y asociado a la inhibición de diferentes enzimas implicadas en su ruta degradativa, durante la etapa de aclimatación se detectó la acumulación de intermedios generados en diferentes etapas metabólicas, como 4-CC, por hidroxilación de 4-CF (Fig. 3.6), o 5-cloro-2hidroximucónico semialdehído (Fig. 3.7.) que provocó la aparición de una coloración amarillenta en el medio de reacción (Fig. 3.8c). A 35 °C dicho color evolucionó en un corto periodo de tiempo hacia un amarillo pálido, que finalmente desapareció, indicando la activación de las rutas metabólicas responsables de su degradación. El 5-cloro-2-hidroximucónico aldehído es producto de la degradación aerobia del 4-CF mediante la ruta metabólica *meta* (Wieser *et al.*, 1994).

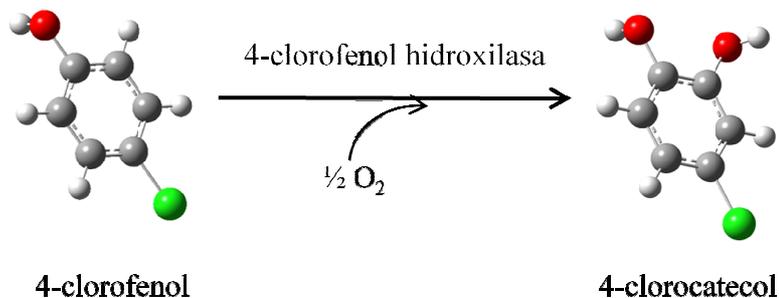


Fig. 3.6. Formación de 4-CC por degradación aerobia de 4-CF.

aclimatación duró 2 meses y en los 6 periodos restantes se fue incrementando la concentración de entrada de 4-CF desde 500 hasta 5.000 mg/L manteniendo la de fenol constante (2.500 mg/L). El reactor operó con un caudal de 0,2 L/d y un t_{HR} de 25 d, por lo que el factor de dilución de los influentes en el interior del mismo fue de 50. La elección de la concentración de fenol se basó en estudios previos en los que reactores SBR mantuvieron buenas condiciones biológicas sin observar procesos de inhibición. El objetivo de la adición de fenol es soportar el crecimiento celular, incrementar la biodiversidad en el reactor y disminuir las fases de latencia, consiguiendo una mayor estabilidad del medio biológico. Las cargas volumétricas aplicadas se incrementaron desde 0,271 hasta 0,562 g DQO/L·d y la relación F/M entre 0,385 y 1,693 g DQO/g SSV·d. A lo largo de los 10 meses de operación la temperatura del reactor fue de 21 ± 6 °C.

A pesar de los altos valores de F/M se consiguió la eliminación completa de ambos compuestos para todo el rango de concentraciones ensayadas. La mayor degradación se obtuvo a lo largo de la etapa aerobia, aunque, también se detectó el consumo de fenol durante el llenado anóxico cuando se alcanzaron concentraciones de 4-CF en el reactor menores de 30 mg/L, llegando a eliminar el 22% del fenol al tratar 500 mg/L de 4-CF.

Como puede observarse en la Fig. 3.9 la degradación de fenol es mucho más rápida que la del 4-CF y los perfiles son prácticamente lineales. Sin embargo, la evolución de la concentración de 4-CF muestra dos pendientes diferenciadas, siendo mayor la de la segunda fase durante la cual, tras alcanzar la casi completa degradación de fenol, la actividad metabólica se centra en el 4-CF.

El aumento de la concentración de 4-CF alargó el tiempo mínimo requerido para alcanzar la completa eliminación de fenol. Este hecho puede estar relacionado con el aumento de las cargas másicas aplicadas (muy superiores a las máximas recomendadas para estos reactores) y la inhibición de su cinética por la toxicidad del 4-CF.

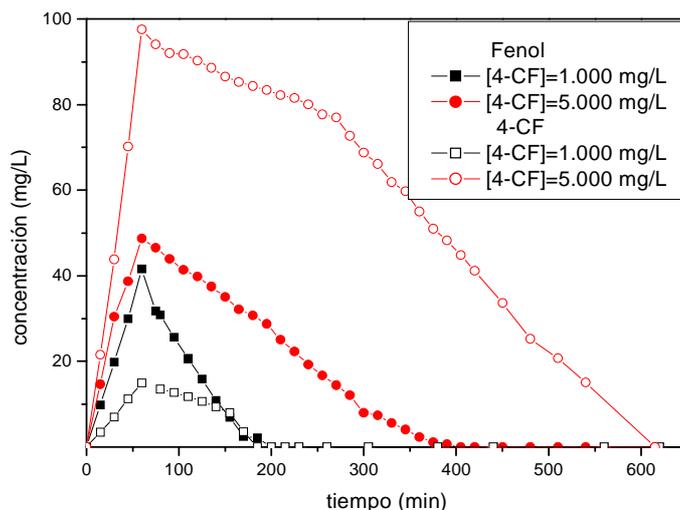


Fig. 3.9. Evolución del fenol y 4-CF en el tratamiento conjunto de 2.500 mg/L de fenol y 1.000 mg/L (símbolos negros) o 5.000 mg/L (símbolos rojos) de 4-CF.

La Fig. 3.10 muestra la evolución conjunta del pH, OD, fenol y 4-CF. Tras el llenado anóxico, en la etapa de reacción el OD aumenta paulatinamente, dependiendo del consumo asociado a la oxidación biológica. Durante las dos primeras horas de esta etapa, se observa un alto consumo de oxígeno, consecuencia de una intensa actividad biológica para degradar tanto el fenol como el 4-CF. Esta actividad va decayendo a medida que lo hace la concentración de sustrato, hasta llegar a un nivel de OD prácticamente asintótico. Finalmente, el OD disminuye durante la etapa de sedimentación cuando se paran la agitación y aereación.

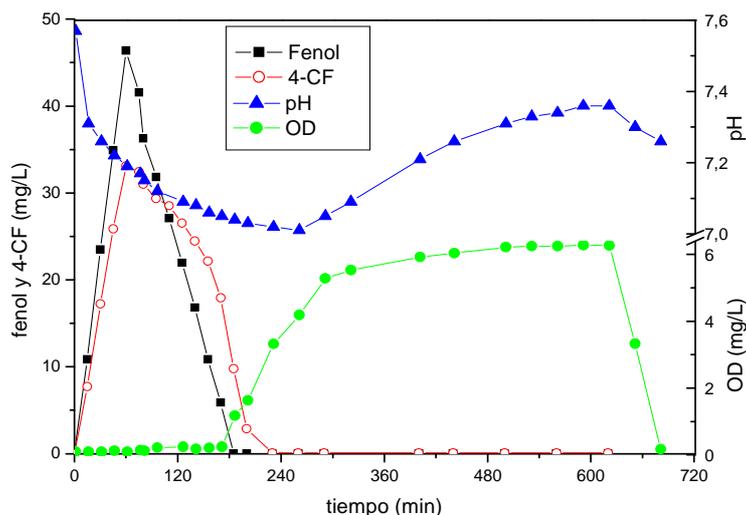


Fig. 3.10. Evolución de la concentración de fenol, 4-CF, pH y OD a lo largo de los ciclos, tratando 2.500 mg/L de fenol y 2.000 mg/L de 4-CF a temperatura ambiente.

La evolución del pH muestra un descenso debido al influente y la generación de compuestos de degradación de carácter ácido. Esta etapa se prolonga hasta el momento en el que se degrada totalmente el 4-CF, a partir del cual el pH aumenta por la degradación de los compuestos intermedios antes mencionados. Durante la sedimentación, la caída del OD impide el desarrollo de la actividad degradativa, provocando la disimilación de alguno de los compuestos intermedios retenidos por la biomasa. Este hecho lo corroboraron los análisis de la evolución de COT, ya que, al inicio de la etapa de sedimentación se detectó un ligero aumento del mismo (Fig. 3.11).

La eficacia del proceso alcanza el 97% de eliminación de COT y el 100% del COT calculado asociado a fenol, 4-CC y 4-CF. Sin embargo, se detectó una concentración de COT remanente que permaneció constante a lo largo de la experimentación. Esta fracción carbonosa residual puede deberse a la presencia de metabolitos generados a lo largo de los ciclos de tratamiento, los cuales pueden considerarse compuestos refractarios al tratamiento biológico en las condiciones de operación establecidas.

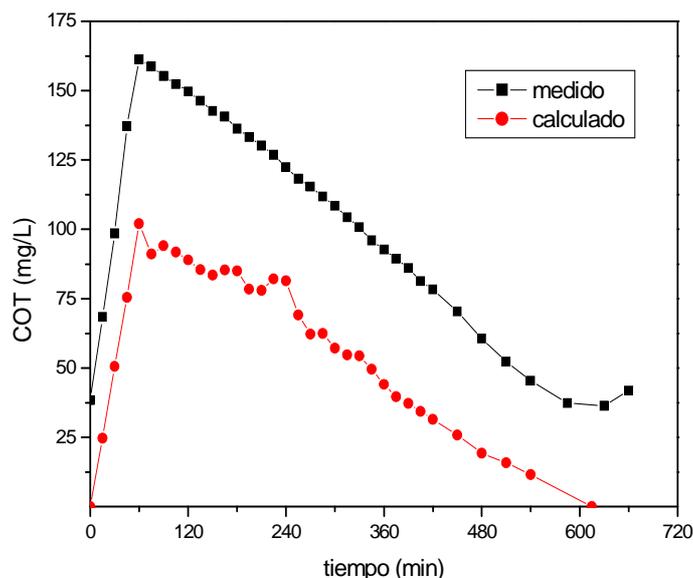


Fig. 3.11. Evolución del COT medido y calculado a lo largo del ciclo de tratamiento de 2.500 mg/L de fenol y 5.000 mg/L de 4-CF a temperatura ambiente.

Aunque existen numerosas expresiones para la velocidad específica de crecimiento en presencia de múltiples sustratos inhibitorios (Reardon *et al.*, 2000; Loh y Yu, 2004; Wang y Loh, 2001; Abuhamed *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1996), se ha seleccionado la siguiente por su simplicidad y buen ajuste en general (Wang *et al.*, 1996):

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max,a} S_a}{K_{s,a} + S_a + K_{2,a} S_b + K_{3,a} S_a S_b} \right) + \left(\frac{\mu_{\max,b} S_b}{K_{s,b} + S_b + K_{2,b} S_a + K_{3,b} S_b S_a} \right) \quad [3.5]$$

Donde los subíndices a y b se refieren al fenol y 4-CF, respectivamente; X es la concentración de SSV (mg/L); K_s la constante de saturación media (mg/L); K_2 y K_3 son constantes de inhibición (mg/L) y μ_{\max} representa la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1}). En principio, la Ec. (3.5) implica la existencia de interacciones cinéticas entre ambos sustratos si los valores de $K_{2,i}$ y $K_{3,i}$ ($i=a$ y b) son distintos de cero. $K_{2,a}$ está asociada a la inhibición de la degradación de fenol debida a la presencia de 4-CF y $K_{3,a}$ a la inhibición de la degradación de fenol debida a la presencia de ambos compuestos. Para valores elevados de al menos una de las constantes de interacción K_2 y K_3 , la Ec. 3.6 puede describir el crecimiento diáuxico. Si todas las constantes de interacción son iguales a cero, los dos sustratos no interaccionan entre sí. De este modo la velocidad de

crecimiento de la biomasa puede expresarse como el sumatorio de las velocidades para ambos compuestos.

$$\mu_{mezcla} = \left(\frac{\mu_{\max,a} S_a}{K_{s,a} + S_a + K_{2,a} S_b + K_{3,a} S_a S_b} \right) + \left(\frac{\mu_{\max,b} S_b}{K_{s,b} + S_b + K_{2,b} S_a + K_{3,b} S_b S_a} \right) \quad [3.6]$$

Admitiendo que la composición celular relativa se mantiene prácticamente constante y que los requerimientos de automantenimiento son despreciables frente a los degradativos, el resultado de la combinación de la Ec. [3.6] con los balances de masas es una expresión que predice las velocidades de consumo de ambos sustratos:

$$\frac{1}{X} \frac{dS_i}{dt} = - \frac{1}{Y_{XS,a}} \left(\frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{s,i} + S_i + K_{2,i} S_i + K_{3,i} S_i S_j} \right) \quad [3.7]$$

Teniendo en cuenta que:

$$- \frac{1}{Y_{XS}} X \mu_{\max} = V_{\max} \quad [3.8]$$

La Ec. 3.7 conduce a:

$$\frac{dS_a}{dt} = \left(\frac{V_{\max,a} S_a}{K_{s,a} + S_a + K_{2,a} S_b + K_{3,a} S_a S_b} \right) \quad [3.9]$$

$$\frac{dS_b}{dt} = \left(\frac{V_{\max,b} S_b}{K_{s,b} + S_b + K_{2,b} S_a + K_{3,b} S_b S_a} \right) \quad [3.10]$$

Los parámetros del modelo se obtuvieron por ajuste de las curvas por regresión no lineal, utilizando el programa Scientist 3.0 (MicroMath, Inc.).

En la Fig. 3.12 se muestra la evolución de la concentración medida y calculada para el sistema binario tratando diferentes concentraciones de 4-CF, manteniendo la del fenol en 2.500 mg/L.

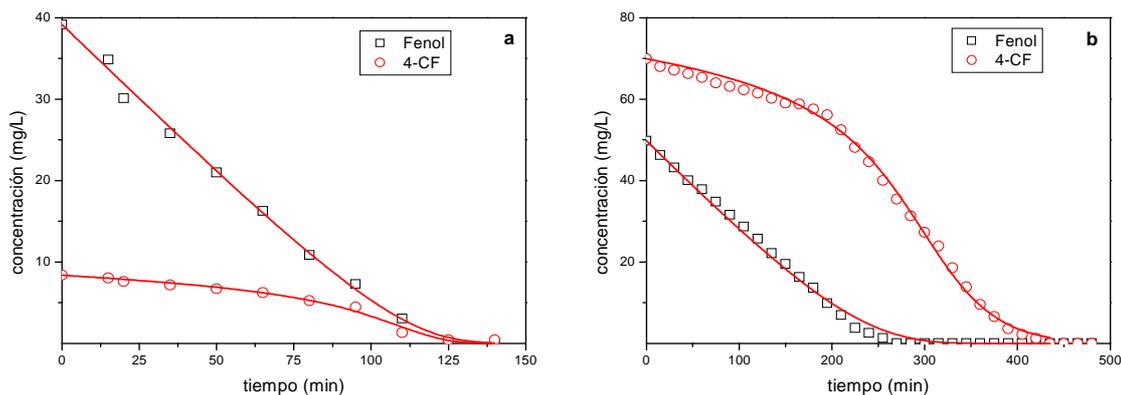


Fig. 3.12. Evolución de los datos experimentales (símbolos) y ajustados (líneas) de la concentración de fenol y 4-CF. Influyente: [fenol]=2.500 mg/L; [4-CF]=500 (a) y 3.500 mg/L (b).

Si se comparan los valores de los parámetros de interacción con la cinética enzimática, trabajando con sistemas binarios, pueden darse los siguientes cuatro patrones:

- (i) Inhibición cruzada competitiva, cuando $K_{2,a} \neq 0$, $K_{2,b} \neq 0$, $K_{3,a} = K_{3,b} = 0$.
- (ii) Inhibición cruzada no competitiva, cuando $K_{2,a} = K_{2,b} = 0$, $K_{3,a} \neq 0$, $K_{3,b} \neq 0$.
- (iii) Inhibición parcial competitiva, cuando $K_{3,a} = K_{3,b} = 0$ y además (a) $K_{2,a} = 0$, $K_{2,b} \neq 0$ ó (b) $K_{2,a} \neq 0$, $K_{2,b} = 0$.
- (iv) Inhibición parcial no competitiva, cuando $K_{2,a} = K_{2,b} = 0$ y además (a) $K_{3,a} = 0$, $K_{3,b} \neq 0$ ó (b) $K_{3,a} \neq 0$, $K_{3,b} \neq 0$.

En la Tabla 3.4 se recogen los valores de los parámetros de ajuste. Para ambos compuestos los valores de K_3 son próximos a cero, lo que sugiere una inhibición cruzada competitiva. Los valores de K_3 para el 4-CF son menores que para el fenol, indicando que la inhibición predominante es la del 4-CF sobre la degradación de fenol.

El aumento de la concentración de entrada de 4-CF tratada conduce a una disminución de la velocidad inicial de desaparición del mismo y un aumento de la de fenol. El aumento de los valores de K_3 para el 4-CF indica que, para elevadas

concentraciones de dicho compuesto, un aumento de la concentración de fenol reduciría la velocidad de consumo del 4-CF.

Los valores de K_2 muestran que el grado de inhibición entre ambos compuestos no resulta despreciable. Además, son similares para los dos, lo que indica que la concentración del otro compuesto influye de igual modo para ambos, demostrando la fuerte dependencia metabólica entre sustratos.

El aumento de la concentración de entrada de 4-CF provoca una evolución de los valores de K_S opuesta para ambos compuestos. En el caso del fenol K_S disminuye, indicando que al tratar mayores concentraciones de 4-CF se requieren menores concentraciones de fenol para alcanzar el 50% de la velocidad máxima de desaparición. Este hecho puede deberse a una preferencia más acusada por el fenol.

Tabla 3.4. Parámetros de ajuste para la degradación de fenol y 4-CF tratando diferentes concentraciones de 4-CF y 2.500 mg/L de fenol.

4-CF influyente (mg/L)	4-CF reactores teórica (mg/L)	Fenol				4-CF				R ²
		V_{MAX} (mg feno/g SSV·min)	K_S (mg/L)	K_2 (L/mg)	K_3 (L/mg)	V_{MAX} (mg 4-CF/g SSV·min)	K_S (mg/L)	K_2 (L/mg)	K_3 (L/mg)	
500	10	4,62±0,34	55,95±3,77	11,44±1,56	1,03±0,07	2,80±0,89	5,94±2,45	4,29±1,52	0,0024±0,0004	0,999
1000	20	7,09±0,78	44,36±4,53	18,60±4,88	0,44±0,12	2,18±0,18	3,79±1,01	13,76±3,78	0,0032±0,0006	0,998
2000	40	5,38±0,16	12,13±1,56	2,29±1,01	0,35±0,02	1,09±0,78	3,30±0,57	8,22±5,49	0,0033±0,0007	0,999
3500	70	4,47±0,95	5,52±2,69	3,16±0,59	0,20±0,12	0,87±0,15	10,59±2,79	4,02±1,01	0,0637±0,0025	0,998
4500	90	3,51±1,22	5,40±1,50	2,18±1,26	0,16±0,06	0,36±0,09	13,70±1,87	2,26±0,79	0,0698±0,045	0,997
5000	100	3,37±0,65	3,88±0,39	2,50±0,18	0,14±0,11	0,43±0,28	20,40±4,78	1,70±0,96	0,0712±0,053	0,999

A pesar del choque tóxico que supone la presencia conjunta de fenol y 4-CF en los efluentes tratados, la biomasa a lo largo de la experimentación se agregó en flóculos densos pero no compactos, amorfos y de contornos redondeados, en los que mediante tinción DAPI, se observó una abundante matriz, probablemente compuesta por biopolímeros, que, junto con una población equilibrada de microorganismos filamentosos, conformó unas estructuras robustas (Fig. 3.13). Es bien sabido que la biomasa floculenta presenta múltiples ventajas frente a un lodo disperso, lo que está relacionado con la elevada eficacia obtenida. La base para la formación de flóculos reside en la habilidad de los microorganismos para unirse entre sí y a partículas no biológicas. La mayoría de los microorganismos que aparecen en los flóculos son esféricos, lo que contribuye generalmente a la formación de flóculos de la misma

geometría (Jenkins *et al.*, 2004). La presencia de organismos filamentosos en baja densidad constituye un factor determinante en el crecimiento (Sezgin, 1977; Sezgin *et al.*, 1978) e integridad (Parker, 1971) de los flóculos en condiciones de toxicidad severas.

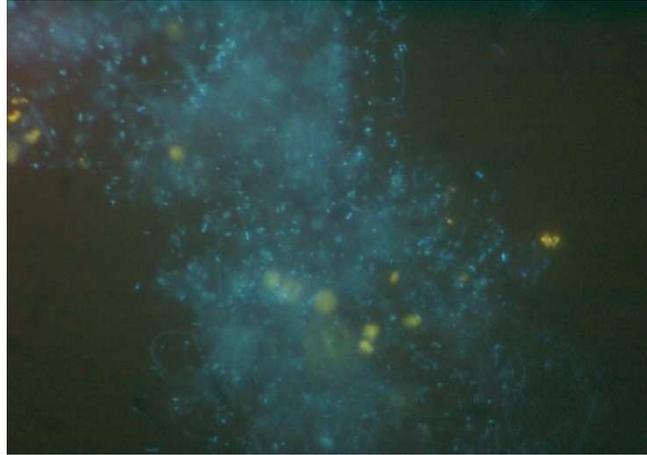


Fig. 3.13. Lodo floculento con tinción DAPI al microscopio óptico (1000x).

El elevado tiempo medio de residencia celular (30 d) favoreció la aparición de metazoos, en su mayoría rotíferos (Fig. 3.14), los cuales estuvieron presentes en el licor mezcla durante todo el experimento, incluso en periodos de tratamiento de alta carga, lo que podría ser uno de los motivos de la baja producción celular neta.



Fig. 3.14. Rotífero observado con microscopio óptico tratando mezclas de fenol y 4-CF (400x).

3.3.1.3 Influencia de la temperatura en la velocidad inicial de consumo

La Fig. 3.15 recoge la velocidad específica inicial de eliminación de fenol (a) y 4-CF (b) a tres temperaturas (20, 30 y 35 °C) tratando efluentes con una concentración de 525 mg/L de fenol y concentraciones de 4-CF entre 210 y 2.100 mg/L. Los valores correspondientes al fenol resultaron superiores a los del 4-CF para todas las concentraciones y temperaturas estudiadas. La velocidad de biodegradación de fenol está claramente afectada por la concentración de 4-CF tratada, alcanzando un máximo para 420 mg/L de 4-CF a 20 y 30 °C. Debido a la elevada eficacia de eliminación anóxica de fenol a 35 °C, la concentración de dicho compuesto tras el llenado fue menor a esta temperatura que a 20 y 30 °C, lo que limitó la velocidad de consumo, por lo que la concentración óptima de 4-CF resultó mayor a 35 °C (840 mg/L). Cuando se emplearon concentraciones de 4-CF por encima de 840 mg/L aumentó significativamente la toxicidad de los efluentes, reduciéndose la velocidad de eliminación tanto de fenol como de 4-CF.

La temperatura mostró una influencia significativa sobre las velocidades de eliminación de ambos compuestos, alcanzándose los mayores valores a 35 °C (Fig. 3.15). La reducción de la temperatura de 35 a 30 y 20 °C, hizo que la velocidad máxima inicial de consumo de fenol disminuyese de 10,53 a 8,87 y 7,21 mg fenol/g SSV·h, respectivamente (Fig. 3.15a). En general, la velocidad de las reacciones biológicas en condiciones mesofílicas se duplica aproximadamente al incrementar 10 °C la temperatura de operación (Farhadian *et al.*, 2008). Al contrario de lo descrito durante el proceso de aclimatación, la temperatura afecta significativamente a la cinética de biodegradación de 4-CF, obteniéndose velocidades específicas iniciales de eliminación de 4-CF de 9,90, 5,96 y 3,13 mg 4-CF/g SSV·h a 35, 30 y 20 °C, respectivamente (Fig. 3.15b).

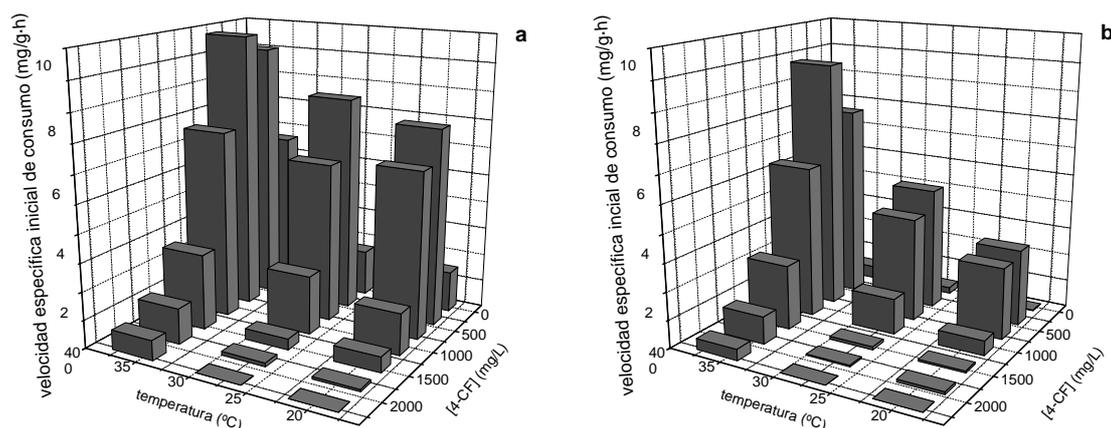


Fig. 3.15. Velocidades específicas iniciales de eliminación de fenol (a) y 4-CF (b) obtenidas durante el tratamiento de mezclas de fenol (525 mg/L) y 4-CF (105 - 2.100 mg/L) mediante SBR a diferentes temperaturas.

Como se observa en la Fig. 3.16, durante la etapa de reacción aerobia, ambos compuestos se consumen simultáneamente. Este hecho podría estar relacionado con la activación de la monooxigenasa necesaria para la degradación del 4-CF por la presencia de fenol (Chiavola *et al.*, 2003). La reducción de la concentración de fenol a 10 mg/L provocó un descenso claro de la velocidad de eliminación de 4-CF. Aunque la eliminación de 4-CF está claramente influida por la presencia de fenol en el medio, los resultados muestran que el consumo de 4-CF continúa tras la eliminación completa del fenol, indicando que un lodo biológico adecuadamente aclimatado podría utilizar el 4-CF como única fuente de carbono y energía, consiguiendo, así, la degradación de dicho compuesto.

En la Fig. 3.16a se observa que el tiempo requerido para la eliminación completa del fenol depende de la concentración de 4-CF tratada. Estudios previos han mostrado que la velocidad de consumo de fenol depende de la concentración máxima de éste (Jiang *et al.*, 2004a). Sin embargo, para una misma concentración inicial de fenol (25 mg/L), la velocidad inicial de consumo aerobio del mismo a 35 °C disminuyó de 2,88 a 1,33 y 1,21 mg fenol/g SSV·h al aumentar la concentración de 4-CF en el influente de 1.050 a 1.470 y 2.100 mg/L, respectivamente. Este hecho se debe al aumento del efecto inhibitorio, observándose un alargamiento notable de la fase de aclimatación al tratar 2.100 mg/L de 4-CF.

Únicamente a 35 °C pudo aumentarse la concentración de 4-CF tratada hasta 2.100 mg/L, mientras que a 20 y 30 °C dicha concentración provocó la acumulación del

compuesto y la desestabilizaron del sistema. Al tratar 1.470 mg/L de 4-CF a 20 y 30 °C la comunidad microbiana no pudo regular sus rutas metabólicas para adaptarse a las condiciones ambientales, lo que provocó la inhibición de la actividad celular y el deterioro de la estructura del floculo biológico.

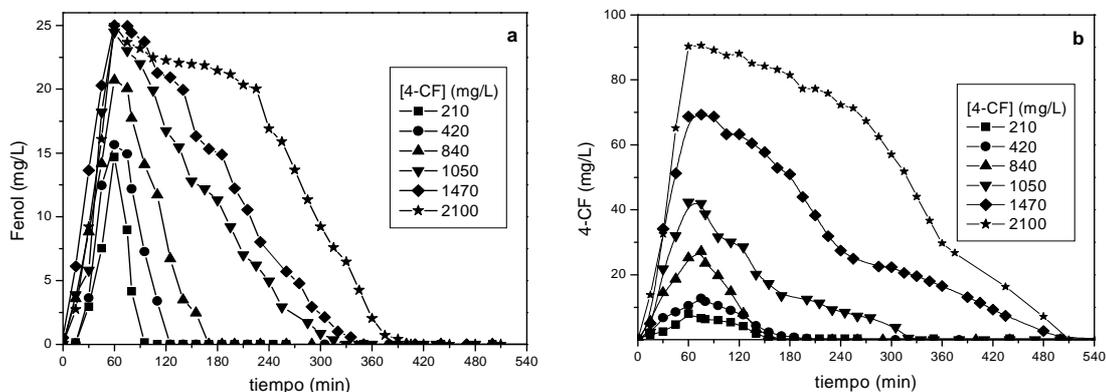


Fig. 3.16. Evolución de la concentración de fenol (a) y 4-CF (b) a lo largo del ciclo para diferentes concentraciones de 4-CF (Influyente: [fenol] = 525 mg/L; T = 35 °C).

3.3.1.4 Degradación anóxica de fenol

A pesar de que la eliminación de ambos compuestos se lleva a cabo principalmente durante la etapa aerobia, en la Fig. 3.17a se observa que para concentraciones de 4-CF superiores a 840 mg/L, la concentración de fenol tras la etapa de llenado fue inferior a la esperada (25 mg/L), lo que indica que, parte del fenol se elimina durante esta etapa en condiciones anóxicas. En la literatura se recogen algunos trabajos que muestran la degradación de fenol en condiciones desnitrificantes, empleando el NO_3^- como aceptor de electrones. Incluso se ha observado la degradación de fenol en presencia de bacterias sulfato-reductoras, lo cual se ha demostrado mediante el aislamiento de cepas puras en un medio con fenol como única fuente de carbono (Bak y Widdel, 1986; Boopathy, 1995). En el presente trabajo el color marrón brillante típico del lodo y la ausencia del olor característico de la presencia de H_2S sugieren que la sulfato-reducción es un proceso marginal en el sistema. La presencia de nitratos hace que los sulfatos no se empleen como aceptores de electrones (Sarfraz *et al.*, 2004; Chakraborty y Veeramani, 2006).

La eficacia de eliminación de fenol en condiciones anóxicas, tratando concentraciones de 4-CF menores de 420 mg/L, aumentó con la temperatura. Un

incremento de la concentración de 4-CF hasta 1470 mg/L (Fig. 3.17) provocó la inhibición de las bacterias anóxicas degradadoras de fenol. Teniendo en cuenta estos resultados, parece interesante el empleo de periodos de llenado anóxico largos en el tratamiento de bajas concentraciones de 4-CF en presencia de fenol, ya que no solamente se mejora la sedimentabilidad del lodo y la desnitrificación, sino que también se reduce el coste energético ligado a la aereación.

Durante los últimos años se han aislado diversas cepas de bacterias desnitrificantes capaces de oxidar fenol en ausencia de oxígeno disuelto, empleando el NO_3^- como aceptor final de electrones. Las bacterias desnitrificantes degradadoras de fenol aisladas hasta el momento son *Thiobacillus* sp., *Thaurea* sp., *Dehalobacterium* sp. (Beristain-Cardoso *et al.*, 2009), *Azoarcus* sp. (Zhou *et al.*, 1995; Van Schie y Young, 1998; Shinoda *et al.*, 2000), *Magnetospirillum* sp. (Shinoda *et al.*, 2000), *Pseudomonas* sp. (Tschech y Fuchs, 1987; Son *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 1998; Khoury *et al.*, 1992), *Alcaligenes* sp. (Son *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2002), *Acinetobacter* sp. (Khoury *et al.*, 1992) y *Enterobacter* sp. (Thomas *et al.*, 2002).

La información bibliográfica sobre la degradación anóxica de compuestos fenólicos mediante SBR es escasa. Sarfaraz *et al.* (2004) reportaron elevadas eficacias de degradación de fenol empleando lodo desnitrificante granular. En el presente trabajo, se eliminó un 41% del fenol en 1 h en la etapa de llenado, a 35 °C, tratando 525 mg/L, resultados satisfactorios si se comparan con el 93% de eliminación en 8 h obtenidos por Sarfaraz *et al.* (2004), tratando concentraciones similares de fenol.

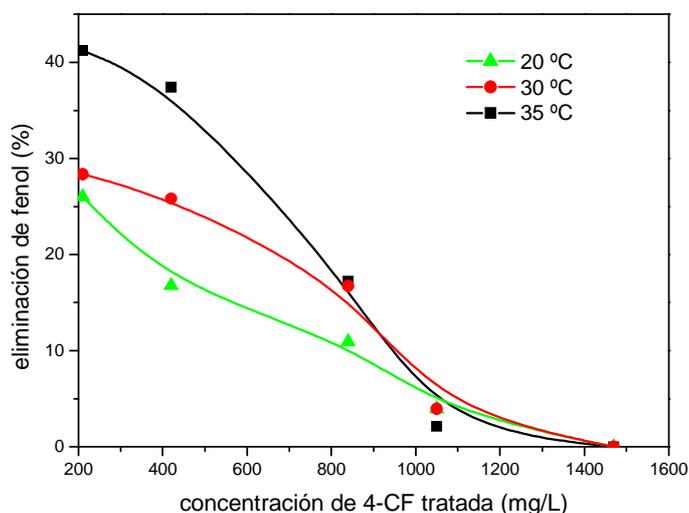


Fig. 3.17. Eliminación anóxica de fenol para diferentes concentraciones de 4-CF a 20, 30 y 35 °C.

3.3.1.5 Sedimentabilidad del lodo

Kargi y Konya (2006) comprobaron que la presencia de 4-CF en una unidad de fangos activos convencional empeora sensiblemente la sedimentabilidad del lodo. Además, diversos trabajos han concluido que la temperatura también influye en este sentido (Lee *et al.*, 1975; Del Pino y Zirk, 1982). En el presente trabajo se comprobó que los valores del IVF aumentaron de 87 a 277 (mL/g) al aumentar la concentración de 4-CF tratada de 105 a 1470 mg/L (Fig. 3.18). Durante el periodo de aclimatación, en el que se trató una concentración de 4-CF de 105 mg/L, la sedimentación fue mayor a 20 °C. Sin embargo, al alcanzar concentraciones en el reactor superiores a 200 mg/L, de acuerdo con los resultados presentados por Basu y Oleszkiewicz (1995), el aumento de la temperatura mejoró la sedimentabilidad. El efecto de la temperatura sobre la sedimentabilidad del lodo está relacionado con cambios en los polímeros extracelulares de las bacterias, compuestos principalmente por proteínas, lípidos y polisacáridos (Gulerman y Dilek, 1990).

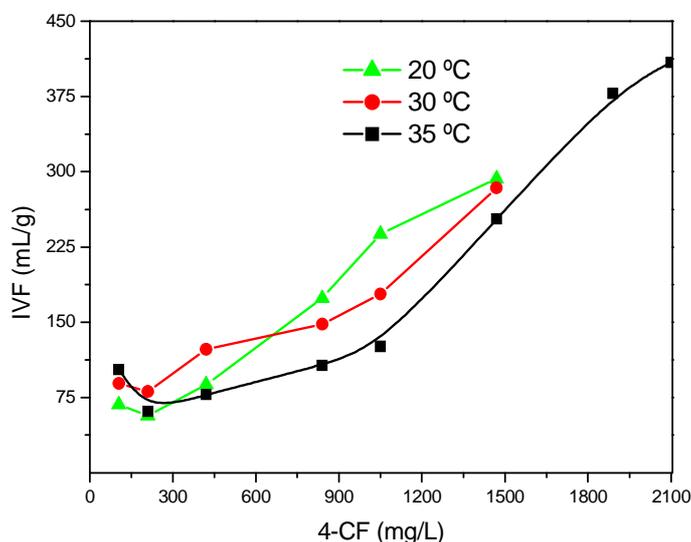


Fig. 3.18. Efecto de la temperatura y de la concentración de 4-CF tratada sobre la sedimentabilidad del lodo.

3.3.1.6 Consumo de oxígeno e intermedios

A lo largo de los ciclos se midió tanto la concentración de OD como la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO) con el objetivo de analizar su posible relación con la concentración de los compuestos tratados y de los intermedios generados. En la Fig. 4.19 se observa que al comienzo de la etapa aerobia el OD aumenta hasta alcanzar la saturación, a una velocidad que depende de la carga orgánica aplicada. El consumo acumulado de oxígeno alcanzó, a 35 °C, valores de 134 y 886 mg O₂/L al tratar 210 y 2.100 mg/L de 4-CF, respectivamente (Figs. 2.19a y b).

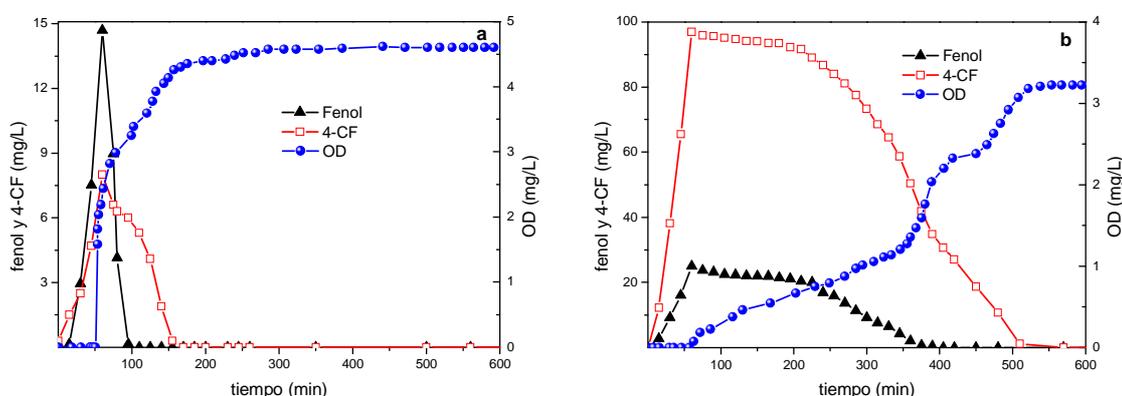


Fig. 3.19. Evolución de la concentración de 4-CF, fenol y OD a 35 °C. Influyente: [fenol] = 525 mg/L; [4-CF] = 210 mg/L (a) y 2.100 mg/L (b).

La VECO se calculó a partir de los perfiles de OD para diferentes concentraciones de 4-CF y temperaturas. En los experimentos llevados a cabo a 35 °C (Fig 2.20) se observaron tres máximos, de los cuales los dos primeros (localizados a 217 y 312 min) están relacionados con las máximas velocidades de consumo de fenol y 4-CF, respectivamente. El tercer pico (centrado hacia 420 min) está asociado con la degradación del 4-CC, identificado como el compuesto intermedio mayoritario de la degradación aerobia del 4-CF por la ruta *meta*. Debido a la baja concentración de fenol, el pico de VECO asociado a su degradación fue de alrededor de 0,3 mg OD/L·h. Por otro lado, el pico relacionado con el consumo de 4-CF es el más acusado, con un valor máximo de VECO en torno a 2 mg OD/L·h.

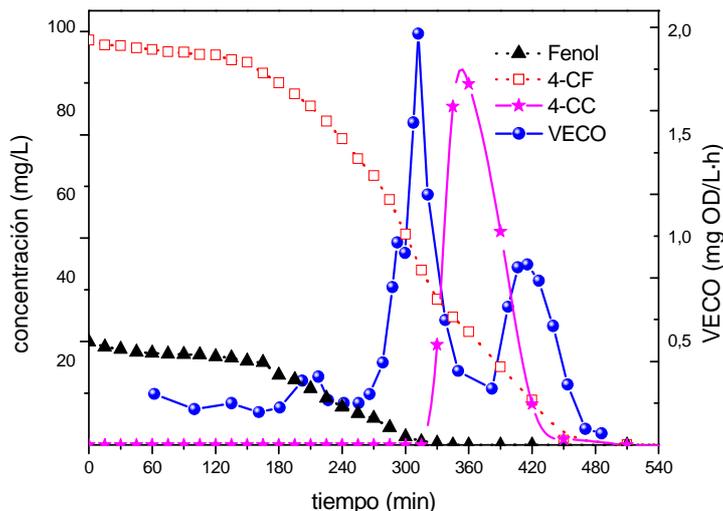


Fig. 3.20. Evolución del 4-CF, fenol, 4-CC y VECO a 35 °C. Influyente: [fenol] = 525 mg/L; [4-CF] = 2.100 mg/L.

3.3.1.7 Evolución del COT y de la ecotoxicidad

En la Fig. 3.21 se muestra la evolución de la concentración de los compuestos de partida, fenol y 4-CF, del intermedio 4-CC y del COT medido y calculado a 30 °C. El COT calculado representa el carbono asociado al 4-CC generado y al fenol y 4-CF remanentes. En todos los experimentos se detectó una cantidad significativa de COT remanente en los efluentes, que explica el COT detectado al comienzo de cada ciclo. Dicho COT se debe esencialmente a materia orgánica derivada de la excreción y ruptura celular. Si no se tiene en cuenta dicha cantidad, el COT medido y calculado muestra una tendencia similar, excepto al final de cada ciclo, donde se generan intermedios con cierta toxicidad no identificados (Fig. 3.21), que, además, presentan una cierta toxicidad.

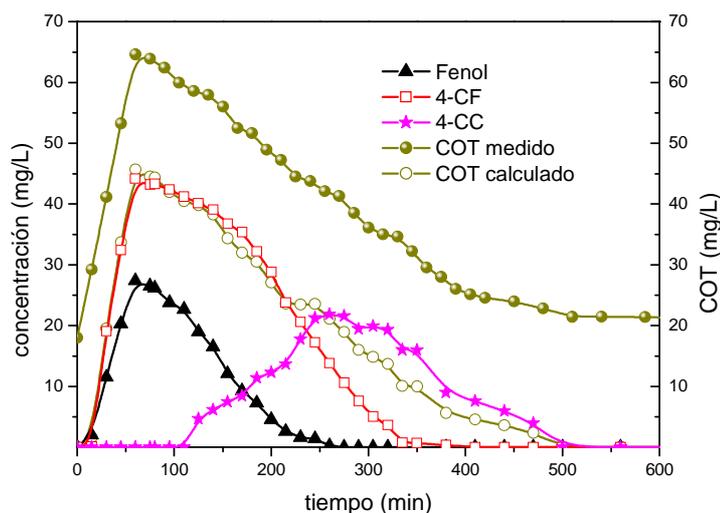


Fig. 3.21. Evolución de la concentración de 4-CF, fenol, 4-CC y del COT medido y calculado a 30 °C. Influyente: [fenol] = 525 mg/L; [4-CF] = 1.050 mg/L.

La determinación de la ecotoxicidad durante el tratamiento biológico de 4-CF se ha llevado a cabo por diferentes métodos, entre los cuales destacan los que utilizan resazurina (Kargi y Eker, 2006; Kargi y Konya, 2006 y 2007), *Artemia salina* (Tarighian *et al.*, 2003) y el ensayo Microtox (Moreno-Andrade y Buitrón, 2008). Dichos trabajos reportan reducciones de la ecotoxicidad, sin referencia a su posible relación con productos de degradación.

Los valores de ecotoxicidad calculados se obtuvieron a partir de los de cada uno de los compuestos individuales (Tabla 3.5) y sus respectivas concentraciones, según un modelo aditivo Chen y Lu, 2002):

$$U.T._{mezcla} = \sum_i \frac{C_i}{EC_{50i}}$$

Tabla 3.5. Valores de ecotoxicidad del fenol, 4-CF y 4-CC.

Compuesto	EC ₅₀ (mg/L)	U.T. (1000 mg/L)
Fenol	18,2	55
4-CF	1,9	526
4-CC	15,3	65

Se observó que la toxicidad de los efluentes dependía de la temperatura de trabajo. Se midieron valores de ecotoxicidad de 3,5 U.T. a 35 °C y de 8,7 U.T. a 20 °C tratando mezclas de fenol y 4-CF de 525 y 1.470 mg/L, respectivamente. Estos resultados son consistentes con la mejora observada en el rendimiento global de los reactores al operar a una mayor temperatura.

En la Fig. 3.22 se observa que los valores de ecotoxicidad calculados son significativamente mayores que los medidos experimentalmente. Dicho efecto no se observó durante la etapa de llenado, lo que sugiere la existencia de efectos antagónicos relacionados con la presencia de especies intermedias generadas durante la etapa aerobia. Hoffmann *et al.* (2003) investigaron los efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos de mezclas de 10 compuestos en agua, concluyendo que la mayoría de las mezclas mostraban valores inferiores a los esperados a partir de los compuestos puros. Según esto, los efectos sinérgicos en combinaciones de tóxicos resultan poco comunes.

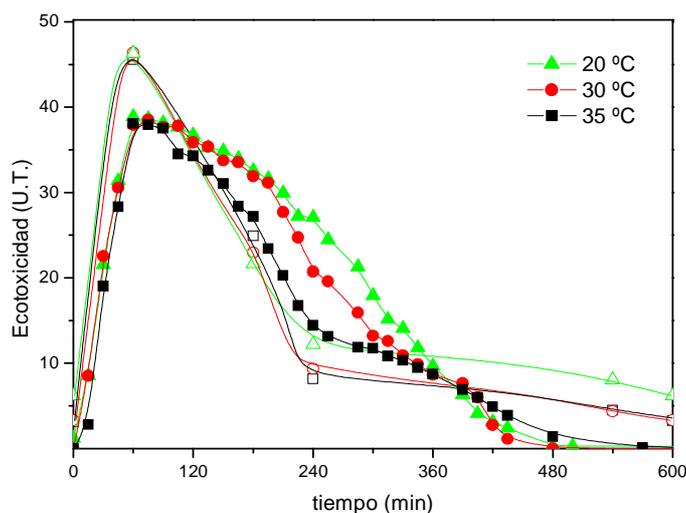


Fig. 3.22. Evolución de la ecotoxicidad calculada (símbolos rellenos) y medida (símbolos abiertos) durante un ciclo completo a 20 y 35 °C. Influyente: [fenol] = 525 mg/L; [4-CF] = 1.470 mg/L.

3.3.2. Degradación de 4-CF Empleando Biomasa Floculenta

En la Fig. 3.23 se muestra la evolución de la concentración normalizada de 4-CF y COT durante la etapa aerobia empleando diferentes caudales y tratando distintas

concentraciones de 4-CF. Mientras que este compuesto se eliminó completamente en todos los casos ensayados, se observó una fracción de COT refractaria al tratamiento.

La concentración máxima de 4-CF tratable en el presente trabajo (70 mg/L, en el interior del reactor) resulta superior a los 53 mg/L propuestos por Sahinkaya y Dilek (2007) como concentración crítica. El tratamiento de concentraciones superiores a los 70 mg/L antes indicados provocó la acumulación de 4-CF en el reactor, desestabilizando finalmente el sistema. A diferencia de los resultados obtenidos en el tratamiento conjunto de 4-CF y fenol, con 4-CF como única fuente de carbono y energía no se detectó 4-CC, lo cual indica que el consumo de dicho intermedio es mucho más rápido en ausencia de fenol como sustrato de crecimiento.

La velocidad de degradación de 4-CF fue similar para los tres caudales ensayados. Dichos resultados están de acuerdo con los presentados por Kargi y Konya (2007), según los cuales la influencia del t_{HR} viene dado por el efecto de la concentración alcanzada en el interior del reactor. Por otro lado, la velocidad de consumo de COT aumentó considerablemente cuando lo hizo el caudal de entrada de 0,1 a 0,75 L/h. Este hecho puede deberse a un mayor lavado del reactor, que reduce la concentración máxima de COT refractario de 50 a 7 mg/L, respectivamente.

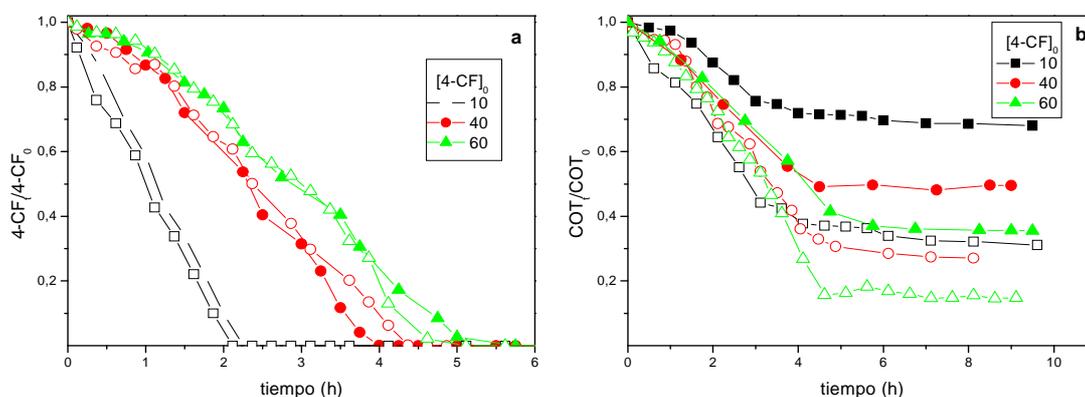


Fig. 3.23. Evolución de la concentración normalizada de 4-CF (a) y COT (b) tratando diferentes concentraciones de 4-CF empleando caudales de entrada de 0,1 L/h (símbolos cerrados) y 0,75 L/h (símbolos abiertos).

En cuanto a las bioindicaciones, no se observaron diferencias notables entre los reactores operados a diferentes caudales. Las características estructurales del lodo

fueron similares, observándose flóculos con formas irregulares, muy compactos y firmes, de diámetro entre 60 y 100 μm (Fig. 3.24). Debido a las buenas propiedades de los flóculos y la moderada densidad de organismos filamentosos, observables en los bordes de los flóculos, el lodo presentó una buena sedimentabilidad, con valores de IVF menores de 150 mL/g.

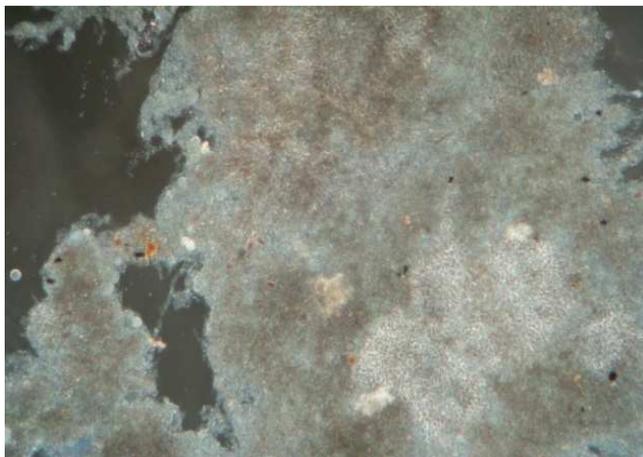


Fig. 3.24. Microscopía óptica de flóculos obtenidos operando con un caudal de entrada de 0,24 L/h (400x).

3.3.3. Degradación de 4-CF Empleando Lodo Parcialmente Granulado

El desarrollo de biomasa granular se consiguió aumentando la velocidad ascensional superficial de aire de 0,09 cm/s, empleada para la biomasa floculenta, hasta 0,5 cm/s. En la Fig. 3.25 se observa que los gránulos presentan una distribución de tamaño heterogénea (100 μm - 2 mm), formas irregulares, bordes redondeados, color parduzco y aparecen compactos y firmes. La formación de los gránulos es favorable para valores de velocidad ascensional superiores a 1,2 cm/s (Liu y Tay, 2002, 2004), por lo que la velocidad empleada en el presente trabajo (0,5 cm/s) únicamente permitió la granulación parcial de la biomasa. La reducción del tiempo de vaciado habría mejorado la granulación (Tay *et al.*, 2001c; Qin *et al.*, 2004), sin embargo, en el presente trabajo se empleó un tiempo de sedimentación de 30 min para evitar el lavado de biomasa por la toxicidad del 4-CF.

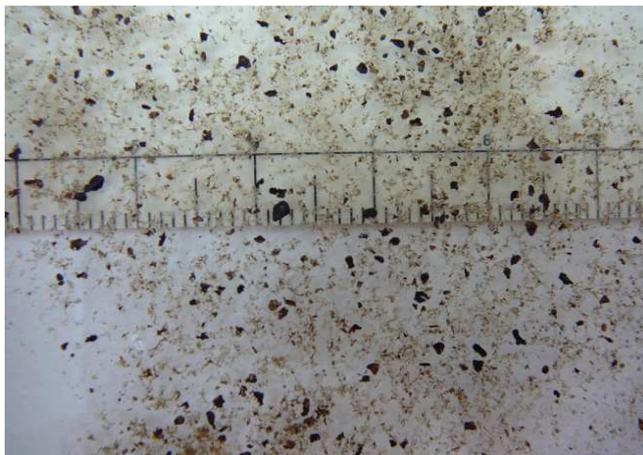


Fig. 3.25. Fotografía del lodo granular aerobio.

Las características estructurales adquiridas por el lodo bajo las condiciones de operación permitieron el desarrollo de una biomasa con una rápida sedimentabilidad tal y como muestran los valores del IVF (Fig. 3.26). El aumento del stress químico para mayores concentraciones de 4-CF mejoró la sedimentabilidad del lodo llegando a alcanzar valores de IVF de 43,5 mL/g para las mayores concentraciones de 4-CF tratadas, lo cual permite reducir notablemente el tiempo de la etapa de sedimentación.

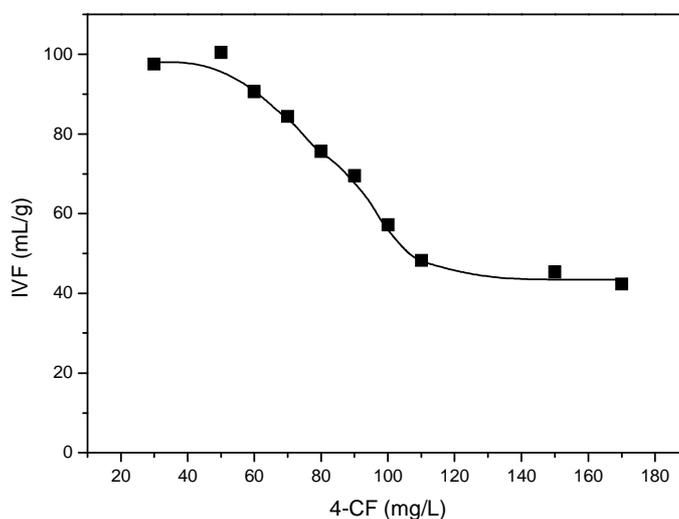


Fig. 3.26. Evolución del IVF del lodo parcialmente granulado para diferentes concentraciones de 4-CF en el interior del reactor.

En la Fig. 3.27a se observa el aspecto compacto de los gránulos, lo cual probablemente está relacionado con la presencia de biopolímeros y cationes añadidos en forma de sales empleadas como micronutrientes, los cuales forman parte del esqueleto

del gránulo. Muchos de estos gránulos aparecen unidos entre sí mediante puentes (Fig. 3.27b), compuestos por multitud de fibras de entre 2 y 5 μm de diámetro, distribuidas paralelamente en multicapas. Los mecanismos de adhesión entre gránulos han sido ampliamente estudiados pero aún no se comprenden completamente. Se piensa que los puentes entre gránulos están compuestos por biopolímeros exocelulares, constituyendo aproximadamente entre el 15 - 20% del peso de los SST en un fango típico (Urbain *et al.*, 1993). En 1977 Higgins y Novak observaron mediante TEM que las uniones están compuestas por matrices complejas de microfibras poliméricas (4-6 nm de diámetro); dichas estructuras representan el principal mecanismo físico de “bridging” entre compuestos orgánicos e inorgánicos.

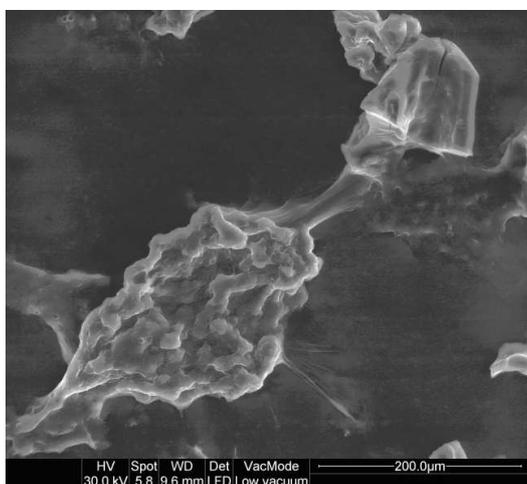


Fig. 3.27a. Micrografía con SEM de un gránulo.

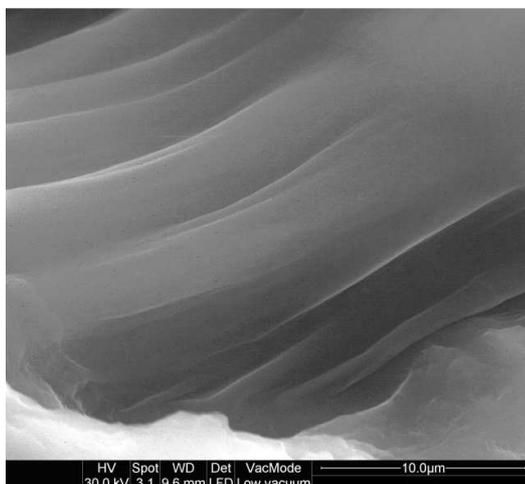


Fig. 3.27b. Micrografía SEM de los puentes de unión entre gránulos.

El desarrollo de biomasa granular permitió el tratamiento de concentraciones de 4-CF en el interior del reactor de hasta 160 mg/L, lo que supone una carga másica de 1,02 kg DQO/kg SSVLM-d, consiguiendo su completa eliminación. Dicha concentración es muy superior a la alcanzada en el SBR con biomasa floculenta, tanto sin cosustrato (70 mg/L) como en presencia de fenol (100 mg/L). Este hecho se debe a que los sistemas inmobilizados presentan una mayor tolerancia a la toxicidad que los cultivos en suspensión (Quan *et al.*, 2004; Eker y Kargi, 2006). Debido a la estructura compacta de los gránulos aerobios, estos confieren una especial resistencia a dicha toxicidad, protegiéndoles contra la inhibición (Jiang *et al.*, 2004b).

El análisis de la evolución conjunta del OD y del 4-CF durante el llenado (Fig. 3.28) demostró que, tras el consumo del OD remanente al comienzo del ciclo, el 4-CF

no se degradó en condiciones anóxicas. Para el cálculo de la concentración teórica de 4-CF durante el llenado se tuvo en cuenta su concentración en el influente, la velocidad de alimentación y la variación de volumen del reactor durante el llenado. Los porcentajes de eliminación de COT durante el llenado fueron inferiores a los de degradación de 4-CF, por lo que, durante dicha etapa el 4-CF degradado utilizando el OD remanente no se mineraliza sino que es simplemente transformado en otros compuestos.

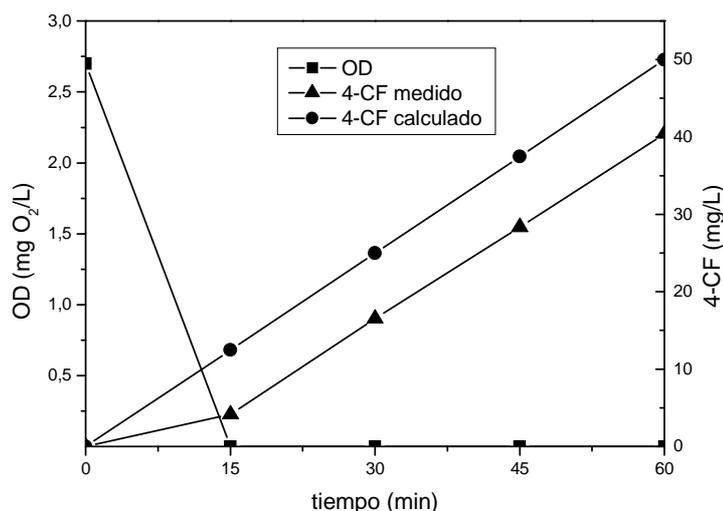


Fig. 3.28. Concentración de 4-CF medida y calculada y OD durante la etapa de llenado tratando 1.050 mg/L.

La Fig. 3.29a muestra la evolución de la concentración de 4-CF y COT biodegradable (fracción del COT degradada biológicamente) tratando diferentes concentraciones. Para concentraciones de 4-CF superiores a 3.570 mg/L la velocidad de degradación de COT disminuyó drásticamente respecto a la del 4-CF. Este hecho podría estar relacionado con la acumulación de alguno de los compuestos intermedios de baja biodegradabilidad, aumentando el COT no biodegradable y reduciendo la extensión de la mineralización del compuesto de partida. La fracción de COT refractario fue inferior a 7 mg/L tratando concentraciones de 4-CF de hasta 3.150 mg/L. Por lo tanto, puede concluirse que el lodo granular mejora la extensión de la mineralización respecto al floculento. El aumento de la concentración de 4-CF hasta 3.570 mg/L provocó un descenso del rendimiento de eliminación de COT del 65%. Al igual que para el SBR con biomasa floculenta, tampoco en este caso se detectó 4-CC en el medio, concluyendo

que la velocidad de degradación de dicho compuesto es mayor en ausencia de otros sustratos de crecimiento.

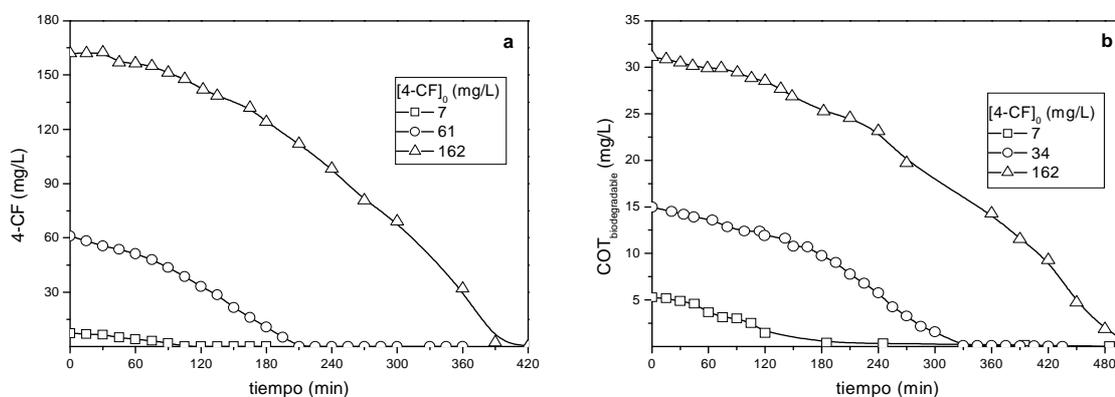


Fig. 3.29. Evolución de la concentración de 4-CF (a) y del COT biodegradable (b) tratando diferentes concentraciones de 4-CF.

El análisis cinético basado en la velocidad específica inicial de degradación de sustrato (V_I) se realizó a partir de la evolución de la concentración de 4-CF y COT. Las V_I se obtuvieron mediante derivación numérica de los datos iniciales teniendo en cuenta la concentración de biomasa al comienzo de la etapa aerobia.

En la Fig. 3.30 se muestra la tendencia de las V_I de 4-CF y COT al tratar distintas concentraciones de 4-CF. Se observó un máximo para cada una de ellas, a concentraciones de 4-CF en torno a 90 y 50 mg/L, respectivamente. Para concentraciones de 4-CF inferiores a 40 mg/L no se observaron diferencias significativas entre ambas velocidades, por lo que, en estas condiciones, la mineralización está limitada por la hidroxilación del 4-CF a 4-CC. Para concentraciones de 4-CF mayores, las V_I del 4-CF son superiores a las del COT, corroborando que en estas condiciones, la etapa limitante en la ruta metabólica no es el primer paso de la misma. A lo largo de la experimentación no se detectó 4-CC en el medio de reacción, lo que indica que tampoco el segundo paso de rotura del anillo aromático, ya sea en posición *orto* o *meta*, es la etapa limitante de la velocidad del proceso.

En la Fig. 3.30 puede observarse como el modelo de Haldane (Ec. [3.11]) predice satisfactoriamente los resultados experimentales ($R^2 = 0,995$). Los parámetros de ajuste y sus intervalos de confianza (95%) para el 4-CF y el COT se recogen en la Tabla 3.6.

$$V_I = \frac{V_{I,MAX} \cdot [4 - CF]_0}{K_{S,V_I} + [4 - CF]_0 + \frac{[4 - CF]_0^2}{K_{I,V_I}}} \quad [3.11]$$

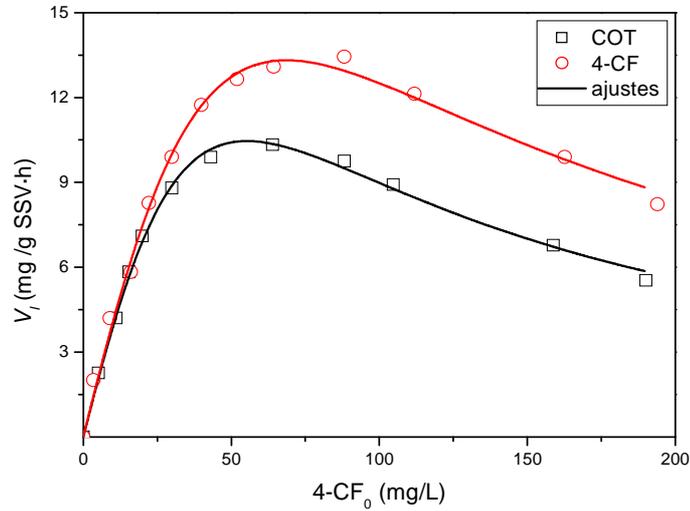


Fig. 3.30. Velocidades específicas de degradación iniciales de 4-CF y COT.

Tabla 3.6. Parámetros de ajuste para las V_I de 4-CF y COT según el modelo de Haldane.

4-CF			COT		
$V_{I,MAX}$ (mg 4-CF/g SSV·h)	$K_{S, VI}$ (mg/L)	$K_{I, VI}$ (mg/L)	$V_{I,MAX}$ (mg 4-CF/g SSV·h)	$K_{S, VI}$ (mg/L)	$K_{I, VI}$ (mg/L)
139,4±94,7	324,6±239,5	14,5±10,8	112,5±54,3	277,1±140,7	11,0±5,9

Por lo tanto las expresiones para conocer las V_I de 4-CF y COT pueden expresarse, respectivamente, mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[4 - CF]}{dt} = \frac{139,4 \cdot [4 - CF]_0}{324,6 + [4 - CF]_0 + \frac{[4 - CF]_0^2}{14,5}} \quad [3.12]$$

$$\frac{d[COT]}{dt} = \frac{112,5 \cdot [4 - CF]_0}{277,1 + [4 - CF]_0 + \frac{[4 - CF]_0^2}{11,0}} \quad [3.12]$$

La relación entre las constantes de saturación e inhibición (K_S/K_I) determina los cambios en la velocidad de degradación a concentraciones crecientes de sustrato.

Cuando dicha relación tiende a infinito, la ecuación de Haldane se aproxima a la de Michaelis-Menten y la degradación de sustrato tiende a un máximo. Para valores bajos de K_S/K_I , a medida que la concentración inicial de sustrato se incrementa la velocidad de consumo alcanza un valor crítico (C_{CR}). Tomei *et al.* (2004) propusieron la siguiente expresión para dicho valor:

$$C_{CR} = \sqrt{K_S/K_I}$$

a partir del cual la velocidad de consumo de sustrato disminuye. Sin embargo, en el presente estudio dicha concentración fue muy superior a C_{CR} ($4,73 \pm 2,28$ mg/L), indicando que, a pesar de la inhibición provocada por la presencia de 4-CF a altas concentraciones como única fuente de carbono, el sistema de SBR con lodo granulado presenta una gran estabilidad para el tratamiento de efluentes de alta toxicidad.

IV. TRATAMIENTO DE 4-CF CON BIOMASA SUSPENDIDA EN SBR

“El agua es el vehículo de la naturaleza”, Leonardo da Vinci.

4.1. Introducción

La adsorción se considera una técnica efectiva para el tratamiento de aguas residuales; sin embargo, debido al precio del carbón activo no es un método ampliamente utilizado en este campo (Tanjore y Viraraghavan, 1997). Actualmente, para que la adsorción suponga una técnica de uso más extensivo, deben desarrollarse adsorbentes más económicos y que mantengan una alta eficacia. Para ello se han empleado diferentes precursores biomásicos como semillas, cáscaras de frutas y cereales, residuos madereros, etc. Durante la última década, el empleo de fango excedentario de depuradora como precursor para la preparación de adsorbentes ha suscitado un gran interés, al tratarse de un residuo (código LER 190805) de producción continua del que se generan en España más de 1 millón de toneladas al año (sólidos, base seca, año 2006, MARM), siendo uno de los países de la UE con un mayor aumento de la generación de este tipo de lodos (55% en el periodo 1996-2006).

Este residuo es el resultado de la producción de microorganismos y la acumulación de materias minerales y orgánicas no degradadas durante el tratamiento biológico de las aguas. Estos lodos deben tratarse para facilitar su manejo y evitar posibles problemas ambientales y de salud pública. Para ello, se someten a diversas operaciones de acondicionamiento, espesado, deshidratación, secado o incineración (Fig. 4.1). Según el principio de jerarquía en la gestión de residuos, las estrategias a seguir son la reducción, reutilización, reciclaje, otras formas de valorización y eliminación. En el caso de los lodos, el II Plan Nacional de Lodos de Depuradora (2007-2015) establece como objetivo principal mejorar su gestión, contemplando tres usos principales: usos agrícolas, valorización energética y depósito en vertedero. Los más extendidos son la aplicación en suelos y el depósito en vertedero (Fig. 4.2), los cuales se encuentran limitados por los requerimientos de calidad exigidos para su aplicación al terreno y la insuficiente disponibilidad del mismo. Además, la Directiva 1993/31/CE, traspuesta por el Real Decreto 1481/2001, pretende reducir la fracción de residuos municipales biodegradables destinados a vertedero al 35% de la cantidad generada en 1995.

Mediante la incineración se reduce sustancialmente el volumen de residuo y, al mismo tiempo, se inertiza, pudiendo, además, aprovecharse la energía generada durante

la combustión. Los principales obstáculos para esta vía provienen de la estricta legislación en cuanto a emisión de gases y un importante rechazo social (Furness *et al.*, 2000).

Por otro lado, aunque existen diferentes tecnologías para la valorización energética de los lodos (Rulkens, 2008), se requiere una adecuación al contexto energético en el que se practique, ya que en no pocos casos el balance energético resulta negativo en la práctica.

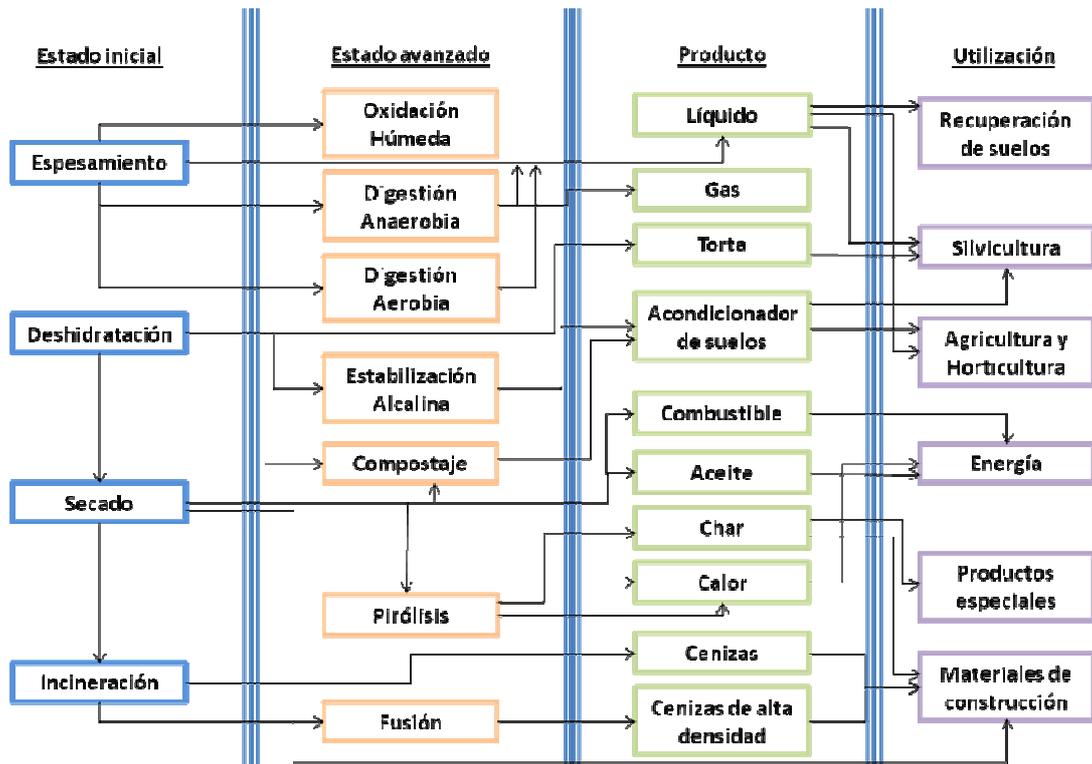


Fig. 4.1. Métodos de valorización de lodos de depuradora.

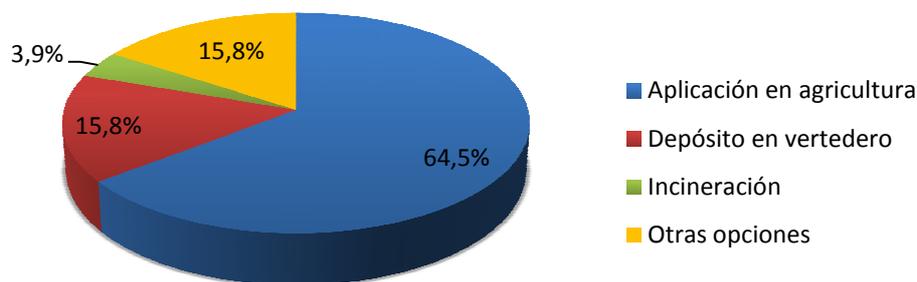


Fig. 4.2. Vías de gestión de lodos de depuradora en España (2006). Fuente: Eurostat (2009).

Entre los procesos de valorización alternativos, la preparación de materiales adsorbentes se presenta como una opción atractiva, ya que, además de reducir su volumen, produce materiales con un valor añadido.

Se han empleado diferentes vías de producción de adsorbentes a partir de lodos de depuradora. El secado (Aksu y Yener, 2001) y la pirólisis (Rozada *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2005) son métodos interesantes desde el punto de vista ambiental. Generalmente los materiales carbonosos resultantes de la pirólisis tienen un área superficial entre 100 y 400 m²/g. Tras la puesta en marcha de la primera planta de pirólisis de biosólidos a escala industrial (Planta Subiaco, Australia) se concluyó que toda la energía necesaria para el secado del lodo se genera en el proceso, alcanzando un valor neto de 7,7 GJ/t de biosólidos secos; que la pirólisis genera unos créditos de GEIs (CO₂) de entre 300 y 1300 kg/kg de biosólido seco procesado y que los metales pesados se retienen completamente en el producto sólido final (Bridle y Rovel, 2003).

La activación “física” consiste básicamente en la gasificación parcial de un sustrato carbonoso mediante un gas oxidante como vapor de agua (Warhurst *et al.*, 1997; Gomez-Serrano *et al.*, 1993) o CO₂ (Gomez-Serrano *et al.*, 1993), a temperaturas entre 800 y 1100 °C, hasta alcanzar un cierto grado de quemado, o mediante aire en condiciones más suaves de temperatura, en torno a 300 °C (Gomez-Serrano *et al.*, 1993; Garrido *et al.*, 1987). Se ha logrado mejorar el desarrollo de la porosidad de biosólidos

o carbonizados resultantes de su pirólisis, por activación con CO₂ (Ros *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006) y aire (Méndez *et al.*, 2005).

Tradicionalmente la activación química se ha llevado a cabo mediante la impregnación del material de partida con un agente activante, seguida de pirólisis a 500-800 °C. Entre los agentes más empleados cabe destacar H₃PO₄, H₂SO₄, ZnCl₂ y álcalis.

En concreto, con biosólidos de lodos de depuradora, diversos autores han publicado los resultados obtenidos con H₃PO₄ (Zhang *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2006), H₂SO₄ (Martin *et al.*, 1996; Bagreev y Bandosz, 2002; Martín *et al.*, 2003; Rozada *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004; Rio *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), ZnCl₂ (Lu, 1996; Martin *et al.*, 1996; Bagreev *et al.*, 2001; Tay *et al.*, 2001a,b; Chen *et al.*, 2002; Zhai *et al.*, 2004; Rozada *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006) y álcalis (Ros *et al.*, 2006).

A diferencia de las áreas superficiales obtenidas por métodos de gasificación parcial o pirólisis, que suelen ser inferiores a 200 m²/g, la activación química ha permitido obtener materiales de hasta 600 m²/g (Martin *et al.*, 1996; Bagreev y Bandosz, 2002; Martin *et al.*, 2002), que llegan a 850 m²/g con NaOH (Wu *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2006; Canals-Batlle *et al.*, 2008; Lillo-Ródenas *et al.*, 2008) y 1900 m²/g con KOH (Ros *et al.*, 2006) como agentes activantes. La activación química constituye, pues, un método muy efectivo, aunque los residuos generados durante el proceso pueden ocasionar un problema ambiental importante.

Los materiales obtenidos mediante la activación de biosólidos se han empleado en procesos de adsorción de contaminantes gaseosos como tolueno, dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno (Yuan y Bandosz, 2007), y el tratamiento en fase acuosa de fenol, tintes catiónicos y aniónicos (Lu y Lau, 1996; Martin *et al.*, 2003; Sereych y Bandosz, 2007; Torres-Pérez *et al.*, 2008) y metales (Gascó *et al.*, 2005).

A pesar del número de estudios sobre obtención de carbones activos a partir de biosólidos de lodos de depuradora, la aplicabilidad de estos materiales como adsorbentes no ha sido suficientemente contrastada (Inguanzo *et al.*, 2002; Rozada *et al.*, 2007). En el presente estudio se preparan, caracterizan y evalúan los adsorbentes obtenidos a partir de dicho residuo, mediante diferentes métodos resumidos en la Fig. 4.3, en la adsorción en fase acuosa de 4-CF.

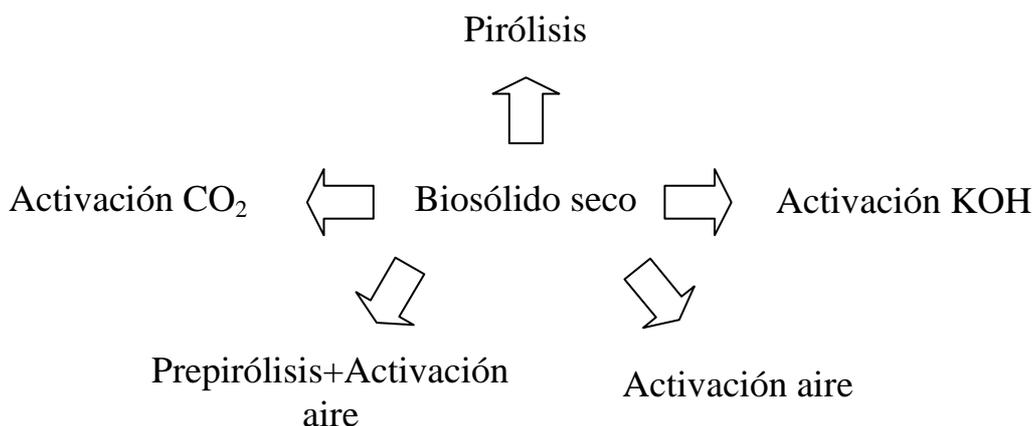


Fig. 4.3. Resumen de los métodos utilizados para la preparación de materiales adsorbentes a partir de lodo de depuradora.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Preparación de los Adsorbentes

El lodo utilizado procede del reactor biológico de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales. En primer lugar, el lodo se lavó hasta obtener permeados con conductividades eléctricas menores de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, empleando un sistema de filtración compuesto por un módulo de flujo tangencial (Vivaflow 200), un indicador de presión y una bomba peristáltica (Cole Parmer, Masterflex L/S). El módulo de filtración está compuesto por un canal rodeado por una membrana de PES (poliétersulfona), por el que se hace circular la disolución a tratar.

Tras el proceso de lavado, el lodo se secó a 105 °C hasta pesada constante, se trituró en molino de cuchillas (micromolino IKA Labortechnik, MF10) y se tamizó a un tamaño de partícula en el intervalo de 100 a 250 μm .

La pirólisis del sólido seco resultante se llevó a cabo en atmósfera de N_2 (100 mL/min) empleando una rampa de calentamiento de 10 °C/min, a temperaturas entre 300 y 750 °C, manteniendo la temperatura final durante 30 min.

La activación con CO_2 se realizó a 700 y 800 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, empleando un caudal de CO_2 de 100 mL/min y un tiempo de activación de 0,5, 2 y 4 h.

La activación con aire se realizó empleando un caudal de 100 mL/min, a temperaturas de 200, 300 y 400 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y tiempos de activación de 0,5, 2 y 4 h.

La activación con KOH se realizó por mezclado físico con KOH (partículas entre 100 y 250 μm) en proporciones KOH:biosólidos 1:1 y 3:1. La mezcla se calentó a dos temperaturas (450 y 750 °C), empleando una rampa de calentamiento de 10 °C/min, en atmósfera de N_2 . El material resultante se lavó con HCl 3 M y, posteriormente, con agua destilada hasta pH constante.

Todos los tratamientos descritos se realizaron en un horno discontinuo vertical, esquematizado en la Fig. 4.4, constituido por una cabeza con una entrada lateral para el gas y un cierre superior cónico esmerilado, en el que se inserta una varilla de cuarzo de 6 mm de diámetro, cuyo extremo inferior termina en forma de percha. Esta varilla sostiene una cápsula de cuarzo de 25 mm de diámetro y 40 mm de altura, en la que se deposita el material de partida.

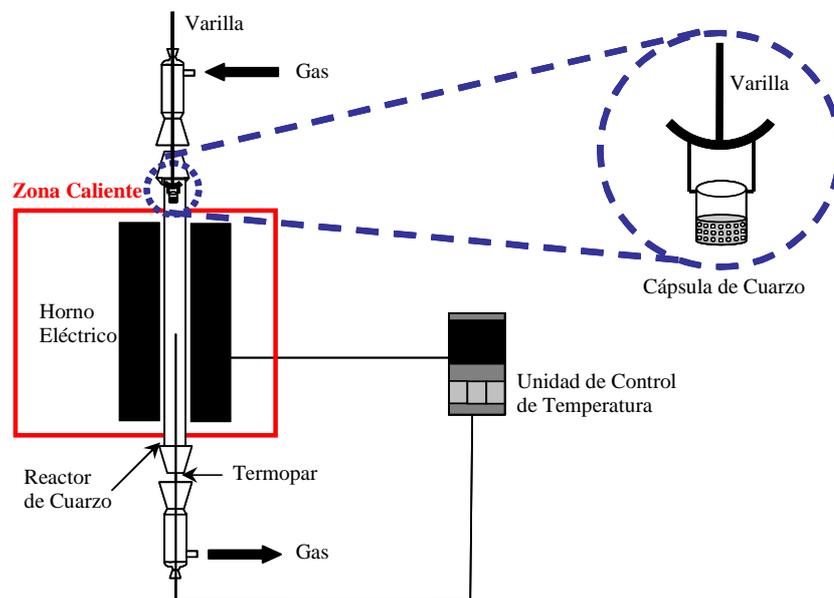


Fig. 4.4. Esquema del horno discontinuo vertical.

La zona caliente consta de un tubo de cuarzo de 48 mm de diámetro y 500 mm de longitud, con un cierre superior (45/40) y otro inferior (29/32). El cierre inferior del tubo presenta una boca lateral para la salida de gases y otra central por la que se introduce un termopar (tipo K) hasta la zona de reacción, conectado al controlador de

temperatura (TOHO TTM-000) que actúa sobre el bloque calefactor eléctrico que rodea al tubo de cuarzo. El caudal de gas está controlado mediante un medidor de flujo másico (Bronkhost Hig-Tech) conectado a una unidad de control (TOHO TTM-000).

En los ensayos de pirólisis y activación, se introdujo la muestra a temperatura ambiente hasta la zona caliente, haciendo pasar el gas empleado en cada caso para asegurar el desplazamiento del aire del interior antes de iniciar el calentamiento. Transcurrido el tratamiento térmico a la temperatura deseada, la muestra se enfrió en el interior del reactor, manteniendo el flujo de gas.

4.2.2. Ensayos de Adsorción

Los ensayos para evaluar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción se realizaron en un baño termostatzado con agitación orbital, con una velocidad de agitación equivalente a 200 rpm, empleando frascos tipo Pirex de 100 mL con un volumen útil de 75 mL. Cada ensayo se realizó empleando partículas de adsorbente entre 100 y 250 μm , una concentración de adsorbente de 1 g/L e idéntica concentración de adsorbato. Las muestras se analizaron a diferentes tiempos de contacto, obteniendo con cada una de ellas un punto de la evolución temporal.

Los ensayos con biosólidos secos se realizaron a distintas temperaturas (15 - 40 °C) y pH (5 - 9). Para el resto de materiales los experimentos se realizaron a 15 °C y pH 7. Los experimentos se realizaron por duplicado empleando disoluciones tamponadas de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, incluyendo un ensayo blanco en ausencia de adsorbente.

Las condiciones de operación empleadas en los ensayos de equilibrio fueron idénticas a las descritas anteriormente. En este caso, para obtener la isoterma de adsorción, en cada frasco de reacción se emplearon diferentes concentraciones iniciales de adsorbato.

4.2.3. Equipos de Caracterización y Análisis

4.2.3.1 Termogravimetría

Se empleó un analizador termogravimétrico (TGA/SDTA851e) equipado con un carrusel automático (TS0801R0). Los principales componentes del equipo son la microbalanza, el horno cilíndrico, las unidades de control de temperatura y de flujo másico y el sistema de lectura y registro de datos (peso, temperatura y tiempo).

El controlador de la balanza permite seguir la variación de peso de la muestra, así como programar la rampa de calentamiento y el tiempo durante el que debe mantenerse dicha temperatura.

El contenido en cenizas se cuantificó empleando el analizador termogravimétrico según la norma ASTM D2866-94.

4.2.3.2 Desorción Térmica Programada

Las muestras se depositaron en un lecho de lana de cuarzo y se sometieron a una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 900 °C en atmósfera de N₂ (1 N L/min). El CO y CO₂ desprendidos por la descomposición de los grupos oxigenados se cuantificaron mediante analizadores de infrarrojo cercano (Brooks, modelo 5850 TR). En función de la especie desorbida y la temperatura de desorción se establecen los posibles grupos superficiales presentes en el material analizado.

4.2.3.3 Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron imágenes de la superficie de los sólidos mediante microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy, SEM), empleando un equipo Philips, modelo XL 30, acoplado a un analizador EDAX DX4i.

4.2.3.4 Composición química elemental

El análisis de la composición elemental de las muestras, en cuanto a C, H, N y S se llevó a cabo mediante un analizador LECO CHNS-932. Los productos de la oxidación (CO₂, H₂O, N₂ y SO₂) por una combustión completa de la muestra se arrastran con He como gas portador hasta los detectores individuales y selectivos con celdas de infrarrojos que aseguran una medición rápida y libre de interferencias. Posteriormente, los gases generados se eliminan para poder medir el N por termoconductividad diferencial.

4.2.3.5 Análisis de la estructura porosa

La estructura porosa se caracterizó a partir de las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K, que se obtuvieron en un equipo Autosorb-1 de Quantachrome. Las muestras fueron previamente desgasificadas a 150 °C y 10⁻³ torr durante 8 h. Mediante la ecuación BET se obtuvo la superficie específica, empleando los datos obtenidos a presiones relativas entre 0,03 y 0,3. Para el cálculo del volumen de

microporos se aplicó el método “t” y el de mesoporos se obtuvo mediante porosimetría de mercurio (Poremaster, Quantachrome instruments) y a partir de la isoterma de adsorción-desorción de N₂ en el intervalo entre 2 y 8 nm.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Caracterización de los Materiales Carbonosos

4.3.1.1 pH

Se seleccionaron materiales obtenidos por las diferentes vías y se pusieron en contacto con agua destilada, manteniendo la agitación, midiéndose el pH de equilibrio. Como puede observarse en la Tabla 4.1, la mayoría de los materiales obtenidos por activación mostraron un carácter ácido. Sin embargo, el pirolizado es ligeramente básico. Además, a medida que se incrementa la temperatura de pirólisis dicha basicidad aumenta, lo que se relaciona con la reducción del número de grupos superficiales oxigenados de carácter ácido (Inganzo *et al.*, 2002). Un carácter más básico mostró el sólido resultante de la activación con CO₂.

La mayor acidez se detectó en los carbones activados con KOH, lo que sugiere un mayor contenido de grupos funcionales ácidos como los carboxílicos. La presencia de grupos superficiales ácidos confiere al carbón un carácter hidrofílico y una capacidad de cambio en torno a 0,25 meq/g (Martin *et al.*, 2002).

Tabla 4.1. pH de los materiales obtenidos por las diferentes vías estudiadas.

Lodo	Biosólidos	Pirolizado	Activación con diferentes agentes activantes			
			CO ₂	Aire	Prepirólisis y aire	KOH
6,9	6,8	7,5	8,3	5,8	5,9	4,8

4.3.1.2 Análisis químico elemental

Los biosólidos obtenidos por secado de los lodos de partida mostraron un contenido en carbono del 63% y en cenizas del 22,7%. Estos valores resultan muy similares a los publicados por otros autores (Méndez *et al.*, 2005; Rio *et al.*, 2005).

Los mayores contenidos de C corresponden a los carbonizados obtenidos por pirólisis de los biosólidos (Tabla 4.2). Esto debe ser el resultado de la formación de estructuras hidrocarbonadas poliaromáticas. Además, el desprendimiento de volátiles que contienen grandes cantidades de H₂O, H₂, CH₄ y CO₂ provoca un enriquecimiento en C. El contenido de C aumentó de 79 a 88% cuando la temperatura de pirólisis se incrementó de 300 a 750 °C, siendo el contenido medio en cenizas del 72 - 75%. Dado que el material de partida fue el mismo en todos los ensayos, el posible efecto catalítico de las cenizas es similar en todos los casos.

El contenido en C de los materiales obtenidos por gasificación con CO₂ resultó ligeramente inferior al de los carbonizados, mientras que esta tendencia fue contraria en el caso de las cenizas.

Tabla 4.2. Contenido en C (base seca y libre de cenizas) y cenizas (base seca) de los biosólidos y materiales obtenidos mediante activación física.

Temperatura (°C)	Tiempo de activación (h)	C (%)	Cenizas (%)
Biosólidos secos			
n.p.	n.p.	63	23
Carbonizados			
300		79	72
450	0,5	87	73
600		88	73
750		88	75
Activados con CO ₂			
700	2	74	77
	4	72	77
800	2	83	79
	4	78	80
Activados con aire			
200	0,5	60	33
	2	52	33
	4	58	37
	0,5	66	58
300	2	60	61
	4	58	62
	0,5	39	77
400	2	44	80
	4	48	81
Precarbonizados y activados con aire			
200	0,5	87	73
	2	87	74
	4	86	79
	0,5	87	76
300	2	86	78
	4	84	81
	0,5	87	82
400	2	84	83
	4	81	83

En la Tabla 4.3 se muestra la composición de los carbones obtenidos por activación con KOH. Se observa una clara reducción del contenido de C de los

biosólidos tras su activación y lavado con HCl, lo cual podría estar relacionado con la formación de K_2CO_3 mediante mecanismos red-ox (oxidación del carbón y reducción del agente activante), ya que el KOH actúa también como reactivo (Lillo-Ródenas *et al.*, 2008). El aumento de la temperatura de 450 a 750 °C y de la relación KOH:biosólidos de 1:1 a 3:1 duplica la proporción de cenizas.

Tabla 4.3. Contenido en C (base seca y libre de cenizas) y cenizas (base seca) de los materiales obtenidos mediante activación con KOH.

T (°C)	Ratio KOH:biosólidos	C (%)	Contenido de cenizas (%)
450	1:1	63	43
	3:1	55	47
750	1:1	68	67
	3:1	52	87

4.3.1.3 Estructura porosa

La superficie específica de los biosólidos resultantes del secado del lodo no supera los 3 m²/g. Sin embargo, los carbonizados obtenidos por pirólisis de dichos biosólidos arrojaron áreas BET de hasta 44 m²/g a la mayor temperatura estudiada (Fig. 4.5).

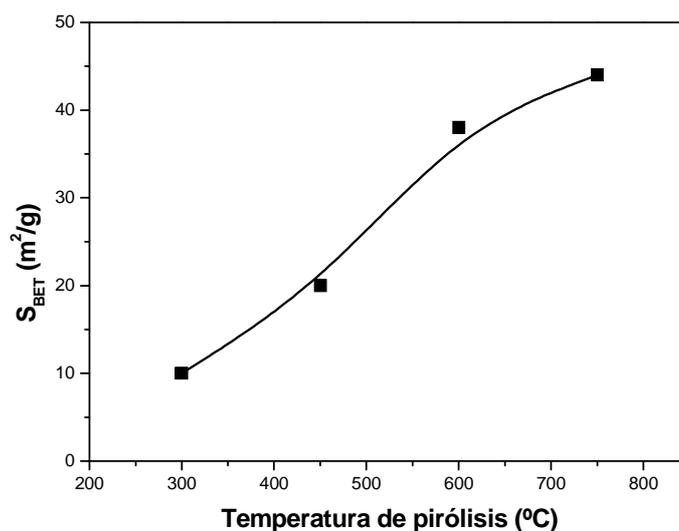


Fig. 4.5. Áreas BET de los materiales pirolizados.

La Tabla 4.4 recoge los valores de área BET y volumen de mesoporos de los materiales carbonosos obtenidos por activación física. Como puede verse, el área BET no supera los 100 m²/g mediante la activación directa con aire o CO₂ de los biosólidos. Los valores obtenidos con este último agente superan los publicados por otros autores (60 m²/g, Jindarom *et al.*, 2007) en condiciones de activación similares. Estos autores tampoco obtuvieron mejores resultados con vapor de agua a 800 °C. No se observó un aumento del área BET al aumentar el tiempo de activación por encima de las 2 h, a excepción de la activación realizada con aire a 200 °C. Sin embargo, la temperatura mostró un efecto significativo sobre el desarrollo de superficie con ambos agentes. El elevado contenido de cenizas del precursor (23%, base seca) limita el desarrollo de porosidad en base a masa total, ya que la gasificación parcial no afecta a la materia inorgánica.

La activación realizada con aire previa pirólisis a 450 °C consiguió un desarrollo de porosidad notablemente mayor, alcanzando áreas BET de más de 300 m²/g a una temperatura de 400 °C. Tampoco en este caso el incremento del tiempo de activación por encima de las 2 h provocó un mayor desarrollo de área BET. Las condiciones de activación ensayadas en el presente estudio permitieron aumentar el desarrollo de área BET respecto a los resultados obtenidos por Méndez *et al.* (2005), que obtuvieron valores en torno a 100 m²/g.

Tabla 4.4. Estructura porosa de los materiales obtenidos por activación física.

T (°C)	Tiempo de activación (h)	S _{BET} (m ² /g)	V _{mesoporos} (cm ³ /g)
Activación con CO ₂			
700	0,5	11	0,01
	2,0	75	0,05
	4,0	79	0,06
800	0,5	20	0,02
	2,0	94	0,04
	4,0	97	0,09
Activación con aire			
200	0,5	7	< 0,01
	2,0	34	0,03
	4,0	47	0,05
300	0,5	13	0,01
	2,0	51	0,05
	4,0	53	0,05
400	0,5	15	0,03
	2,0	92	0,06
	4,0	91	0,07
Prepirólisis + activación con aire			
200	0,5	17	0,01
	2,0	33	0,04
	4,0	31	0,03
300	0,5	53	0,05
	2,0	149	0,11
	4,0	142	0,11
400	0,5	121	0,11
	2,0	327	0,18
	4,0	337	0,19

La activación de los biosólidos con KOH dio lugar a carbones con una estructura porosa bien desarrollada, resultando determinantes tanto la temperatura como la proporción KOH:biosólidos empleada (Tabla 4.5). Un aumento de la temperatura de 450 a 750 °C provocó un incremento sustancial del área BET, debido a un importante desarrollo de la microporosidad, acompañado de una notable contribución de la mesoporosidad. Para una relación KOH:biosólidos 3:1, a 750°C, se alcanzaron valores de área BET y de área externa (no microporosa) en torno a 1.800 y 380 m²/g, respectivamente. Este desarrollo de porosidad es mayor que el obtenido por otros autores, en condiciones de activación similares, a partir de otros precursores, como carbones minerales (Lozano-Catelló *et al.*, 2001; Lillo-Ródenas *et al.*, 2001), cáscara de

pistacho (Wu *et al.*, 2005), maíz (Tseng y Tseng, 2005) o madera de pino o abeto (Wu *et al.*, 2005; Wu y Tseng, 2008).

Tabla 4.5. Estructura porosa de los materiales activados con KOH.

T (°C)	Ratio KOH:biosólidos	S _{BET} (m ² /g)	V _{mesoporos} (cm ³ /g)	V _{microporos} (cm ³ /g)	S _{externa} (m ² /g)
450	1:1	131	0,12	< 0,01	110
	3:1	262	0,16	0,01	184
750	1:1	950	0,23	0,40	268
	3:1	1.832	0,36	0,75	379

4.3.1.4 Morfología superficial

En la Fig. 4.6 se recogen las micrografías obtenidas por SEM de los diferentes materiales. En las Figs. 4.6.1 se observa el aspecto general de las partículas de biosólidos secos, en las que no se aprecia desarrollo de porosidad. Tras el tratamiento térmico en atmósfera de N₂ (Figs. 4.6.2) las partículas muestran una macroporosidad más desarrollada. El detalle de las paredes del gránulo revela que están constituidas por partículas soldadas entre sí conformando estructuras enmarañadas que dan lugar a cavidades de diferentes diámetros. Como se ha indicado, el área BET de los materiales obtenidos por pirólisis no superan los 44 m²/g.

En los materiales activados con aire a diferentes temperaturas (Figs. 4.6.3) se observa el desarrollo de porosidad, tanto sobre la superficie (Figs. 4.6.3a,c) como en el interior de la pared del gránulo (Figs. 4.6.3b). Los materiales prepirolizados y activados con aire no mostraron diferencias morfológicas significativas respecto a los anteriores (Figs. 4.6.4).

Las Figs. 4.6.5 muestran el aspecto de la superficie de los carbones activos obtenidos con CO₂ a 700 y 800 °C. La gasificación da lugar a sólidos de morfología irregular con poros de tamaños diferentes; durante la misma se ensanchan los poros abiertos y se abren poros cerrados (Papirer *et al.*, 1987). El aumento de la temperatura de gasificación hasta 800 °C aumenta la densidad de poros de menor diámetro (Fig. 4.6.5b). El análisis de la superficie del material por EDAX muestra cantidades significativas de Na (5,01%), Al (5,51%), P (5,26%) y Ca (2,61%). El elevado

contenido de Al puede deberse al empleo de policloruro de aluminio durante el tratamiento primario de coagulación-floculación en la depuradora de la que se recogió el lodo de partida.

Los materiales activados con KOH (Fig. 4.6.6) presentan una superficie algodonosa tipo panal de abeja, con paredes estrechas y bien definidas, lo que hace que estos materiales tengan una elevada área superficial, llegando a valores próximos a $1.900 \text{ m}^2/\text{g}$. A diferencia de materiales obtenidos en otros estudios, en el presente trabajo se observa que los poros aparecen libres de componentes inorgánicos gracias al efectivo lavado con HCl tras su activación (Fig. 4.6.6). En las paredes de los materiales aparecen grandes macroporos y algunos poros menores, configurando un complejo sistema de estructura porosa.

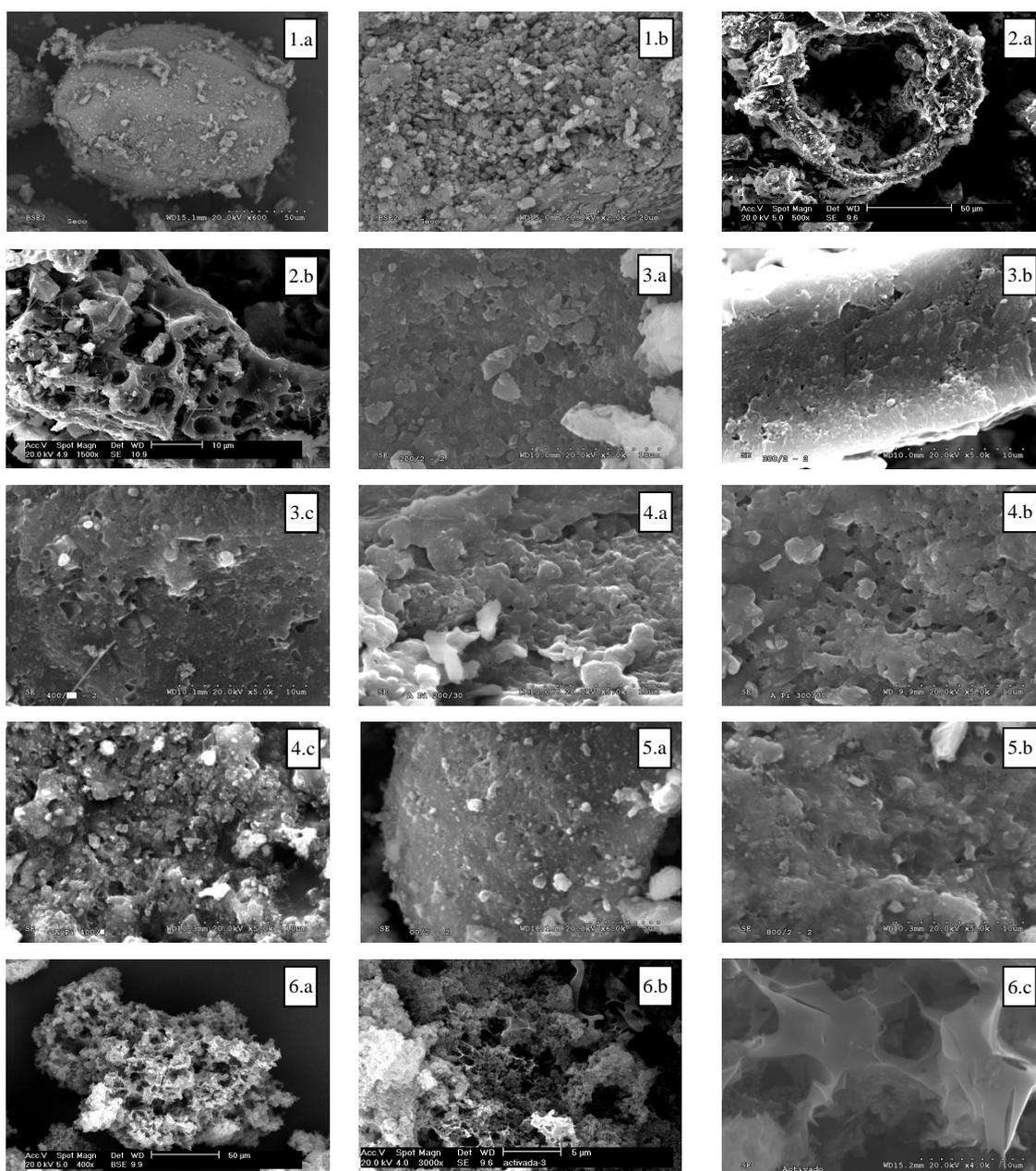


Fig. 4.6. Micrografías SEM de los diferentes materiales carbonosos obtenidos a partir de los biosólidos del lodo de depuradora.

- | | |
|---|---|
| 1. Seco | 4. Prepirolizado/Activado con aire a 200 (A),
300 (B) y 400 °C (C) |
| 2. Pirolizado a 450 °C | 5. Activado con CO ₂ a 700 (A) y 800 °C (B) |
| 3. Activado con aire a 200 (A), 300
(B) y 400 °C (C) | 6. Activado con KOH a 450 °C, ratio
KOH:lodo (3:1) |

4.3.2. Evaluación de la Capacidad de Adsorción

En primer término se realizaron ensayos para conocer el tiempo mínimo requerido para alcanzar el equilibrio de adsorción. Los resultados de los ensayos realizados con los biosólidos se muestran en la Fig. 4.7. El aumento de la temperatura de 15 a 40 °C reduce el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de 5 a 3,5 h trabajando a pH 5 (Fig. 4.7a). El aumento de temperatura hace que las moléculas de adsorbato adquieran un mayor grado de excitación, reduciendo los impedimentos difusionales. La mayor velocidad de adsorción se obtuvo a pH 9 (Fig. 4.7b). Las diferencias en la velocidad del proceso observadas a diferentes valores de pH pueden estar relacionadas con la diferente capacidad de adsorción en el equilibrio a cada uno de ellos y con posibles cambios en la superficie del material.

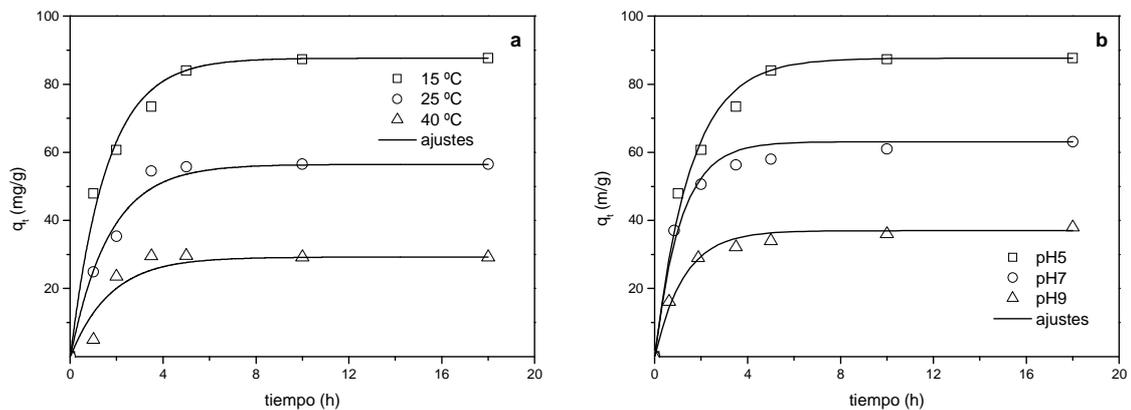


Fig. 4.7. Velocidad de adsorción de 4-CF sobre el biosólido seco. Efecto de la temperatura a pH 5 (a) y del pH a 15 °C (b).

La Fig. 4.8 muestra los ensayos cinéticos con los materiales pirolizados a distintas temperaturas. El tiempo de equilibrio para los carbonizados a 450 °C fue de 20 h. Al aumentar la temperatura de pirólisis hasta 750 °C se observó un aumento en el tiempo de equilibrio hasta 36 h. Este hecho podría deberse al aumento de la microporosidad de los materiales obtenidos a mayores temperaturas.

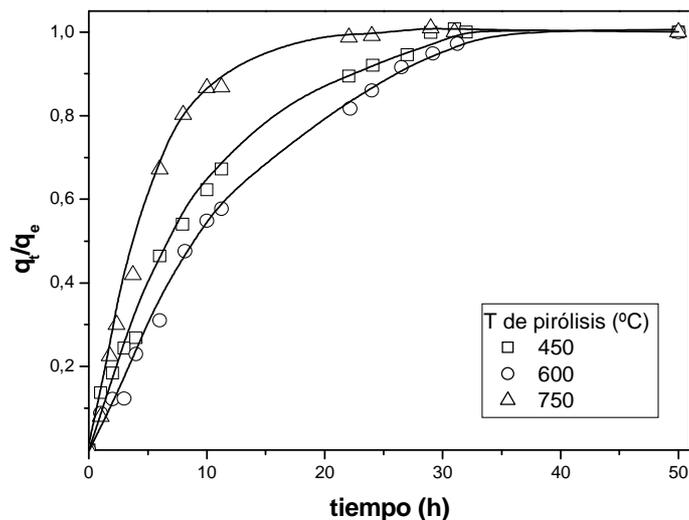


Fig. 4.8. Evolución de la capacidad de adsorción normalizada de 4-CF a 15 °C en función del tiempo para los materiales obtenidos por pirólisis.

El tiempo de equilibrio para los materiales activados con aire, con o sin prepirólisis, resultó inferior al obtenido para los materiales pirolizados, alcanzándose el equilibrio en 20 h (Fig. 4.9).

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en los materiales activados con CO_2 resultó próximo a las 40 h, mientras que alcanzó valores en torno a 48 h en los materiales activados con KOH. Por esta razón, todos los materiales ensayados se mantuvieron en contacto con el adsorbato durante 48 h para asegurar el equilibrio de adsorción de 4-CF.

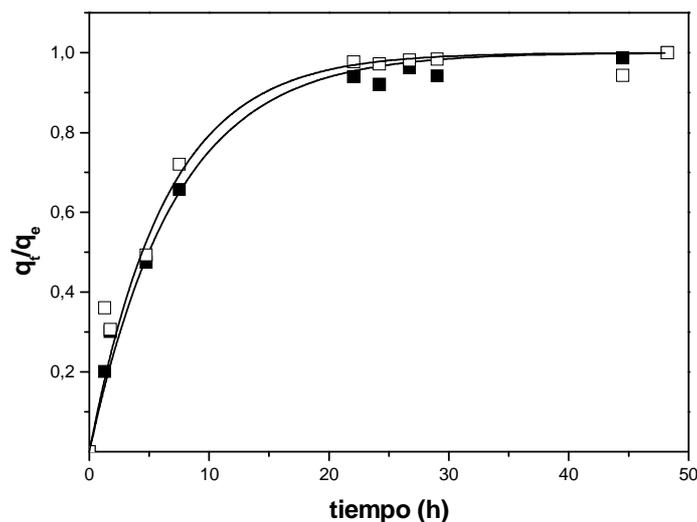


Fig. 4.9. Evolución de la capacidad de adsorción normalizada de 4-CF a 15 °C en función del tiempo para los materiales activados en aire (400 °C, 2 h) con (■) y sin prepirólisis (□).

4.3.2.1 Adsorción de 4-CF sobre biosólidos secos

Las isotermas de adsorción obtenidas a 15 °C, a diferentes pH se muestran en la Fig. 4.10, en la que se observa que la mayor capacidad de adsorción se consiguió a pH 5. En el presente trabajo se estudiaron condiciones de pH moderadas (pH = 5-9) con el objetivo de analizar la aplicabilidad de los adsorbentes preparados en tratamientos combinados de adsorción y de oxidación biológica.

Los valores de pH ensayados están por debajo del pKa del 4-CF (9,18) y son superiores al punto isoeléctrico de los fangos activos (entre 1 y 3). A medida que el pH aumenta, la superficie del sólido adquiere carga negativa, aumentando las repulsiones electrostáticas entre la misma y el adsorbato. Algunos estudios afirman que la dispersión de London también podría disminuir la adsorción a pH elevado (Hamdaoui y Naffrechoux, 2007b). No obstante, a pH 9 se observó cierta capacidad de adsorción (Fig. 4.10), por lo que, probablemente se den otros mecanismos de retención, además de los mencionados, favorecidos por alteraciones en las propiedades de la superficie celular, que pueden dar lugar a interacciones del 4-CF con la misma a través de la formación de complejos, transporte en la membrana o compartición de electrones (Aksu *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 1992).

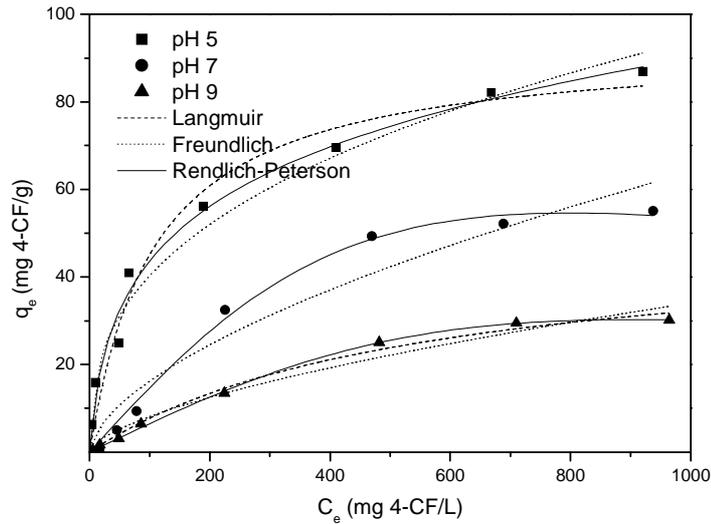


Fig. 4.10. Curvas de adsorción de 4-CF sobre fango seco a diferente pH y 15 °C.

La reducción de la temperatura de 40 a 15 °C supone un aumento notable de la capacidad de adsorción de 4-CF (Fig. 4.11), siguiendo un comportamiento propio de un proceso de adsorción física. A pesar de que el biosólido tiene un área BET inferior a 3 m²/g, muestra una capacidad de adsorción relativamente alta, lo que podría deberse a la presencia de grupos superficiales probablemente asociados a distintos componentes de la pared celular.

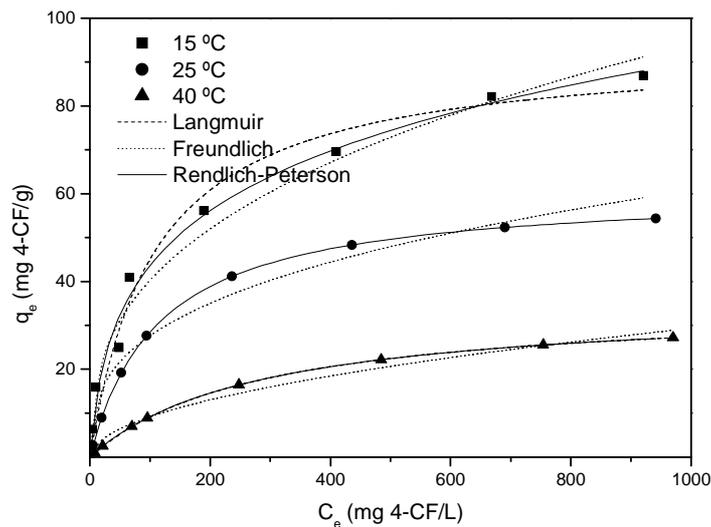


Fig. 4.11. Isothermas de adsorción de 4-CF sobre biosólidos secos a diferentes temperaturas (pH 5).

Puede observarse como los resultados experimentales se ajustan satisfactoriamente a las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson, en tanto que la ecuación de Freundlich muestra un peor ajuste. En la Tabla 4.6 se recogen los valores de los parámetros de ajuste para cada una de estas tres ecuaciones de los datos mostrados en las Figs. 4.10 y 4.11.

Tabla 4.6. Parámetros de ajuste de las isothermas de adsorción de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson, para el sistema biosólido seco/4-CF.

T (°C)	pH	Langmuir $q_e=(Q_L \cdot C_e \cdot K_L)/(1+(K_L \cdot C_e))$				Freundlich $q_e=K_F \cdot C_e^{1/n}$			
		K_L (L/mmol)	Q_L (mmol/g)	χ^2	r^2	K_F (L/g) ⁻ⁿ	n	χ^2	r^2
15	5,0	1,208	0,726	$1 \cdot 10^{-3}$	0,98	0,344	2,723	$1 \cdot 10^{-3}$	0,98
	7,0	0,326	0,640	$7 \cdot 10^{-4}$	0,98	0,147	1,879	$2 \cdot 10^{-3}$	0,95
	9,0	0,238	0,386	$8 \cdot 10^{-5}$	0,99	0,074	1,726	$3 \cdot 10^{-4}$	0,97
25	5,0	0,311	0,575	$8 \cdot 10^{-3}$	0,96	0,234	2,927	$1 \cdot 10^{-3}$	0,96
	7,0	0,405	0,403	$1 \cdot 10^{-3}$	0,99	0,118	2,027	$6 \cdot 10^{-4}$	0,96
	9,0	0,268	0,288	$2 \cdot 10^{-5}$	0,99	0,063	1,728	$7 \cdot 10^{-5}$	0,99
40	5,0	0,459	0,272	$3 \cdot 10^{-6}$	0,99	0,081	1,987	$1 \cdot 10^{-3}$	0,98
	7,0	0,465	0,246	$4 \cdot 10^{-5}$	0,99	0,075	2,025	$1 \cdot 10^{-4}$	0,99
	9,0	0,309	0,189	$7 \cdot 10^{-6}$	0,99	0,048	1,709	$4 \cdot 10^{-4}$	0,95

T (°C)	pH	Redlich-Peterson $q_e=(A \cdot C_e)/(1+(B \cdot C_e^\beta))$				
		A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
15	5,0	2,048	4,482	0,770	$8 \cdot 10^{-4}$	0,990
	7,0	0,151	0,043	1,827	$2 \cdot 10^{-4}$	0,995
	9,0	0,066	0,018	2,043	$1 \cdot 10^{-5}$	0,999
25	5,0	0,536	1,130	1,000	$1 \cdot 10^{-8}$	0,999
	7,0	0,130	0,164	1,310	$5 \cdot 10^{-5}$	0,997
	9,0	0,075	0,235	1,042	$2 \cdot 10^{-5}$	0,998
40	5,0	0,125	0,459	1,000	$1 \cdot 10^{-8}$	0,999
	7,0	0,128	0,632	0,914	$4 \cdot 10^{-5}$	0,995
	9,0	0,084	0,819	0,745	$7 \cdot 10^{-7}$	0,999

Un aspecto interesante es la comparación de la capacidad de adsorción del lodo antes y después del secado (biosólidos). Para evitar los procesos metabólicos que pudiesen tener lugar, el lodo se inhibió con azida sódica (5%, v:v). Empleando las condiciones óptimas de temperatura y pH para los biosólidos (15 °C y pH 5) se alcanzaron capacidades de adsorción de 84,8 y 71,0 mg 4-CF/g, para el biosólido y el lodo metabólicamente inhibido para valores de C_e de 920,7 y 943,8 mg/L, respectivamente. Al contenido lipídico de la membrana de los microorganismos

aerobios se ha atribuido la mayor capacidad de adsorción de los biosólidos de los lodos aerobios frente a los anaerobios (Kennedy *et al.*, 1992). Adicionalmente se evaluó la posible contribución de la absorción en el lodo original, por lo que tras alcanzar el equilibrio de adsorción, se procedió a lisar las células empleando lisozima y, tras una serie de lavados con acetonitrilo, se observó que la absorción tiene un papel irrelevante frente a la adsorción, no suponiendo más allá de un 2% del total de 4-CF retenido.

A partir de los datos de equilibrio se ha realizado un estudio termodinámico, obteniendo los valores de la entalpía de adsorción aplicando la ecuación de Van't Hoff:

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad [4.1]$$

cuya integración conduce a la expresión:

$$K = K_0 \exp\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) \quad [4.2]$$

donde ΔH es el calor isostérico de adsorción, R la constante de los gases ideales, T la temperatura absoluta y K_0 un factor preexponencial. Si se reemplaza el valor de K por la siguiente expresión:

$$K = \frac{q_e}{C_e \cdot (q_m - q_e)} \quad [4.3]$$

donde, q_e es la capacidad de adsorción en el equilibrio para una concentración C_e en el líquido y q_m la capacidad máxima de adsorción, se obtienen las ecuaciones [4.4] a [4.6]:

$$K_0 \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) = \frac{q_e}{C_e \cdot (M - q_e)} \quad [4.4]$$

$$\frac{1}{C_e} = K_0 \cdot \left(\frac{M - q_e}{q_e}\right) \exp\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) \quad [4.5]$$

$$\ln \frac{1}{C_e} = \ln K'_0 + \left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) \quad [4.6]$$

donde

$$\ln K'_0 = K_0 \cdot \left(\frac{M - q_e}{q_e} \right) \quad [4.7]$$

La Fig. 4.12 muestra los valores de ΔH correspondientes a distintos niveles de ocupación de la superficie del adsorbente.

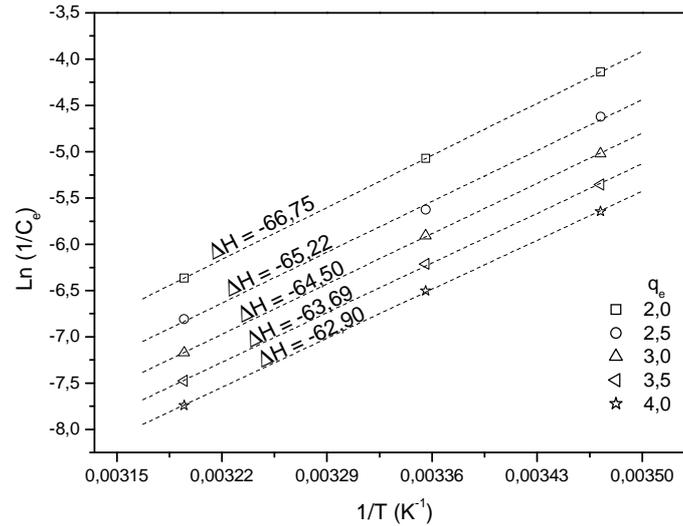


Fig. 4.12. Entalpías de adsorción de 4-CF sobre fango seco a pH 5 (q_e en mmol/g; C_e en mmol/L; ΔH en kJ/mol).

La energía libre de adsorción se calcula mediante la expresión obtenida a partir de la ecuación de Gibbs,

$$\Delta G = - \frac{RT}{q_e} \cdot \int_0^{C_e} q_e \frac{dC_e}{C_e} = -R \cdot T \cdot \ln K_L \quad [4.8]$$

Por su parte, la entropía de adsorción puede calcularse a partir de los valores de ΔH y ΔG mediante:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad [4.9]$$

La Tabla 4.7 recoge los valores de ΔH , ΔG y ΔS . A medida que el nivel de cobertura aumenta se obtienen valores absolutos de ΔH ligeramente inferiores, lo cual sucede habitualmente en superficies heterogéneas, como consecuencia de que la energía de adsorción de los sitios disponibles es menor a medida que se va cubriendo la superficie del adsorbente.

Los valores de energía libre son negativos, lo que indica la naturaleza espontánea de la adsorción. Como se observa en la Tabla 4.7, a medida que aumenta la temperatura lo hacen los valores absolutos de ΔG . El aumento de la temperatura conduce a una disminución de la capacidad de adsorción. Debido a que la adsorción tiene lugar en la mayoría de los sitios activos, este comportamiento conduce a valores molares medios de ΔG más altos. Análogamente, las mayores capacidades de adsorción se alcanzan a menores temperaturas, ya que la media energética descende cubriendo una gran variedad de sitios más o menos activos como consecuencia de la heterogeneidad de la superficie del adsorbente (Cotoruelo *et al.*, 2007). Por último, cabe destacar que los valores negativos de entropía se deben al menor grado de libertad de las moléculas al pasar a la superficie del sólido.

Tabla 4.7. Entalpía, energía libre y entropía de adsorción de 4-CF sobre biosólido seco a distintos valores de pH.

pH	q_e	ΔH (kJ/mol)	ΔG_{288K} (kJ/mol)	ΔG_{298K} (kJ/mol)	ΔG_{313K} (kJ/mol)
5,0			$\Delta G_{288K} = -16,06$	$\Delta G_{298K} = -19,97$	$\Delta G_{313K} = -19,97$ (kJ/mol)
			ΔS	ΔS	ΔS (kJ/mol·K)
	2,5	- 65,22	-0,171	-0,152	-0,145
	3,0	- 64,50	-0,168	-0,149	-0,142
	3,5	- 63,69	-0,165	-0,147	-0,140
	4,0	- 62,90	-0,163	-0,144	-0,137
7,0			$\Delta G_{288K} = -19,19$	$\Delta G_{298K} = -19,32$	$\Delta G_{313K} = -19,93$
			ΔS	ΔS	ΔS
	2,0	- 52,00	-0,114	-0,110	-0,102
	2,5	- 52,85	-0,117	-0,113	-0,105
	3,0	- 53,60	-0,119	-0,115	-0,108
	3,5	- 54,23	-0,122	-0,117	-0,110
	4,0	- 54,77	-0,124	-0,119	-0,111
	4,5	- 55,25	-0,125	-0,121	-0,113
9,0			$\Delta G_{288K} = -19,94$	$\Delta G_{298K} = -20,34$	$\Delta G_{313K} = -20,99$
			ΔS	ΔS	ΔS
	0,2	- 21,13	-0,004	-0,003	0,000
	0,6	- 20,55	-0,002	-0,001	0,001
	1,0	- 20,28	-0,001	0,000	0,002
	2,0	- 19,90	0,000	0,001	0,003
	2,5	- 19,79	0,001	0,002	0,004
	3,0	- 19,69	0,001	0,002	0,004
	3,5	- 19,61	0,001	0,002	0,004
	4,0	- 19,54	0,001	0,003	0,005
	4,5	- 19,48	0,002	0,003	0,005

4.3.2.2 Adsorción de 4-CF sobre carbonizados

La Fig. 4.13 muestra las isothermas obtenidas con los materiales pirolizados a diferentes temperaturas, junto con los ajustes a las ecuaciones de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson. Las capacidades de adsorción son claramente superiores a las obtenidas para el biosólido seco, resultando los valores más elevados los obtenidos con el carbonizado obtenido a 450 °C (174,3 mg 4-CF/g).

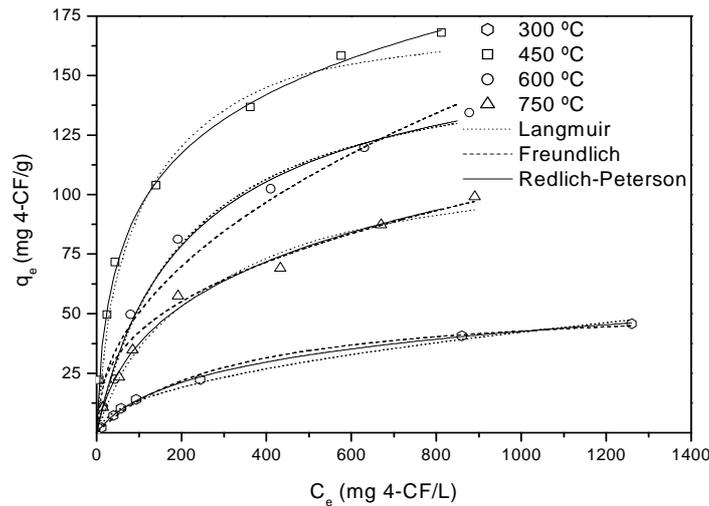


Fig. 4.13. Isothermas de adsorción de 4-CF sobre carbonizados obtenidos a diferentes temperaturas.

El notable aumento del área superficial respecto al biosólido seco explica estas capacidades de adsorción más altas. Sin embargo, la capacidad de adsorción de estos carbonizados no muestra una variación consistente con la evolución del área BET y la temperatura de pirólisis. El carbonizado obtenido a 450 °C presenta la capacidad más alta, aproximadamente doble, en términos de capacidad máxima, que la observada para el material preparado a 750 °C, a pesar de que este último tiene un área BET más de dos veces superior (Tabla 4.4). Un aumento de la temperatura de carbonización conlleva una disminución de la concentración de grupos oxigenados superficiales, lo que, en general, se traduce en una menor capacidad adsorbente.

Las isothermas de adsorción no se ajustan bien a las ecuaciones de Langmuir o Freundlich, obteniéndose los mejores resultados con la ecuación de Redlich-Peterson. Los valores obtenidos para los parámetros de esta ecuación se recogen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Parámetros de la ecuación de Redlich-Peterson para la adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 sobre materiales pirolizados.

Redlich-Peterson $q_e = (A \cdot C_e) / (1 + (B \cdot C_e^\beta))$					
T (°C)	A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
300	0,286	0,034	0,742	$3 \cdot 10^{-4}$	0,999
450	5,043	0,111	0,797	$5 \cdot 10^{-4}$	0,995
600	0,842	0,008	0,942	$1 \cdot 10^{-3}$	0,995
750	0,985	0,057	0,728	$5 \cdot 10^{-7}$	0,999

4.3.2.3 Adsorción de 4-CF sobre materiales activados con CO₂

Las isotermas de adsorción de 4-CF sobre materiales activados con CO₂ se muestran en la Fig. 4.14. La activación con CO₂ durante 0,5 h dio lugar a materiales con baja área BET, cuyas capacidades de adsorción resultaron similares a las obtenidas con el biosólido seco. Un aumento del tiempo de activación a 2 h conduce a una mayor superficie específica, que se tradujo en un aumento sustancial de la capacidad de adsorción, que supera las obtenidas para los carbonizados.

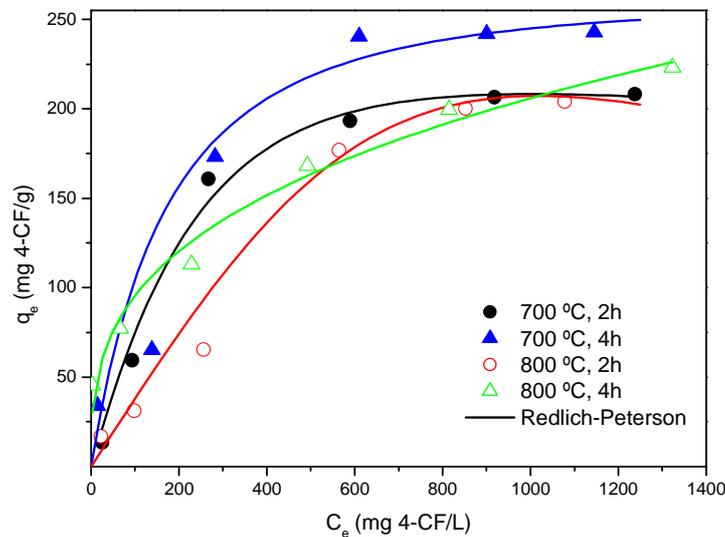


Fig. 4.14. Isotermas de adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 con los materiales activados con CO₂.

Como en el caso de los carbonizados, los resultados experimentales no se ajustan bien a las ecuaciones de Langmuir y Freundlich. Los valores de los parámetros de ajuste a la ecuación de Redlich-Peterson se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Parámetros de la ecuación de Redlich-Peterson para la adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 sobre materiales activados con CO₂.

T (°C)	Tiempo (h)	Redlich-Peterson $q_e=(A \cdot C_e)/(1+(B \cdot C_e^\beta))$				
		A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
700	2,0	0,722	0,134	0,978	$3 \cdot 10^{-3}$	0,99
	4,0	0,646	0,033	0,988	$2 \cdot 10^{-4}$	0,99
800	2,0	0,862	0,251	0,676	$3 \cdot 10^{-4}$	0,99
	4,0	0,903	0,231	0,873	$4 \cdot 10^{-3}$	0,99

4.3.2.4 Adsorción de 4-CF con materiales activados con aire

La activación con aire es un proceso altamente exotérmico (100 veces más rápido que con CO₂) por lo que se desarrolla a temperaturas mucho más bajas (Rodríguez-Reinoso, 1997). El aire ha sido comúnmente empleado en la oxidación de materiales carbonosos con el objetivo de modificar su estructura porosa (Rodríguez-Reinoso *et al.*, 1984; Parra *et al.*, 1996; Gómez-Serrano *et al.*, 1996) y su química superficial (Gómez-Serrano *et al.*, 1996; Otake y Jenkins, 1993), ya que resulta efectivo para la formación de grupos oxigenados en la superficie del carbón.

En la Fig. 4.15 se recogen las isotermas de adsorción de 4-CF con materiales activados con aire. El aumento del tiempo de activación permitió obtener materiales con mayores capacidades de adsorción, alcanzando los valores más elevados a tiempos de activación de 4 h (Fig. 4.15a). Por otro lado, el mayor desarrollo de área BET obtenido a temperaturas de activación elevadas aumentó significativamente la capacidad de adsorción (Fig. 4.15b). Habitualmente la preparación de carbón activo con aire se ha llevado a cabo a temperaturas entre 300 y 350 °C. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que pueden obtenerse adsorbentes con alta capacidad de retención de 4-CF a temperaturas de activación sensiblemente menores (200 °C), a pesar de que el área BET no supera los 100 m²/g. Estas capacidades, superiores a las obtenidas con los materiales activados con CO₂, resultan posibles por la alta concentración de grupos superficiales, que favorecen la adsorción. El aumento de la temperatura y tiempo de activación aumenta las cantidades de CO y CO₂ desorbidas, que alcanzan valores de 2.082 y 1.566 μmol/g de CO y CO₂, respectivamente, en los materiales obtenidos a 400 °C y 4 h. La presencia de grupos superficiales oxigenados

tiene una notable importancia en la adsorción de derivados fenólicos (Mattson *et al.*, 1969).

De esta forma, la activación con aire, a temperaturas relativamente bajas, se presenta como una vía muy interesante para la preparación de adsorbentes a partir de lodos de depuradora.

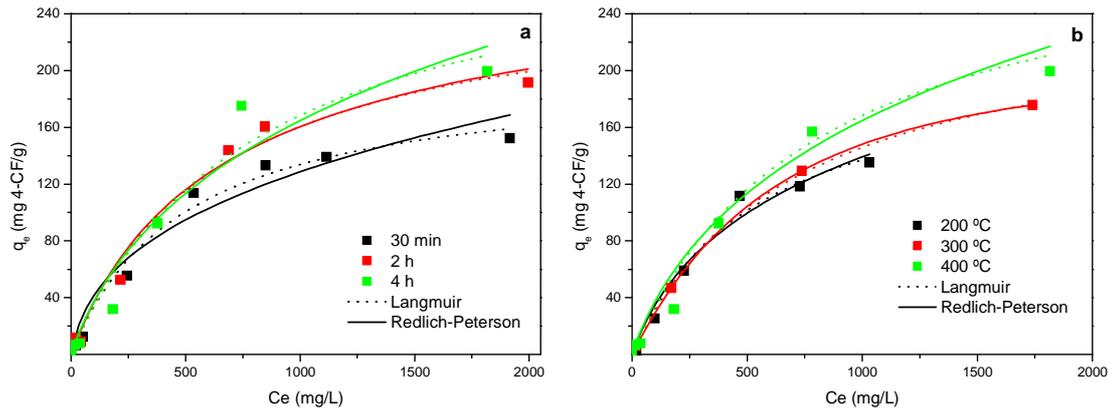


Fig. 4.15. Isothermas de adsorción de 4-CF a 15 °C con materiales activados con aire a 400 °C y distintos tiempos de activación (a) y durante 4 h a diferentes temperaturas de activación (b).

En el caso de los materiales activados con aire, las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson ajustan bien los datos experimentales (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Parámetros de las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson para la adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 sobre materiales activados con aire.

T (°C)	Tiempo (h)	Langmuir $q_e=(Q_L \cdot C_e \cdot K_L)/(1+(K_L \cdot C_e))$				Redlich-Peterson $q_e=(A \cdot C_e)/(1+(B \cdot C_e^\beta))$				
		K_L (L/mmol)	Q_L (mmol/g)	χ^2	r^2	A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
200	0,5	0,456	1,815	$5 \cdot 10^{-3}$	0,984	0,538	0,071	1,667	$7 \cdot 10^{-4}$	0,993
	2,0	0,598	1,993	$1 \cdot 10^{-3}$	0,995	1,317	0,752	0,943	$2 \cdot 10^{-3}$	0,997
	4,0	0,237	1,644	$4 \cdot 10^{-3}$	0,997	0,291	0,031	1,774	$2 \cdot 10^{-3}$	0,998
300	0,5	0,249	0,332	$6 \cdot 10^{-5}$	0,998	0,060	0,052	1,462	$1 \cdot 10^{-6}$	0,995
	2,0	0,382	0,697	$2 \cdot 10^{-4}$	0,991	0,389	0,927	0,811	$1 \cdot 10^{-8}$	0,996
	4,0	0,185	1,922	$2 \cdot 10^{-4}$	0,993	0,315	0,108	1,140	$2 \cdot 10^{-5}$	0,995
400	0,5	0,261	1,555	$3 \cdot 10^{-4}$	0,994	0,280	0,431	0,883	$1 \cdot 10^{-3}$	0,997
	2,0	0,201	2,046	$6 \cdot 10^{-3}$	0,997	0,254	0,010	0,747	$8 \cdot 10^{-4}$	0,997
	4,0	0,159	2,372	$2 \cdot 10^{-2}$	0,965	0,235	0,346	0,804	$2 \cdot 10^{-3}$	0,993

4.3.2.5 Adsorción de 4-CF con materiales precarbonizados y activados con aire

Debido a los buenos resultados obtenidos en la adsorción de 4-CF con los materiales activados con aire se planteó la posibilidad de evaluar la capacidad de adsorción de materiales sometidos a una etapa de carbonización previa a la activación con aire. Así, se utilizó el carbonizado obtenido a 450 °C, el de mayor capacidad de adsorción entre los materiales obtenidos por pirólisis. Por otra parte, a esta temperatura el rendimiento en sólido es más alto que a temperaturas mayores, con lo que se generan menores cantidades de productos de pirólisis y la posibilidad de bloqueo de poros es más baja y el proceso de gasificación con aire podría ser más efectivo.

La Fig. 4.16 muestra las isothermas de adsorción de 4-CF obtenidas con estos materiales. Cabe destacar la baja capacidad de adsorción respecto a las obtenidas por activación directa con aire o CO₂, a pesar de su mayor área BET (Tabla 4.4). Los adsorbentes con mayor capacidad se obtuvieron a una temperatura de activación de 400 °C. Los resultados experimentales se ajustan bien a las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson. Los valores de los parámetros de ajuste se recogen en la Tabla 4.11.

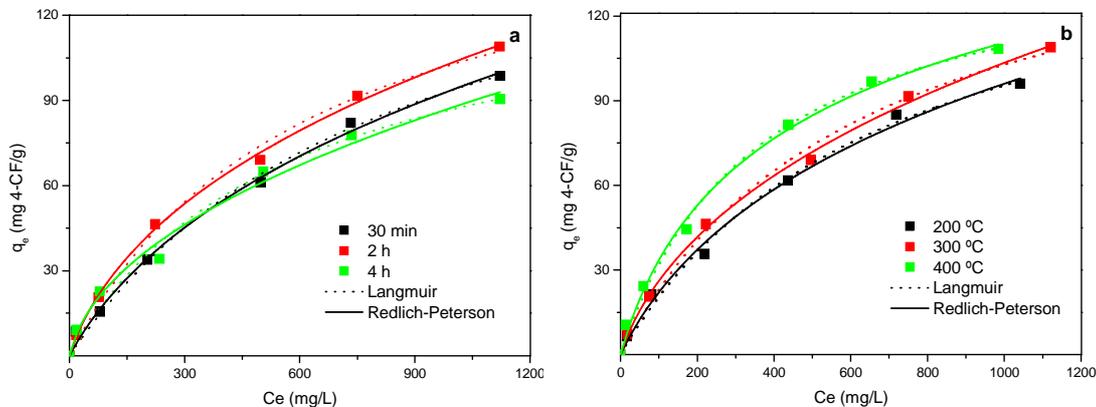


Fig. 4.16. Isothermas de adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 con materiales precarbonizados y activados con aire a 300 °C y distintos tiempos de activación (a) y durante 2 h a distintas temperaturas (b).

Tabla 4.11. Parámetros de las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson para la adsorción de 4-CF a 15 °C y pH 7 sobre materiales precarbonizados y activados con aire.

T (°C)	Tiempo (h)	Langmuir $q_e=(Q_L \cdot C_e \cdot K_L)/(1+(K_L \cdot C_e))$				Redlich-Peterson $q_e=(A \cdot C_e)/(1+(B \cdot C_e^\beta))$				
		K_L (L/mmol)	Q_L (mmol/g)	χ^2	r^2	A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
200	0,5	0,506	0,569	$4 \cdot 10^{-4}$	0,990	0,733	2,672	0,700	$1 \cdot 10^{-4}$	0,997
	2,0	0,189	1,249	$5 \cdot 10^{-4}$	0,995	0,300	0,440	0,770	$6 \cdot 10^{-4}$	0,995
	4,0	0,143	0,756	$2 \cdot 10^{-4}$	0,994	0,490	3,502	0,438	$1 \cdot 10^{-4}$	0,996
300	0,5	0,158	1,305	$5 \cdot 10^{-4}$	0,995	0,193	0,148	0,958	$6 \cdot 10^{-4}$	0,995
	2,0	0,212	1,358	$1 \cdot 10^{-4}$	0,999	0,484	0,998	0,636	$1 \cdot 10^{-4}$	0,998
	4,0	0,225	1,063	$1 \cdot 10^{-3}$	0,987	0,894	3,039	0,540	$1 \cdot 10^{-3}$	0,991
400	0,5	1,236	0,498	$3 \cdot 10^{-4}$	0,997	0,827	2,032	0,907	$5 \cdot 10^{-5}$	0,999
	2,0	0,353	1,159	$6 \cdot 10^{-4}$	0,996	0,308	0,259	0,894	$7 \cdot 10^{-4}$	0,995
	4,0	0,638	0,503	$9 \cdot 10^{-4}$	0,988	0,846	3,253	0,722	$3 \cdot 10^{-5}$	0,999

4.3.2.6 Adsorción de 4-CF con materiales activados con KOH

La activación con KOH se realizó directamente sobre la mezcla física del biosólido seco y la base, ya que este método resulta más efectivo que la impregnación o mezclado físico sin molienda (Ros *et al.*, 2006).

Para el material activado a 450 °C con una relación KOH:biosólidos de 3:1 y lavado posteriormente con agua se obtuvo una capacidad de adsorción de 94,7 mg 4-CF/g, para una C_e de 1250 mg/L y una temperatura de 15 °C. Si el lavado se realiza con HCl, la capacidad aumenta hasta 327,3 mg 4-CF/g. Este resultado revela la necesidad del proceso de lavado con ácido tras la activación con KOH, obteniendo capacidades de adsorción considerablemente superiores gracias al desbloqueo de poros ocluidos por sales de potasio y la desmineralización de los materiales resultantes (Benaddi *et al.*, 1998; El-Hendawy, 2005; Ros *et al.*, 2006; Derylo-Marczwska *et al.*, 2008).

En la Fig. 4.17 se muestran las isotermas de adsorción de 4-CF a pH 7 y 15 °C obtenidas con los materiales activados con KOH. Las capacidades de adsorción obtenidas son significativamente superiores a las observadas para el resto de materiales estudiados, dado el desarrollo de porosidad sustancialmente mayor conseguido con KOH, como consecuencia de que este agente activante ataca también a la fracción inorgánica del precursor. El aumento de la temperatura de activación (Fig. 4.17a) y de la proporción de KOH (Fig. 4.17b) permitió obtener mayores capacidades de adsorción, lo cual puede estar relacionado con un mayor desarrollo de área BET.

Los materiales activados con una relación KOH:biosólidos (3:1) a 450 °C desorbieron 1.947 $\mu\text{mol/g}$ de CO y 243 $\mu\text{mol/g}$ de CO₂, valores sensiblemente inferiores a los obtenidos en los materiales activados con aire, lo que indica una menor funcionalización de los mismos. El aumento de la temperatura de activación hasta 750 °C disminuyó las cantidades de CO₂ y CO desorbidas hasta valores de 976 y 116 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente. La reducción de la capacidad de adsorción provocada por una menor densidad de grupos oxigenados superficiales fue contrarrestada por el notable desarrollo de la porosidad. Los resultados experimentales se ajustaron bien a las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson. La Tabla 4.12 recoge los valores de los parámetros de ajuste.

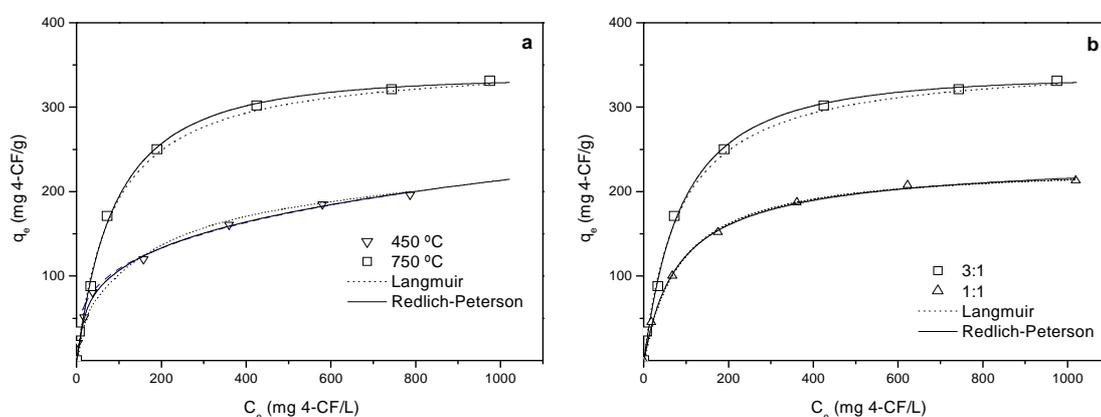


Fig. 4.17. Isothermas de adsorción de 4-CF a pH 7 y 15 °C obtenidas con los materiales activados con un ratio KOH:biosólidos de 3:1 a distintas temperaturas (a) y a 750 °C empleando distintas relaciones KOH:biosólidos (b).

Tabla 4.12. Parámetros de ajuste de las ecuaciones de Langmuir y Redlich-Peterson para la adsorción de 4-CF sobre materiales activados con KOH.

T (°C)	Ratio	Langmuir $q_e=(Q_L \cdot C_e \cdot K_L)/(1+(K_L \cdot C_e))$				Redlich-Peterson $q_e=(A \cdot C_e)/(1+(B \cdot C_e^\beta))$				
		K_L (L/mmol)	Q_L (mmol/g)	χ^2	r^2	A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
450	1:1	1,165	1,498	$2 \cdot 10^{-3}$	0,997	2,095	1,607	0,935	$2 \cdot 10^{-3}$	0,995
	3:1	1,910	1,559	$9 \cdot 10^{-3}$	0,985	10,734	10,844	0,742	$1 \cdot 10^{-3}$	0,998
750	1:1	1,478	1,809	$8 \cdot 10^{-4}$	0,998	2,912	1,712	0,969	$8 \cdot 10^{-4}$	0,994
	3:1	1,474	2,820	$3 \cdot 10^{-3}$	0,993	3,794	1,235	1,044	$3 \cdot 10^{-3}$	0,995

4.4. Consideraciones Finales

El empleo de materiales adsorbentes, obtenidos a partir de fangos activos, ha permitido obtener capacidades máximas de adsorción de 4-CF a 15 °C entre 82 y 362 mg 4-CF/g (Fig. 4.18). Las menores capacidades de adsorción corresponden a los biosólidos secos, al tratarse de materiales no porosos y con elevado contenido en cenizas. La carbonización de los biosólidos permitió obtener materiales con áreas BET en torno a 44 m²/g, lo que conduce a un aumento sustancial de la capacidad de adsorción. Sin embargo, la gasificación parcial con aire de los materiales pirolizados, a pesar de alcanzar áreas BET próximas a 340 m²/g, no mejoró las capacidades obtenidas con los materiales carbonizados.

La gasificación parcial de los biosólidos empleando CO₂ o aire permitió obtener materiales con áreas BET en torno a 100 m²/g y aumentar la capacidad de adsorción de 4-CF hasta valores en torno a 305 mg 4-CF/g en el caso del aire. Estos materiales mostraron una elevada densidad de grupos superficiales oxigenados, lo que se tradujo en un aumento de la capacidad de adsorción.

Por último, los materiales obtenidos por activación con KOH, mostraron un elevado desarrollo de porosidad, alcanzando áreas BET en torno a 1.832 m²/g y capacidades de adsorción de 4-CF superiores a 360 mg 4-CF/g.

Entre los materiales utilizados, los obtenidos por gasificación parcial con aire resultan especialmente atractivos, por ser un método de preparación económico, medioambientalmente aceptable y que conduce a capacidades elevadas de adsorción del compuesto estudiado.

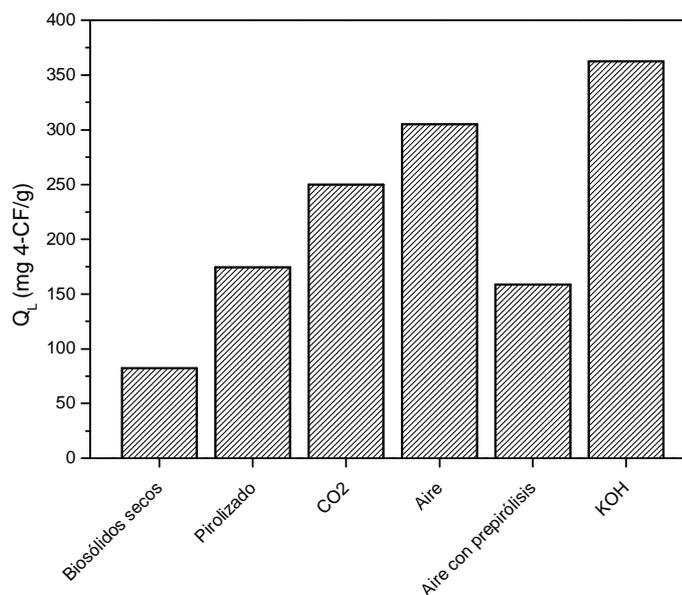


Fig. 4.18. Capacidades máximas de adsorción de 4-CF, según la ecuación de Langmuir, obtenidas a pH 7 y 15 °C empleando adsorbentes obtenidos mediante diferentes métodos de preparación.

V. EMPLEO DE SOPORTES CARBONOSOS PARA EL TRATAMIENTO DE 4-CF EN SBBR

“Viento del Este, agua como peste”, refrán rioplatense.

5.1. Introducción

Los primeros sistemas biológicos de depuración de aguas residuales surgieron a finales del siglo XIX, basados en procesos con biopelículas (Lazarova y Manem, 2000). Posteriormente, el sistema de fangos activos se impuso en la depuración biológica de aguas residuales urbanas. La limitación de espacio para instalar plantas de tratamiento de aguas residuales ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías en las que se incrementa la capacidad de los sistemas de depuración por unidad de área construida. Una de las alternativas con las que se logra retener una elevada concentración de biomasa en el interior del reactor son los sistemas que utilizan el crecimiento fijo desarrollando biopelículas.

Las biopelículas son conglomerados de microorganismos donde predominan las bacterias heterótrofas impartiendo al conjunto adhesión gracias a la producción de polímeros extracelulares, principalmente polisacáridos. Para protegerse de posibles condiciones adversas del medio, las bacterias se agrupan en colonias, bien sobre sí mismas o bien sobre algún tipo de soporte (Fig. 5.1). El crecimiento de la biopelícula sobre el soporte hace que en las capas internas se desarrollen condiciones anaerobias, lo que permite un desarrollo autocontrolado determinado por la carga orgánica tratada. Estudios a base de microscopía confocal han mostrado que la estructura de la biopelícula no responde a la de una matriz sólida continua, sino que cuenta con canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno (Costerton, 1999). Los microorganismos en biopelículas poseen algunas ventajas sobre los suspendidos, tales como prolongada persistencia en el sistema, elevada velocidad de crecimiento y actividad metabólica y mayor resistencia a los agentes tóxicos (Characklis y Marshall, 1990). La estabilidad de los sistemas a base de biopelículas permite mayores cambios en la composición del influente que los sistemas en suspensión (Kaballo, 1997; Wilderer y McSwain, 2004). La resistencia de la biopelícula puede aumentarse si se emplean como soportes materiales porosos (Cunningham *et al.*, 1991).

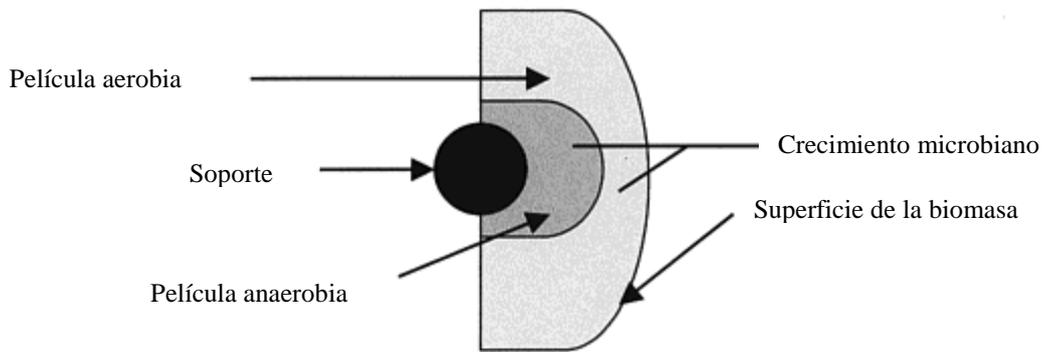


Fig. 5.1. Biopelícula desarrollada sobre un soporte sólido.

Debido a las múltiples ventajas de los reactores biológicos con biopelículas y la facilidad de adaptar su diseño a multitud de aplicaciones, en las últimas décadas este tipo de sistemas ha experimentado un notable desarrollo, con aportaciones tecnológicas orientadas a una mayor adaptación a las necesidades de tratamiento de aguas residuales de distintas procedencias. A partir de los sistemas más clásicos, como lechos bacterianos, lechos fluidizados o biodiscos, se han desarrollado nuevos reactores, en los que se emplean soportes plásticos rígidos, lechos totalmente sumergidos, lechos expandidos o contactores biológicos rotatorios, en los que se aporta aire. Este tipo de modificaciones permiten el tratamiento de materia orgánica, nutrientes y compuestos recalcitrantes en un único proceso.

Recientemente se han desarrollado sistemas híbridos entre la tecnología SBR y los reactores de biopelícula de lecho móvil (en inglés, moving bed biofilm reactors, MBBR), a los que se denomina reactores secuenciales discontinuos con biopelícula (en inglés, sequencing batch biofilm reactors, SBBR). Este tipo de sistemas resulta interesante para la degradación de contaminantes refractarios con altas eficacias (Irvine y Moe, 2001).

Los sistemas con biopelículas en los que se emplean soportes móviles evitan los problemas de atascamiento que provoca el crecimiento excesivo de biomasa en los reactores de lecho fijo. El uso de soportes que actúen al mismo tiempo como adsorbentes, empaquetados o en suspensión, en SBR, es una opción interesante para el tratamiento de aguas residuales que contengan tóxicos, ya que se incrementa la eficacia por unidad de volumen (Wilderer, 1992). La capacidad adsorbente de dichos soportes reduce la concentración máxima de los tóxicos alcanzada tras el llenado, disminuyendo el efecto inhibitorio. Durante la etapa de reacción, al mismo tiempo que las aguas se degradan biológicamente, la regeneración biológica del adsorbente permite su uso

durante un mayor número de ciclos de tratamiento. En los SBR los procesos de adsorción y biodegradación/desorción pueden realizarse en un mismo ciclo, lo cual facilita el control del proceso.

Además de las ventajas de un sistema SBR convencional, los SBBR presentan una serie de ventajas adicionales:

- Se minimiza el lavado de biomasa.
- Se puede operar con elevadas concentraciones de biomasa, lo cual reduce el volumen del reactor, y con largos tiempos medios de residencia celular.
- Se requiere un menor control de la purga de biomasa, ya que el espesor de la biopelícula se autorregula como consecuencia de los gradientes de oxígeno, sustrato y nutrientes en la misma.
- Son bastante resistentes a choques tóxicos.
- La gran diversidad del consorcio microbiano incrementa la actividad biológica y la velocidad de degradación.
- Reducen la emisión de compuestos orgánicos volátiles.

Los reactores SBBR se han empleado en el tratamiento de efluentes muy diversos (Tabla 5.1), consiguiendo, en la mayoría de los casos, mejores rendimientos que los obtenidos mediante sistemas de biomasa en suspensión. Este tipo de reactores resultan especialmente interesantes cuando el proceso requiere organismos de crecimiento lento, cuando la concentración o composición del agua residual dificultan el crecimiento celular o para el tratamiento de efluentes con fluctuaciones de la carga hidráulica (Woolard, 1997; Wilderer y McSwain, 2004). Además, permiten el control de la composición y actividad de la comunidad microbiana, por lo que presentan una elevada capacidad para el tratamiento de aguas residuales que contengan compuestos difícilmente biodegradables, como los clorofenoles.

El tratamiento biológico de clorofenoles en continuo se ha estudiado tanto en lecho fijo como móvil (Doke *et al.*, 2004). La principal desventaja de los sistemas de lecho fijo es la estratificación de la biomasa causada por gradientes de concentración de sustrato en la dirección del flujo (Kaballo *et al.*, 1995). El incremento puntual de la carga tratada en estos sistemas provoca que la materia orgánica se distribuya

preferentemente en los niveles del lecho con una menor densidad de biomasa activa (Boller y Gujer, 1985; Kaballo *et al.*, 1994). El empleo de una estrategia de operación discontinua secuencial permite controlar este problema (Wilderer, 1992; Wilderer *et al.*, 1993; Kaballo y Wilderer, 1993; Kaballo *et al.*, 1995). La biopelícula resultante es más fina, lo que reduce las limitaciones de transporte de materia, conduciendo a velocidades específicas de consumo de sustrato superiores a las obtenidas en continuo (Kaballo *et al.*, 1995). Mediante este tipo de reactores se evitan problemas de taponamiento y formación de canales preferenciales, como sucede en reactores de lecho fijo, los cuales pueden causar caídas de eficacia de hasta casi un 70% (Carvalho *et al.*, 2001).

Tabla 5.1. Aplicaciones de los sistemas SBBR.

Efluente tratado	Referencia
Aguas de la deshidratación de lodos	Arnold <i>et al.</i> , 2000; Vandaele <i>et al.</i> , 2000
Metales	Sirianuntapiboon y Ungkaprasatcha, 2007b
Industria textil	Sirianuntapiboon <i>et al.</i> , 2007a; Soon-An <i>et al.</i> , 2008; Sirianuntapiboon y Sansak, 2008
Aguas complejas provenientes de procesos químicos	Chang <i>et al.</i> , 2000; Rao <i>et al.</i> , 2005; Mohan <i>et al.</i> , 2007
Lixiviados de vertedero	Doellerer y Wilderer, 1996
Tratamiento de nutrientes	Pambrun <i>et al.</i> , 2004; Canto <i>et al.</i> , 2008; Kargi y Eyiisleyen, 1995; Fang <i>et al.</i> , 1993; Gonzalez-Martinez y Wilderer, 1991; Shin y Park, 1991; Iwai <i>et al.</i> , 1990, Bortone <i>et al.</i> , 1994; Fang y Ling, 1995; Garzon-Zuniga y González-Martínez, 1996
Industria de curtidos	Yamamoto y Win, 1991; Di Iaconi <i>et al.</i> , 2004
Tricloroetileno	Fitch <i>et al.</i> , 1996
Hipersalinas	Woolard e Irvine, 1994
3-metilpiridina	Carini, 1999
Anticongelante	Safferman <i>et al.</i> , 1998
Tolueno	Chozick e Irvine, 1991
Cianuro	White y Schnabel, 1998
Atrazina	Protzman <i>et al.</i> , 1999
Municipales	Nerger <i>et al.</i> , 1996
Compuestos fenólicos y clorofenólicos	
fenol	Koch <i>et al.</i> , 1991; Kolb y Wilderer, 1996; Farabegoli <i>et al.</i> , 2008
2-clorofenol	Kolb y Wilderer, 1996; Farabegoli <i>et al.</i> , 2008
4-clorofenol	Kaballo <i>et al.</i> , 1995; Kaballo y Wilderer, 1995; Kaballo, 1997 y 1998a y b; Carvalho <i>et al.</i> , 2001
2,4-diclorofenol	Quan <i>et al.</i> , 2003
2,4,5-triclorofenol	Wobus <i>et al.</i> , 1995

A lo largo de estos años de aplicación de la tecnología con biopelículas se han empleado diversos tipos de soportes, tales como plásticos (Wilderer *et al.*, 2000), en algunos casos reutilizados (PROSIL[®]), arcillas (Kaballo *et al.*, 1995; Kaballo, 1998b; Wilderer *et al.*, 2000), vidrio (Bjornsson *et al.*, 1997), arena (Koch *et al.*, 1991), espuma (Morales *et al.*, 2006), zeolitas (Zwenger *et al.*, 2000; Wilderer *et al.*, 2000) y roca volcánica (Buitrón y Ortiz, 1998; Buitrón *et al.*, 2003). En el caso concreto de los SBBR, se han empleado un gran número de soportes diferentes, dependiendo del tipo de aguas tratadas (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Soportes empleados para el tratamiento de aguas en SBBR (Adaptado de Carini, 1999).

Efluente tratado	Referencia
Lecho fijo	
Geotextil	Valentis y Lesavre, 1990
Empaquetado estructural	Gonzalez-Martinez y Wilderer, 1991
Anillos simples	Iwai <i>et al.</i> , 1990
Membranas	Yamamoto y Win, 1991; Roeske <i>et al.</i> , 1993; Woolard e Irvine, 1994; Wobus <i>et al.</i> , 1995; Doellerer y Wilderer, 1996; White y Schnabel, 1998
Carbón activo granular y membranas	Jaar y Wilderer, 1992; Chozick e Irvine, 1991
Empaquetado en fibras	Fang <i>et al.</i> , 1993; Fang y Ling, 1995
Arcillas expansivas	Doellerer y Wilderer, 1995; Carini, 1999
Anillos de empaquetamiento	Muñoz-Colunga y González-Martínez, 1996; Garzon-Zuniga y González-Martínez, 1996; Protzman <i>et al.</i> , 1999
Pellets de tierra de diatomeas	Fitch <i>et al.</i> , 1996
Esferas de vidrio	Fitch <i>et al.</i> , 1996
Lecho móvil	
Espuma de poliuretano	Shin y Park, 1991; Bortone <i>et al.</i> , 1994
Arena	Safferman <i>et al.</i> , 1998
Bentonita	Theis <i>et al.</i> , 1985

En el caso de las aguas residuales industriales el soporte más empleado es el carbón activo (Koch *et al.*, 1991; Kolb y Wilderer, 1995; Wilderer *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Sirianuntapiboon *et al.*, 2007a, b y 2008; Soon-An *et al.*, 2008). A diferencia del resto de soportes, el carbón activo presenta una elevada área superficial que proporciona una alta capacidad de adsorción de los compuestos orgánicos contenidos en el agua residual. En este sentido, la eficiencia del proceso, en términos de costes, puede incrementarse cuando el proceso de adsorción se combina con el de

regeneración biológica, disminuyendo la cantidad de carbón activo que debe regenerarse o reponerse en el sistema por unidad de tiempo (Kolb y Wilderer, 1995).

Por consideraciones económicas y/o ambientales, la mayoría de los soportes, incluyendo el carbón activo, requieren una separación posterior tras la purga de lodo. El coste de regeneración de carbón activo por métodos térmicos se estima entre unos 0,4 y 0,8 €/kg, lo que para un carbón activo comercial empleado en el tratamiento de aguas representaría en torno al 50% del coste del adsorbente virgen (Hendricks, 2006). Frente a los elevados costes de producción, separación y/o regeneración de los soportes tradicionales, la utilización de soportes obtenidos a partir de lodo excedentario para el tratamiento de aguas residuales se considera una alternativa barata, debido, principalmente, al reducido coste de producción, lo que hace innecesaria su recuperación. Recientemente se han utilizado procedimientos económicos que han resultado eficaces para la preparación de adsorbentes a partir de lodo de depuradora, al cual se le considera un residuo, por lo que los costes del material inicial resultan nulos. Los costes de transporte también pueden ser bajos, llegando a ser insignificantes si los soportes se utilizan en la misma planta donde se generan.

El tratamiento previo mediante adsorción evita el efecto inhibitorio de las aguas residuales que contienen tóxicos sobre el sistema biológico. En esta configuración la regeneración biológica del adsorbente únicamente se dará si éste se alimenta al biorreactor (Hutchinson *et al.*, 1990). Los fenómenos de adsorción y biorregeneración suceden simultáneamente y de este modo, los microorganismos obtienen el sustrato tanto del medio como de la superficie del adsorbente, promoviendo la colonización del soporte sobre el que se desarrolla la biopelícula (Jaar, 1991; Kolb, 1997).

En el presente capítulo se estudia la aplicabilidad del sistema SBBR para el tratamiento de 4-CF empleando como soportes carbón activo comercial y el material resultante de la pirólisis de biosólidos obtenidos a partir de lodo biológico excedentario. Se analiza la influencia de la carga tratada, así como la evolución del proceso degradativo y su relación con el desarrollo de la biopelícula y la regeneración biológica de los soportes. Finalmente, se evalúa la estabilidad de los SBBR frente a aumentos puntuales de la carga orgánica.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Reactores Discontinuos Secuenciales

Los reactores discontinuos secuenciales con biopelícula (SBBR) son idénticos a los sistemas SBR descritos en el Capítulo II. Los SBBR con biosólido pirolizado (SBBR-BP) y con carbón activo (SBBR-CA) operaron a 35 °C, empleando un t_{HR} de 10,5 d y ciclos de 12 h, con una hora de llenado anóxico, 9,5 h de reacción aerobia, 1 h de sedimentación y 0,5 h de vaciado.

5.2.2. Fuente de Inóculo

Los reactores se inocularon con 2 g/L de lodo biológico flocculento previamente aclimatado a la degradación de 4-CF y una concentración de soporte-adsorbente de 1 g/L. La adición de soporte solamente se realizó en la puesta en marcha de los reactores, ya que se pretende analizar la influencia de la biopelícula desarrollada en soportes porosos sobre la eficacia del proceso.

5.2.3. Preparación de los Soportes y Experimentos de Adsorción

El carbón activo comercial (CA), de Merck se trituró y tamizó a tamaños de partícula entre 100 y 250 μm . La obtención del material carbonoso pirolizado a partir del lodo biológico se realizó según el protocolo descrito en el Capítulo IV.

Los experimentos de adsorción se realizaron *in situ* en los SBBR. Para evitar la actividad metabólica del lodo biológico, durante dichos experimentos se añadió cloranfenicol tras la etapa de llenado, el cual inhibe la síntesis de proteínas que intervienen en la de péptidos a nivel ribosomal, impidiendo la mayor parte de la actividad biológica sin interferir en la formación de la pared celular como sucede con otros antibióticos (Lehninger, 1970; Atlas, 1988; Armenante *et al.*, 1996).

Los ensayos de adsorción se realizaron en frascos de vidrio Pyrex con un volumen útil de 75 mL a pH 7 y 35 °C, empleando un baño termostático con agitación orbital, a una velocidad de agitación equivalente de 200 rpm. El tiempo de contacto fue de 5 y 20 h para el CA y el BP, respectivamente, lo que permite determinar la capacidad de adsorción de los soportes frescos durante la etapa de llenado. Cada ensayo se realizó empleando partículas de adsorbente entre 100 y 250 μm , una concentración de adsorbente de 1 g/L y diferentes concentraciones de 4-CF (0,05 - 1 g/L).

5.2.4. Composición del Agua Tratada

Los influentes alimentados a los reactores se prepararon según se ha descrito en el Capítulo II. La concentración de entrada de 4-CF se aumentó paulatinamente desde 630 hasta 3.570 mg/L, alcanzando valores en el interior del reactor entre 8 y 156 mg/L, llegando a tratar una carga másica de 1,4 kg DQO/kg SSVLM·d (Tabla 5.3). La concentración de fenol en la alimentación se mantuvo en 525 mg/L. Además, se añadió una fuente de nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes (cloruro de hierro (III) 6-hidrato, cloruro cálcico anhidro, cloruro potásico, sulfato magnésico) empleando una proporción másica DQO:N:P:micronutrientes de 100:0,5:0,1:0,05. El influente se mantuvo a 6 °C para evitar la volatilización de los compuestos tóxicos. Para asegurar la estabilidad del sistema, antes de la toma de datos, el reactor operó con cada una de las concentraciones tratadas durante al menos 3 semanas.

Tabla 5.3. Concentraciones de 4-CF, carga volumétrica y carga másica estudiadas a lo largo de la experimentación.

4-CF influyente (mg/L)	4-CF reactores teórica (mg/L)	4-CF SBBR-CA (mg/L)	4-CF SBBR-BP (mg/L)	Carga volumétrica (kg DQO/m ³ ·d)	Carga másica (kg DQO/kg SSVLM·d)
630	30	8,4	17,8	0,10	0,05
840	40	10,6	22,1	0,13	0,07
1.050	50	13,1	28,1	0,17	0,10
1.260	60	24,3	36,9	0,21	0,14
1.470	70	41,8	43,2	0,24	0,17
1.680	80	47,8	46,7	0,28	0,31
1.890	90	54,4	54,4	0,31	0,38
2.100	100	58,4	56,4	0,35	0,51
2.310	110	73,3	63,0	0,38	0,68
3.150	150	130,2	134,1	0,52	1,12
3.570	170	146,1	156,5	0,59	1,41

5.2.5. Métodos Analíticos

Se realizaron los siguientes análisis:

5.2.5.1 Análisis físicos

Se determinó la concentración de sólidos en suspensión totales y volátiles y la V_{30} .

5.2.5.2 Análisis Químicos

Se determinó la concentración de COT y de compuestos aromáticos presentes en el medio de reacción.

5.2.5.3 Análisis biológicos

Se realizaron bioindicaciones con microscopio óptico y ensayos respirométricos.

En todos los casos se siguieron los procedimientos descritos en el apartado de Métodos Analíticos del Capítulo II.

5.2.6. Análisis Estadístico

Los resultados mostrados son los valores medios obtenidos en ensayos realizados por duplicado. En todos los casos el error estándar es menor del 10%.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Capacidad de adsorción de 4-CF

La capacidad de adsorción de 4-CF de los soportes frescos en las condiciones de operación de los biorreactores se recoge en la Fig. 5.2. Tanto la velocidad como la capacidad máxima de adsorción son mayores para el CA, alcanzando una capacidad casi 9 veces superior a la del BP (Fig. 5.2). Estas diferencias están relacionadas con el notable desarrollo de área BET del CA (838 m²/g) frente al del BP (20 m²/g), con valores del volumen mesoporoso de 0,125 y 0,013 cm³/g para el CA y BP, respectivamente. Las capacidades de adsorción obtenidas para diferentes concentraciones de 4-CF se ajustaron bien a las ecuaciones de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson, a excepción de la de Langmuir para el CA. En la Tabla 5.4 se recogen los valores de los parámetros de ajuste para cada una de las ecuaciones.

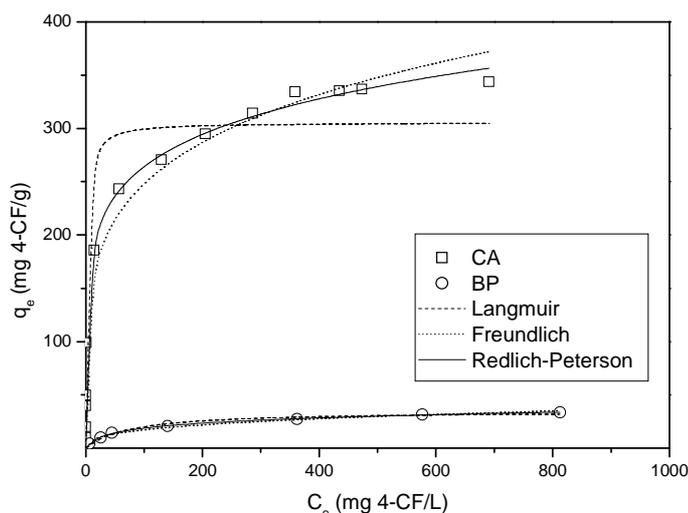


Fig. 5.2. Capacidad de adsorción de 4-CF sobre carbón activo y biosólido pirolizado a 35 °C y pH 7.

Tabla 5.4. Parámetros de ajuste de las ecuaciones de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson.

Langmuir		$q_e = (Q_L \cdot C_e \cdot K_L) / (1 + (K_L \cdot C_e))$			
	K_L (L/mmol)	Q_L (mmol/g)	χ^2	r^2	
CA	$62,497 \pm 19,315$	$2,376 \pm 0,085$	$7 \cdot 10^{-3}$	0,952	
BP	$1,761 \pm 0,291$	$0,271 \pm 0,011$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,986	
Freundlich		$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$			
	K_F (L/mmol) ⁻ⁿ	n	χ^2	r^2	
CA	$2,035 \pm 0,038$	$4,774 \pm 0,258$	$2 \cdot 10^{-4}$	0,987	
BP	$0,146 \pm 0,005$	$2,953 \pm 0,214$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,988	
Redlich-Peterson		$q_e = (A \cdot C_e) / (1 + (B \cdot C_e^\beta))$			
	A (L/mmol)	B (mmol/g)	β	χ^2	r^2
CA	$490,264 \pm 94,708$	$228,327 \pm 45,815$	$0,847 \pm 0,011$	$2 \cdot 10^{-6}$	0,996
BP	$1,008 \pm 0,164$	$5,344 \pm 1,101$	$0,797 \pm 0,024$	$1 \cdot 10^{-5}$	0,999

5.3.2. Estabilidad de los Reactores

Un aspecto interesante para analizar el funcionamiento de sistemas SBR es el número de ciclos necesarios para alcanzar la estabilidad del reactor en cada cambio de concentración de 4-CF al que se somete el sistema. Esto es especialmente importante cuando se emplean sólidos adsorbentes, ya que en cada cambio de concentración, además de necesitar la adaptación de la biomasa, hay que considerar la adsorción. En la Fig. 5.3 se muestra la evolución de la concentración de 4-CF tras el llenado a lo largo de

diferentes ciclos, para una concentración en el influente de 1.050 mg/L. En ambos reactores, y especialmente en el sistema SBBR-BP, se observa una evolución diferente de la concentración de 4-CF con el tiempo hasta alcanzar un nivel estable (estado pseudoestacionario), para un número de ciclos superior a 15, lo que representa algo más de una semana de operación. Alcanzado dicho estado, se procede a analizar cada una de las variables estudiadas. Para cada concentración de 4-CF ensayada, se considera que el estado pseudoestacionario se alcanza cuando se obtiene una desviación de la velocidad de consumo de 4-CF inferior al 10% durante al menos 6 ciclos.

Durante la puesta en marcha de un SBR convencional con biomasa en suspensión la máxima concentración de 4-CF asimilable para la adaptación de la biomasa floculenta fue de 5 mg/L, a partir de la cual se observaron procesos de desestabilización y acumulación del tóxico. Los resultados del presente estudio muestran que el empleo de soportes adsorbentes permite la puesta en marcha de los reactores con una concentración teórica tres veces superior a la asimilable por el SBR con biomasa floculenta (Tabla 5.3).

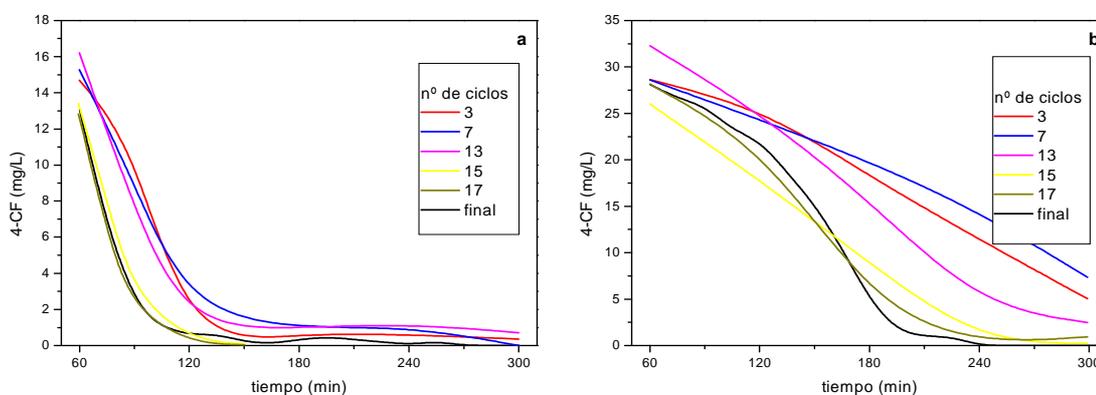


Fig. 5.3. Evolución de la concentración de 4-CF en diferentes ciclos hasta alcanzar el estado pseudoestacionario, tratando 1.050 mg/L en el SBBR-CA (a) y SBBR-BP (b).

En la Fig. 5.4 se resume el número de ciclos necesarios para alcanzar la estabilidad en los SBBR después de cada aumento de concentración de 4-CF. El número de ciclos necesarios durante la puesta en marcha del SBR convencional (120) se redujo drásticamente con la incorporación de CA y BP, hasta 15 y 21, respectivamente, por lo que, la utilización de soportes adsorbentes reduce extraordinariamente el periodo de aclimatación y puesta en marcha de reactores SBR. A lo largo de la experimentación ambos SBBR mostraron una gran estabilidad frente a variaciones en la concentración de

4-CF, requiriéndose un menor número de ciclos para alcanzar el estado pseudoestacionario con CA.

Hosseini y Borghei (2005) encontraron tiempos medios de estabilización de reactores de lecho móvil para el tratamiento de aguas fenólicas en torno al doble del tiempo de retención hidráulico. En la Fig. 5.4 se observa que son necesarios cada vez más ciclos para lograr la estabilidad de los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP al aumentar la concentración de 4-CF en el influente. El aumento de la ecotoxicidad de los mismos alargó el tiempo de aclimatación de la microbiota hasta valores de casi el triple del t_{HR} empleado. Para concentraciones de 4-CF superiores a 3.570 mg/L se produce la inhibición de los sistemas estudiados.

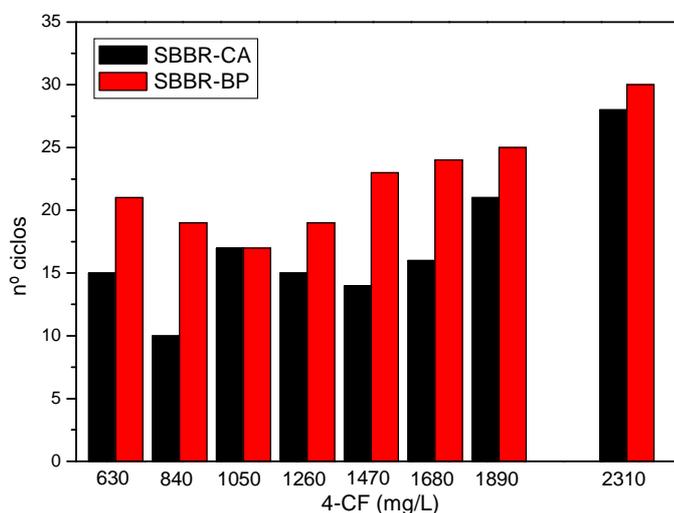


Fig. 5.4. Ciclos necesarios para alcanzar el estado pseudoestacionario para diferentes concentraciones de 4-CF en ambos reactores.

5.3.3. Degradación de 4-CF

5.3.3.1 Degradación anóxica y adsorción de 4-CF

La secuencia establecida en cada ciclo de reacción incorpora una etapa de llenado anóxico, por lo que, resulta interesante discriminar la cantidad de 4-CF eliminada por degradación anóxica y por adsorción.

El estudio sobre la degradabilidad anóxica del 4-CF mediante sistemas SBBR-CA y SBBR-BP se realizó estableciendo ciclos de tratamiento anóxicos con 1470 mg/L

de 4-CF. La evolución de la concentración de 4-CF en ambos reactores se comparó con la observada en un SBR convencional con biomasa en suspensión (Fig. 5.5). Debido a la alta capacidad adsorbente de los soportes frescos, una buena parte del 4-CF se retuvo durante la etapa de llenado, descendiendo su concentración por debajo del límite de detección durante la puesta en marcha de ambos sistemas. Los resultados obtenidos indican que la degradación anóxica de 4-CF con biomasa en suspensión no es posible, si bien, en ambos sistemas SBBR se observó cierta actividad degradativa en dichas condiciones. Los ensayos realizados con lodo biológico inhibido con cloranfenicol mostraron unos rendimientos de biodegradación anóxica de 4-CF durante el llenado en torno al 16% en ambos sistemas. Dichos rendimientos alcanzaron valores de 30 y 33%, tras 630 min, en el SBBR-BP y SBBR-CA, respectivamente, mientras que no se observó consumo de COT en ninguno de los dos (datos no mostrados). La activación de los procesos de degradación en condiciones anóxicas, en ambos sistemas, podría estar relacionada con el desarrollo de nichos anóxicos en el interior de los agregados.

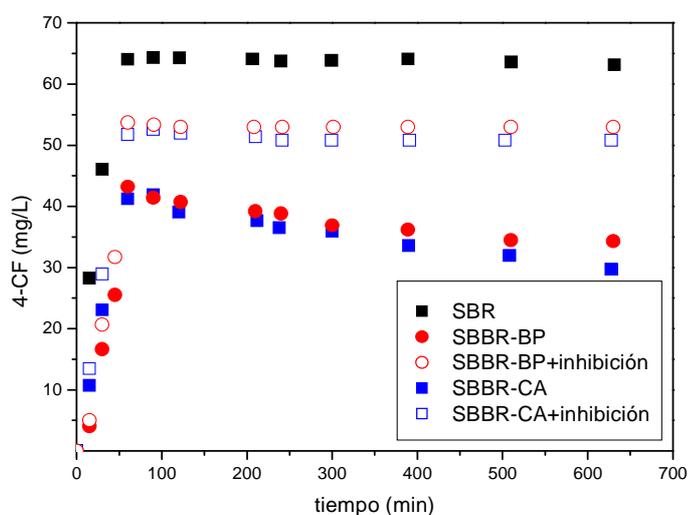


Fig. 5.5. Evolución de la concentración de 4-CF durante el tratamiento anóxico de 1470 mg/L de 4-CF en el influente, en un sistema SBR convencional con biomasa suspendida y en los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP con y sin inhibidor metabólico.

5.3.3.2 Degradación aerobia de 4-CF

A lo largo de un ciclo, la eliminación de 4-CF ocurrió principalmente en la fase de reacción aerobia. La concentración de 4-CF detectada tras la etapa de llenado anóxico aumentó a medida que la capacidad de adsorción de los soportes se redujo. No

obstante, a lo largo de la experimentación la concentración medida fue siempre inferior a la teórica calculada a partir de la concentración de 4-CF en el influente (Fig. 5.6). Debido a la mayor capacidad de adsorción del CA, la reducción de la concentración de 4-CF por adsorción fue siempre mayor en el sistema SBBR-CA.

Las curvas de evolución de la concentración de 4-CF indicaron la aparición de fenómenos inhibitorios a partir de concentraciones en el influente de 1.050 y 1.890 mg/L para el SBBR-BP y SBBR-CA, respectivamente. En el primero, la velocidad específica inicial de degradación de 4-CF disminuyó de 16 a 7,5 mg 4-CF/g SSV·h al aumentar la concentración de 4-CF en el influente de 1.890 a 3.570 mg/L. Sin embargo, en el SBBR-CA se observó un aumento de la misma de 10,3 a 19 mg 4-CF/g SSV·h para esos mismos valores de concentración. El SBBR-CA mostró una mayor capacidad para tratar altas concentraciones de 4-CF, mayores velocidades de degradación y manteniendo la estructura de la biopelícula sobre el soporte. A concentraciones de 4-CF superiores a 3.150 mg/L se observó una notable reducción de la eficacia de eliminación (Fig. 5.6b).

Los rendimientos de eliminación de 4-CF obtenidos mediante ambos sistemas SBBR fueron del 100% para concentraciones de 4-CF en el influente menores de 3.570 y 2.310 mg/L en los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP, respectivamente. La desestabilización provocada por el aumento de la concentración por encima de dichos valores redujo notablemente la eficacia del SBBR-BP, alcanzando rendimientos de eliminación del 34 y 17% para 3.150 y 3.570 mg/L de 4-CF. No obstante, las eficacias obtenidas fueron en ambos casos mayores que las observadas para otros sistemas de biopelícula operados en continuo (Carvalho *et al.*, 2001).

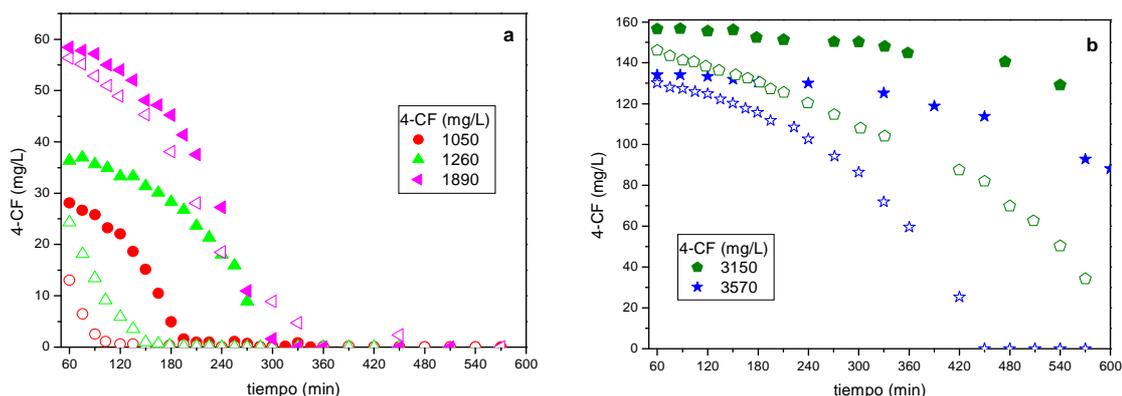


Fig. 5.6. Evolución de la concentración de 4-CF empleando SBBR-CA (símbolos abiertos) y SBBR-BP (símbolos cerrados) tras la etapa de llenado.

En la Fig. 5.7 se muestra la evolución del rendimiento de eliminación de COT para diferentes concentraciones de 4-CF mediante ambos sistemas SBBR, que incluye el COT eliminado por adsorción y por degradación durante la etapa aerobia. Se alcanzaron conversiones totales de 4-CF al tratar concentraciones de 4-CF en el influente inferiores a 3.150 mg/L empleando el SBBR-CA y 2.310 mg/L con el sistema SBBR-BP. El aumento de la concentración de 4-CF hasta 3.570 mg/L provocó una reducción del 20% de la conversión de COT en el SBBR-CA, llegando a ser drástica en el caso del SBBR-BP, en el que la desestabilización del sistema provocó una reducción de la eficacia de eliminación del 81%.

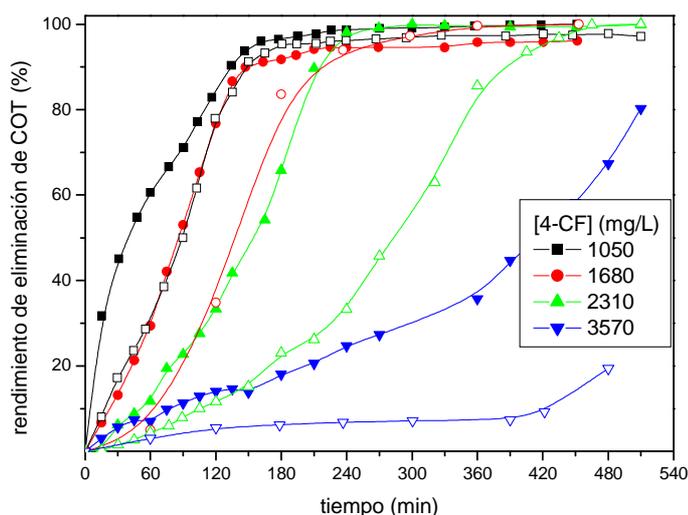


Fig. 5.7. Evolución del rendimiento de eliminación de COT para diferentes concentraciones de influente de 4-CF mediante SBBR-CA (símbolos cerrados) y SBBR-BP (símbolos abiertos).

A lo largo de la etapa aerobia, el análisis de la evolución de la VECO mostró dos picos en ambos sistemas SBBR, de los cuales el primero está relacionado con la degradación de 4-CF y el segundo con el de algún compuesto intermedio no identificado (Fig. 5.8). En ambos reactores los valores máximos de VECO fueron similares, alcanzando 35,5 y 31,7 mg O₂/g SSVLM-h para el SBBR-CA y SBBR-BP, respectivamente, lo cual indica que la biomasa estaba adecuadamente adaptada a la presencia de 4-CF.

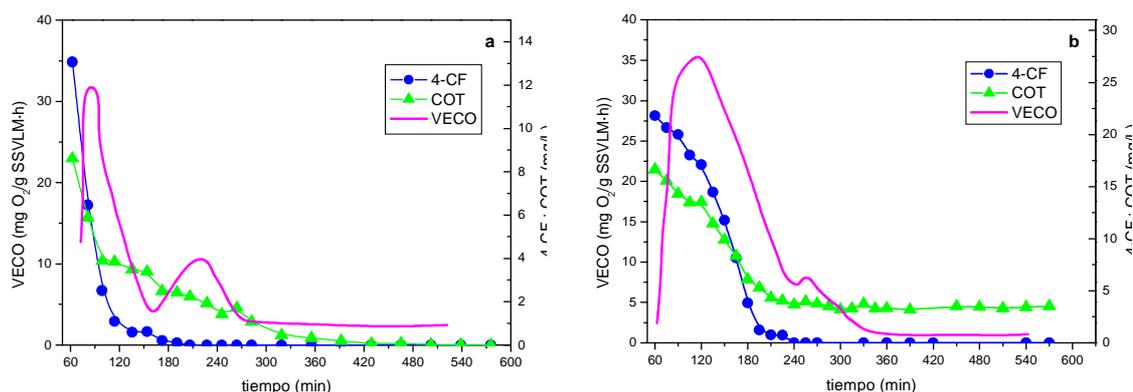


Fig. 5.8. Evolución de la VECO y las concentraciones de 4-CF y COT durante la etapa de reacción para una concentración de 4-CF en el influente de 1.050 mg/L en los sistemas SBBR-CA (a) y SBBR-BP (b).

Un aspecto interesante para comparar el funcionamiento de ambos reactores es el análisis de la velocidad inicial de consumo de COT. En la Fig. 5.9 se observa que las velocidades obtenidas al tratar concentraciones inferiores a 30 mg/L no mostraron diferencias significativas entre ambos reactores. Mientras que en el sistema SBBR-CA la tendencia fue lineal para todo el intervalo de concentraciones tratadas, en el SBBR-BP se observó un máximo para concentraciones de 4-CF entre 30 y 80 mg/L. Este hecho podría estar relacionado con la presencia en el SBBR-BP de agregados de menor tamaño (< 150 μ m) y compactación que los observados en el SBBR-CA (200 - 300 μ m), en el que el mayor espesor y compactación de la biopelícula haría más lenta la difusión del sustrato, lo que disminuye la fracción activa de biopelícula (Wilderer *et al.*, 2000) y reduce la velocidad de consumo de sustrato.

El aumento de la concentración de 4-CF por encima de 120 mg/L provocó un descenso de la velocidad de consumo en el SBBR-BP por debajo de 10 mg COT/g SSV-h. Dicha reducción podría deberse en parte a una peor difusión de los nutrientes a

través de la biopelícula por el taponamiento de los canales de la misma por exopolímeros celulares (Caldeira *et al.*, 1999). Sin embargo, la presencia de agregados de mayor tamaño y compactación provoca una mayor estabilidad del SBBR-CA, aumentando la velocidad hasta 19 mg COT/g SSV·h.

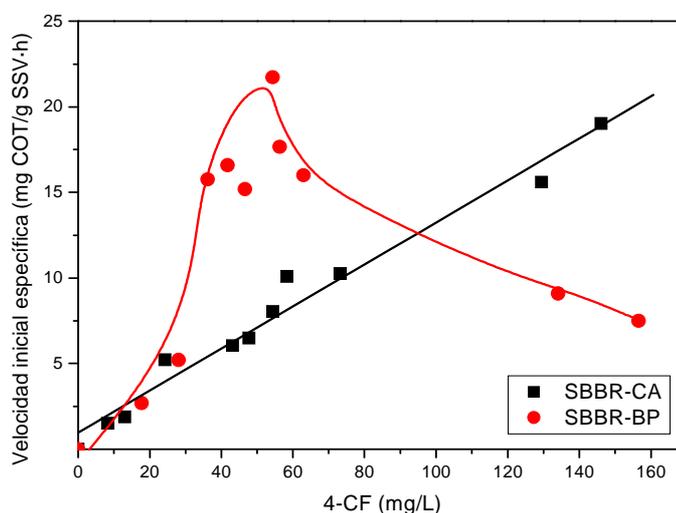


Fig. 5.9. Velocidad específica inicial de consumo de COT para diferentes concentraciones de 4-CF en el interior de los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP.

5.3.4. Regeneración de los Adsorbentes

La biorregeneración de los soportes se calculó teniendo en cuenta la cantidad de 4-CF adsorbida al finalizar el llenado y la capacidad de adsorción del adsorbente fresco. Para ello se obtuvieron las capacidades de adsorción de los materiales frescos, tras 1 h de contacto, para cada una de las concentraciones de 4-CF alcanzadas en ambos sistemas. En la Fig. 5.10 se muestra la cantidad de 4-CF adsorbida en cada uno de los SBBR para diferentes concentraciones de 4-CF. Ambos soportes mostraron un aumento de la cantidad retenida para mayores concentraciones de 4-CF; sin embargo, a partir de 70 mg/L dicha capacidad disminuyó, debido a las pérdidas de soporte y a una posible menor regeneración de los mismos.

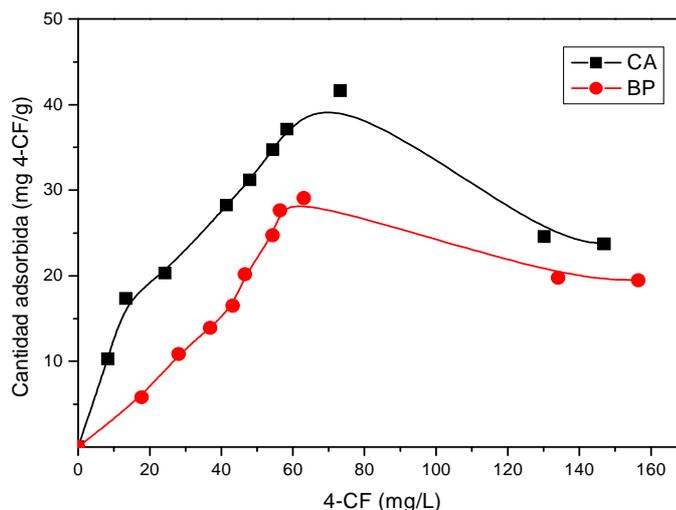


Fig. 5.10. Capacidad de adsorción de 4-CF de los soportes para diferentes concentraciones.

El estudio de la capacidad de adsorción de ambos soportes a lo largo de la experimentación mostró una reducción del 90% en el caso del CA y del 39% en el BP (Fig. 5.11). Por lo tanto, la regeneración, por la acción directa o indirecta de la actividad microbiana, del BP fue más efectiva que la del CA. Este hecho podría deberse a la mayor accesibilidad del 4-CF retenido sobre las paredes de los macroporos presentes en el BP, o a una menor reversibilidad de la adsorción en el caso del CA, lo que dificulta su regeneración. La capacidad de adsorción se redujo al aumentar la concentración de 4-CF tratada, hecho que podría deberse a la reducción de la actividad microbiológica provocada por la elevada carga de tóxico aplicada (Ivancev-Tumbas *et al.*, 1998).

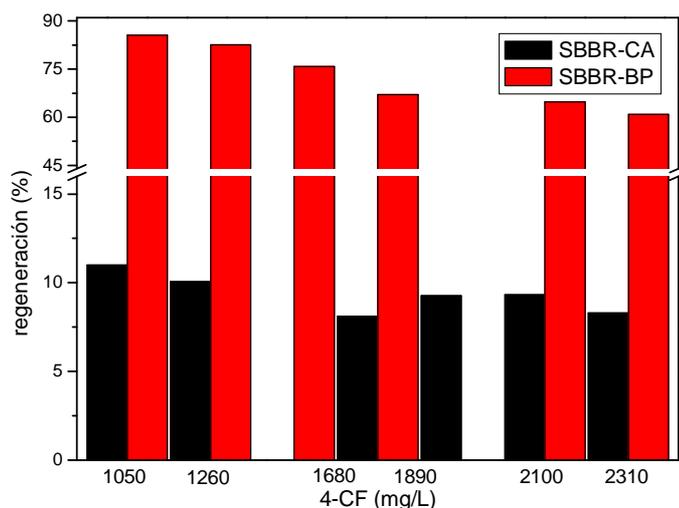


Fig. 5.11. Regeneración de la capacidad adsorbente de los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP respecto a la capacidad del material fresco.

5.3.5. Sedimentabilidad

Uno de los principales problemas que aparecen en el tratamiento de aguas residuales que contienen 4-CF es la disminución de la sedimentabilidad del fango al aumentar la concentración del mismo en el influente. Empleando lodo flocculento, el IVF aumentó desde 87 a 227 mL/g al aumentar la concentración de 4-CF tratada de 105 a 1.470 mg/L. Sin embargo, el empleo de sistemas con biomasa soportada mejoró notablemente la sedimentabilidad del lodo, alcanzando valores de IVF inferiores a 140 y 210 mL/g, para los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP, respectivamente (Fig. 5.12). La rápida colonización de los soportes empleados permitió reducir los valores de IVF a pesar del aumento de la concentración de 4-CF tratada, alcanzando valores que se estabilizaron en torno a 30 y 120 mL/g, para el SBBR-CA y SBBR-BP, respectivamente. La adecuada sedimentabilidad de ambos sistemas se debió principalmente a la formación de agregados compactos y de gran tamaño.

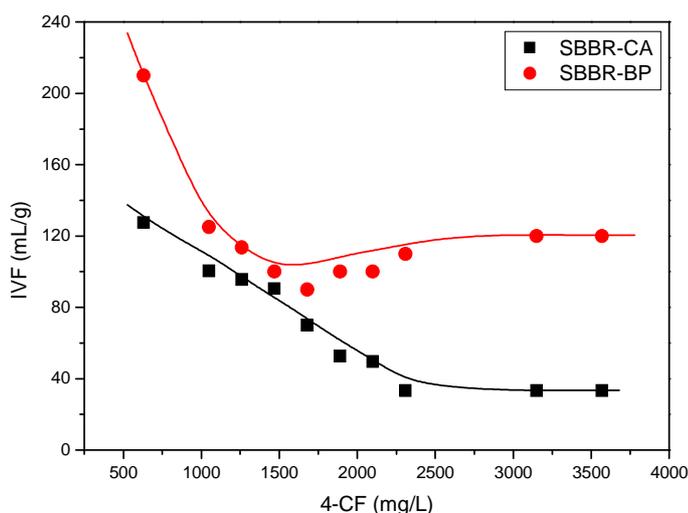


Fig. 5.12. Evolución del IVF en los sistemas SBBR-CA y SBBR-BP para diferentes concentraciones de 4-CF en el influente.

5.3.6. Análisis de la Evolución de la Biopelícula y la Microbiota

La baja concentración de 4-CF en la fase de puesta en marcha, unida a la adsorción del mismo sobre los soportes, determina una baja disponibilidad de sustrato en el medio, lo que promueve el desarrollo de la biopelícula sobre el soporte a una mayor velocidad. Debido a que la capacidad de adsorción del CA es muy superior a la del BP, la formación de la biopelícula resultó sensiblemente más rápida en el SBBR-CA. Al cabo de un mes de operación, aproximadamente el 50 y 25% de las partículas de CA y BP, respectivamente, estaban colonizadas, llegando a un 100% después de dos meses de operación, en ambos casos.

Debido al pequeño tamaño de las partículas de soporte, el desarrollo de los agregados se inició por la adhesión de dichas partículas a los flóculos, tras lo cual fueron colonizadas por los microorganismos pasando a formar parte de la estructura del agregado. El empleo de soportes de mayor tamaño hace que la biomasa se adhiera a la partícula y crezca alrededor de ella (Carvalho *et al.*, 2001; Mace y Mata-Álvarez, 2002; Wilderer y McSwain, 2004).

Durante la puesta en marcha de los SBBR la densidad de ciliados nadadores fue muy elevada. Sin embargo, el aumento de la concentración de 4-CF provocó el descenso de dicha población, llegando a desaparecer para concentraciones de 4-CF en el

influyente superiores a 1.570 mg/L. En ambos reactores, la densidad tanto de metazoos como de bacterias filamentosas, resultó muy baja a lo largo de toda la experimentación.

En la Fig. 5.13 se muestra el aspecto general de la estructura de la biomasa después de cinco meses de operación. Se observa que el tamaño de los agregados en el SBBR-CA es ligeramente superior que en el SBBR-BP. La morfología de la biopelícula es similar y en ambos casos se observa una gran cantidad de “puentes” entre agregados.

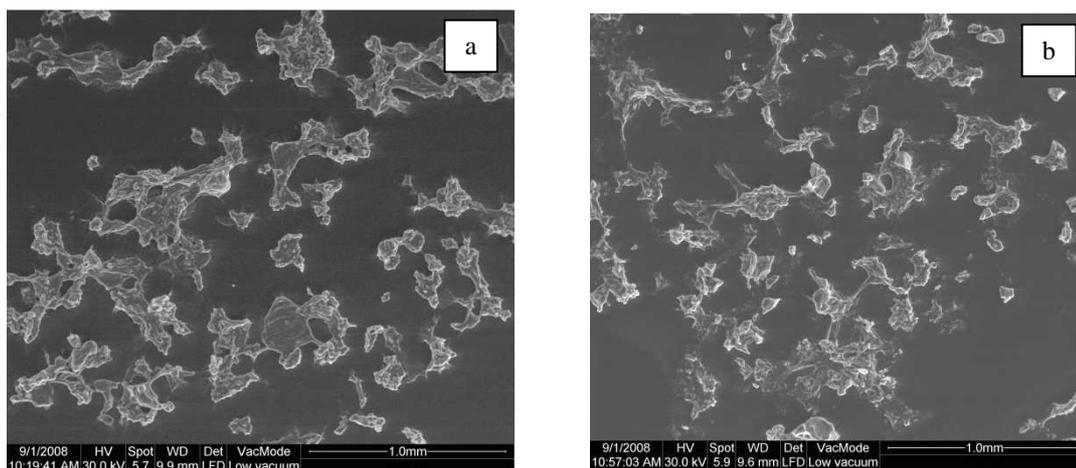


Fig. 5.13. Micrografías SEM mostrando el aspecto general del lodo en el SBBR-CA (a) y SBBR-BP (b) después de cinco meses de operación.

Durante la última etapa de experimentación la densidad de gránulos descendió notablemente en ambos reactores, debido al choque tóxico que provocó el tratamiento de concentraciones de 4-CF en el influente de 3.570 mg/L de 4-CF, presentando gránulos compactos, firmes, de bordes suaves, sin forma definida aunque casi esférica en el caso de SBBR-BP (Fig. 5.14). Dicha estructura podría estar relacionada con cambios en el metabolismo (Liu y Tay, 2001), los cuales permiten obtener elevados rendimientos de eliminación del 4-CF. Los tamaños fueron inferiores a 150 μm en el caso del SBBR-BP, situándose entre 300 y 500 μm en el SBBR-CA. Al aumentar la concentración de 4-CF en el influente de 2.310 a 3.150 mg/L se redujo notablemente la densidad de agregados en el SBBR-BP. El choque tóxico provocó el desprendimiento de la biopelícula, aumentando al 50% la cantidad de partículas de BP libres. En el caso del SBBR-CA no se observaron cambios notables en los agregados.

La utilización de BP produce biopelículas de menor espesor, lo cual permite una menor difusión de sustrato, nutrientes y oxígeno disuelto al interior de las mismas, alcanzando altas velocidades específicas de degradación de 4-CF. El empleo de CA

como soporte favorece la formación de agregados más compactos y de mayor tamaño que los obtenidos sobre el BP, lo que confirió al sistema una mayor resistencia al choque tóxico, posibilitando el tratamiento de altas concentraciones de 4-CF con elevadas eficacias de eliminación del mismo.

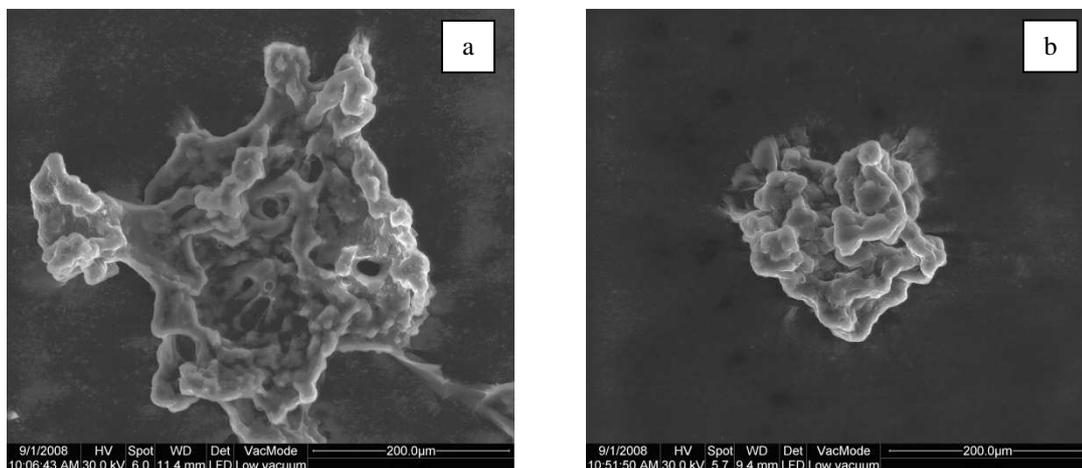


Fig. 5.14. Micrografías SEM mostrando agregados formados en el SBBR-CA (a) y en el SBBR-BP (b) después de cinco meses de operación.

VI. DEGRADACIÓN DE 4-CF MEDIANTE
DOS ESPECIES DE *PSEUDOMONAS*.
BIOAUMENTACIÓN EN SBR

“Se puede llevar un caballo al agua, pero no obligarlo a beber”, John Maynard Keynes.

6.1. Introducción

Entre los diferentes géneros bacterianos capaces de degradar clorofenoles, y especialmente monoclorofenoles, destacan los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Acinetobacter* por su capacidad para tratar elevadas concentraciones de dichos compuestos (Gaofeng *et al.*, 2004; Field y Sierra-Álvarez, 2007). El género *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiado como un paradigma de la biotecnología ambiental debido a su versatilidad para catabolizar diversos compuestos aromáticos entre los que se incluye el 4-CF (Loh y Cao, 2008). Incluso algunas especies de *Pseudomonas* pueden utilizar compuestos aromáticos clorados como única fuente de carbono y energía (Reineke y Knackmuss, 1984; Schraa *et al.*, 1986; Spain y Nishino, 1987; Oltmanns *et al.*, 1988).

La gran diversidad metabólica de las *Pseudomonas* les permite hacerlo mediante dos rutas metabólicas diferentes (*orto* y *meta*). Las eficacias de eliminación de compuestos aromáticos a través de la ruta *meta* son mayores que las obtenidas mediante la ruta *orto*, sin embargo, el empleo de la ruta *meta* hace que los microorganismos tengan una menor adaptabilidad a cambios de pH y una menor capacidad de crecimiento (Liu *et al.*, 2004).

En los últimos años los esfuerzos en este campo se han centrado en aumentar la capacidad degradativa de este género, entre los que destacan la inmovilización en soportes inertes, la aclimatación a los sustratos empleados y el cometabolismo. A través de la inmovilización los microorganismos se fijan o encapsulan, empleando materiales tanto orgánicos como inorgánicos entre los que se incluyen el carbón activo (Ehrhardt y Rehm, 1989), tierra de diatomeas (Hallas *et al.*, 1992), alginato (Lin y Wang, 1991; Orive *et al.*, 2001; González *et al.*, 2001) y membranas de polisulfona (Li y Loh, 2006). Otro método para aumentar la biodegradabilidad de compuestos tóxicos es la adaptación de los microorganismos a la presencia de dichos compuestos (Zilli *et al.*, 1993).

El cometabolismo se considera un método atractivo para mejorar la biodegradación de sustratos xenobióticos. Algunos de los compuestos clorados difícilmente biodegradables pueden ser tratados cometabólicamente. En este sentido, es necesario conocer las interacciones entre los sustratos primarios y xenobióticos, las

cuales dependerán de las enzimas involucradas y sus funciones. En algunos casos, el empleo de cosustratos aumenta la extensión de la degradación del compuesto xenobiótico (Alexander, 1994). La velocidad de eliminación del compuesto difícilmente biodegradable puede aumentarse mediante la adición conjunta de un sustrato biogénico convencional y un cosustrato (Loh y Wang, 1998). El estudio de este tipo de sistemas complejos es interesante, ya que, generalmente, los efluentes industriales contienen mezclas de compuestos xenobióticos y de sustratos biogénicos. Las interacciones entre múltiples sustratos son complejas, debido principalmente a su toxicidad y a la competencia por enzimas y cofactores (Hu *et al.*, 2005b). La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento analizan la degradación de un compuesto difícilmente biodegradable en presencia de otro que soporte el crecimiento microbiano. Sin embargo, el empleo de medios complejos de tres o más sustratos no ha sido suficientemente estudiado (Loh y Wang, 1998; Wang y Loh, 2001).

Los azúcares y el fenol son los cosustratos más utilizados en la degradación de 4-CF por bacterias del género *Pseudomonas*. El empleo de fuentes de carbono convencionales como glucosa, aspartato, succinato, acetato, glutamato sódico, fructosa o extracto de levadura mejora la degradación de los compuestos clorofenólicos (Topp *et al.*, 1988; Yu y Ward, 1994; Fava *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Loh y Wang, 1998; Wang y Loh, 1999a; Fakhrudin y Quilty, 2005). Por otro lado, debido a la estructura similar del fenol y los clorofenoles, los rendimientos de eliminación obtenidos empleando fenol como soporte de crecimiento celular son superiores que los obtenidos con compuestos biogénicos (Basu y Oleszkiewicz, 1995). El tratamiento conjunto de fenol y 4-CF es de especial interés, ya que ambos compuestos aparecen conjuntamente en los efluentes resultantes de la hidrodechloración de clorofenoles (Ko *et al.*, 2007). Además, debido a la baja biodegradabilidad de 4-CF en condiciones anaerobias, el tratamiento anaerobio de policlorofenoles conduce a la generación de compuestos fenólicos con menor número de átomos de cloro, generando finalmente efluentes que contienen principalmente 4-CF y fenol (Puyol *et al.*, 2009a, 2009b).

En general, el tratamiento de 4-CF mediante el empleo de cepas puras no es posible y la adición de fenol durante la propagación de las mismas no siempre conduce a un aumento significativo de su biodegradabilidad (Sáez y Rittmann, 1991, 1993; Hill *et al.*, 1996; Kim y Hao, 1999; Wang y Loh, 2001; Hao *et al.*, 2002). La mineralización de 4-CF mediante cepas puras es compleja, observando en muchos casos la

acumulación de compuestos intermedios (Buitrón y González, 1996), lo cual puede provocar la inhibición del crecimiento bacteriano. Entre los metabolitos identificados en la degradación de clorofenoles caben mencionar los clorocatecoles (Reineke y Knackmuss, 1984; Oltmanns *et al.*, 1988; Haigler *et al.*, 1988) y el 5-cloro, 2-hidroxi ácido mucónico semialdehído (Admassu y Korus, 1996).

Los cultivos bacterianos mixtos adaptados muestran una elevada capacidad para emplear clorofenoles como única fuente de carbono y energía (Quan *et al.*, 2004, 2005; Moreno y Buitrón, 2004; Buitrón *et al.*, 2005). La principal ventaja del empleo de cultivos mixtos es la aparición de interacciones entre las especies presentes. Por ello, la bioaumentación de fangos activos supone una de las aplicaciones más prometedoras de cepas degradadoras de xenobióticos, utilizándolas junto con poblaciones biológicas indígenas presentes en el licor mezcla para el tratamiento de aguas residuales (Alexander, 1994). No obstante, el empleo de la bioaumentación en la degradación de xenobióticos no ha sido ampliamente estudiado. Gran parte de estos estudios emplean microorganismos genéticamente modificados (McClure *et al.*, 1991; Nüblein *et al.*, 1992; Erb *et al.*, 1997; Soda *et al.*, 1998) mediante los cuales se obtienen elevados rendimientos de degradación de dichos compuestos, sin embargo, los efectos derivados del empleo de dichos microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales no han sido suficientemente estudiados.

Mediante la bioaumentación se obtiene una mayor diversidad biológica y actividad metabólica del fango activo (Tsuda *et al.*, 1999; Topp y Springael, 2003), por lo que se reduce el periodo de puesta en marcha del bioreactor (Wilderer *et al.*, 1991), aumenta la eficacia (Stepheson y Stepheon, 1992; Jianlong *et al.*, 2002), protege a la población microbiana (Hajji *et al.*, 2000; Quan *et al.*, 2003; Bathe, 2004; Venkata Mohan *et al.*, 2005, 2006), acelera la activación de la degradación (Bathe *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2008; Venkata Mohan *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008), mitiga los efectos de una sobrecarga hidráulica u orgánica, e incluso puede introducir nuevas propiedades catabólicas a la población microbiana (McClure *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1996). Debido a que la bioaumentación de fangos activos es menos predecible y controlable que la destrucción física o química de xenobióticos su empleo aún no se ha extendido.

La bioaumentación con organismos especialistas introduce al sistema plásmidos que contienen genes catabólicos, aumentando la capacidad de degradación de

compuestos xenobióticos tales como fenoles (Hajji *et al.*, 2000), cloroanilina (Boon *et al.*, 2000), ácido clorobenzoico (Bouchez *et al.*, 2000a), resinas ácidas (Yu y Mohn, 2001) y clorofenoles (Farrell y Quilty, 2002a; Quan *et al.*, 2003, 2004, 2005). El aumento del potencial de degradación de la población microbiana indígena se produce, en la mayoría de los casos, vía transferencia genética horizontal, por la cual pueden adquirirse nuevos rasgos catabólicos que pueden heredar las futuras generaciones (Amabile-Cuevas y Chicurel, 1996), logrando una mayor capacidad de adaptación de los microorganismos ante cambios ambientales. En los sistemas de tratamiento de aguas, la elevada densidad celular y velocidad de crecimiento permite una rápida división de los transconjugantes, obteniéndose una eficiente transferencia de la información genética adquirida.

Aunque la bibliografía recoge numerosos estudios sobre la bioaumentación de suelos para la degradación de xenobióticos presentes en ellos, existen pocos trabajos de la aplicación con éxito de bioaumentación con microorganismos aislados puros o modificados genéticamente en fangos activos. La capacidad de metabolizar un compuesto es una condición necesaria pero no suficiente para conseguir mejoras notables de la actividad metabólica del cultivo mixto (McClure *et al.*, 1989, 1991). La dificultad del método reside en que la simple adición al fango activo de cepas que posean capacidades metabólicas, no garantiza la mejora de la eficacia de degradación, ya que pueden darse procesos de competencia entre la cepa introducida y la población indígena que provoquen la inhibición de alguna población (Bouchez *et al.*, 2000a, 2000b). Además, la posible inestabilidad del plásmido catabólico, así como la variabilidad en la supervivencia de la especie introducida pueden reducir la capacidad degradativa del lodo bioaumentado (Lewis *et al.*, 1986; McClure *et al.*, 1991). Por otro lado, la capacidad de agregación de la cepa puede influir en la retención de la misma en el interior del reactor y, por tanto, en la eficacia del proceso de bioaumentación (McLaughlin *et al.*, 2006).

Los estudios sobre bioaumentación para el tratamiento de aguas residuales se han llevado a cabo empleando diferentes bioreactores. Frente a los sistemas de fangos activos convencionales y otros sistemas en continuo, los SBR se han desarrollado con la asunción científica de que la adaptación periódica de los microorganismos a unas condiciones definidas se lleva a cabo de manera eficiente en sistemas alimentados discontinuamente, en los que el tiempo y la frecuencia de exposición pueden

establecerse independientemente a las condiciones hidráulicas (Wilderer *et al.*, 2001). Mediante la tecnología SBR puede modificarse la distribución y el estado fisiológico de los microorganismos mediante su selección. En este sentido, trabajos recientes han mostrado el aumento de la capacidad degradativa de xenobióticos en SBR mediante bioaumentación de fangos activos (Bathe, 2004; Bathe *et al.*, 2005; Mohan *et al.*, 2009).

En el presente capítulo se analiza la capacidad degradativa de 4-CF de dos especies de *Pseudomonas* (*Comamonas testosteroni* y *Pseudomonas putida*). Se estudia el efecto de la aclimatación y el empleo de cosustratos en medios binarios y ternarios como métodos para mejorar la eficacia de degradación. Además, se analiza la viabilidad del empleo de *P. putida* en la bioaumentación de reactores SBR con lodos activos para el tratamiento de 4-CF.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Cepas Biológicas

Los microorganismos utilizados fueron *Comamonas testosteroni* CECT 326T y *Pseudomonas putida* CECT 4064 obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) suministrados por la Universidad de Valencia. Los microorganismos se mantuvieron congelados en microtubos a -40 °C en medio un medio con nutrientes y glicerol (15%, v/v).

6.2.2. Medios de Cultivo

Ambas cepas se transfirieron a un medio de propagación compuesto por extracto de carne (1 g/L), extracto de levadura (2 g/L), peptona (5 g/L) y NaCl (5 g/L) en agua desionizada. La suspensión celular resultante se tomó durante la etapa de crecimiento exponencial y se resembró en un medio de sales (Tabla 6.1) con 25 mg/L de fenol como única fuente de carbono. El crecimiento se llevó a cabo a 30 °C y 120 rpm durante 10 - 12 h en un baño orbital termostatzado (SW2L, Julabo). El cultivo resultante se extrajo durante la fase de crecimiento exponencial y se inoculó (2%, v/v) en frascos de 150 mL en un medio de sales con fenol, 4-CF, mezclas de fenol/4-CF, glucosa/4-CF o fenol/glucosa/4-CF. Los cultivos en discontinuo se realizaron en medios saturados en oxígeno, a 30 °C, 120 rpm y un pH aproximado de 7,0.

En aquellos experimentos en los que se analiza la influencia de la aclimatación sobre la capacidad de degradación de las cepas los cultivos no se sometieron al crecimiento previo en fenol.

Tabla 6.1. Composición de los medios mínimos de degradación (Farrel y Quilty, 1999, 2002).

Compuesto	Concentración (g/L)
K ₂ HPO ₄	3,45
NaH ₂ PO ₄	4,36
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,26
MgSO ₄ ·6H ₂ O	0,912
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0477
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0037
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0037
MnCl ₂	0,001
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0002

Los SBR utilizados durante el estudio del tratamiento de 4-CF empleado lodo bioaumentado con *P. putida* se inocularon con biomasas diferentes. Además, a lo largo de la experimentación se trataron diferentes concentraciones de fenol y 4-CF (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Concentraciones tratadas de fenol y 4-CF en los SBR.

Reactor	Biomasa	[fenol] (mg/L)	[4-CF] (mg/L)
SBR-licor mezcla	Licor mezcla	525 – 3.150	525 – 1.575
SBR- <i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	3150	525- 1.575
SBR-lodo bioaumentado	Lodo bioaumentado	525 – 3.150	525 – 3.150

6.2.3. Biorreactor

El reactor empleado es un fermentador de 2 L (Braun Biotech Internacional, GmbH) equipado con sondas de pH, temperatura y oxígeno disuelto (Fig. 6.2). Estas variables son controladas y actualizadas desde una unidad digital de medida y control (DCU). En la Fig. 6.2 se muestra una fotografía del fermentador y la DCU.

El fermentador está construido en vidrio de borosilicato y acero inoxidable. Se encuentra cerrado por la parte superior por una tapa de acero inoxidable, la cual dispone

de entradas para las sondas de medida, toma de muestra y adición de las disoluciones correctoras de pH. La agitación del sistema se realiza mediante un motor eléctrico que permite variar la velocidad de agitación en el intervalo de 50 a 1200 rpm. El sistema de agitación consiste en un agitador de tipo turbina con 2 paletas tipo Rushton.

La termostatación del biorreactor se realiza mediante circulación de agua a través de un encamisado constituido por una doble pared de vidrio con circulación de agua. La temperatura se mide con una sonda Pt-100 que permite la lectura en tiempo real.

El pH del medio de cultivo se mide electroquímicamente por medio de un electrodo de vidrio combinado esterilizable (Mettler Toledo). El control de pH se realiza mediante la adición de base (NaOH) o ácido (H_3PO_4) con bombas peristálticas.

La medida de la concentración de oxígeno disuelto se realiza utilizando un detector galvanométrico (Mettler Toledo), con compensación automática de temperatura.

El biorreactor se operó como un sistema SBR operando con ciclos de 12 h, con una hora de llenado anóxico, 9,5 h en aerobiosis, 1 h de sedimentación y 0,5 h de vaciado, manteniendo un t_{HR} de 10,5 d. Los ensayos se realizaron a 30 °C, 120 rpm y pH en torno a 7,0. El influente se esterilizó y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, se le añadió la concentración de tóxicos requerida en cada experimento.



Fig. 3.2. Fermentador Braun Biotech Internacional y DCU.

6.2.4. Equipos Auxiliares

La esterilización del biorreactor y los medios de cultivo se realizó en un autoclave (P SELECTA, Presoclave 75) a 120 °C durante 15 min.

La manipulación de las siembras de cepas y los medios de cultivo se llevó a cabo en condiciones estériles en cabina de flujo laminar (TELSTAR, PV-100). La cabina cuenta con un flujo de aire vertical ultrafiltrado con un caudal de 1.125 m³/h que permite aislarla del exterior y trabajar en condiciones de esterilidad.

La separación de la biomasa del caldo de cultivo se realizó mediante centrifugación empleando una centrífuga (Orto Alresa, mod. Digicen) que disponía de dos rotores, uno con capacidad para 24 tubos de 1,5 ml y una velocidad máxima de 7500 rpm y, otro con capacidad para 6 tubos de 50 ml con una velocidad máxima de 4000 rpm.

6.2.5. Análisis Químicos

La concentración de biomasa se midió mediante densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro VARIAN, Cary 50 Cond.

Los compuestos aromáticos se analizaron mediante HPLC/UV (Prostar, Varian) empleando una columna C₁₈ (Microsorb MW-100-5) y una mezcla de acetonitrilo y agua (40:60, vol.) como fase móvil. Se utilizó un caudal de 1,0 ml/min y una longitud de onda de 280 nm. El COT se midió mediante un analizador OI Analytical Model 1010 TOC apparatus.

6.2.6. Ensayos Abióticos

Se cuantificó la contribución de las pérdidas de tóxicos por volatilización, fotodegradación y adsorción sobre la biomasa. La adsorción de fenol y 4-CF se determinó mediante la extracción con Soxhelt empleando el método 8041 US-EPA. Los análisis de volatilización y fotodegradación se realizaron en ausencia de biomasa y en las mismas condiciones de operación empleadas durante los ensayos de biodegradación. Para los ensayos de fotodegradación los sistemas de reacción se cubrieron con material aislante de la luz para evitar los procesos fotosintéticos.

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. Degradación de Fenol y 4-CF mediante *Comamonas testosteroni*

6.3.1.1 Efecto de la temperatura en la degradación de fenol

En primer lugar se analizó la influencia de la temperatura sobre la eficacia de tratamiento de fenol mediante *C. testosteroni*. En la Fig. 6.3 se muestra la evolución de la concentración de fenol durante el tratamiento de diferentes concentraciones (80, 150 y 240 mg/L) a 15 y 30 °C. La eliminación de fenol fue total para todas las concentraciones ensayadas a ambas temperaturas. Los tiempos de latencia fueron sensiblemente superiores a 15 °C, llegando a alargarse hasta aproximadamente 80 h para la mayor de las concentraciones ensayadas a esta temperatura. No obstante, dichos tiempos fueron considerablemente menores a las 2 - 3 semanas mostradas por Arai *et al.* (1998) para *C. testosteroni* TA441. La velocidad de degradación de fenol a 30 °C (20 – 36 mg/L-h) es aproximadamente diez veces mayor que la obtenida a 15 °C (2 - 3,3 mg/L-h). Además, el tiempo de la etapa de latencia se redujo a 30 °C, por lo que el resto de experimentación se realizó a dicha temperatura.

El aumento de la concentración inicial de fenol no influyó sobre la duración de la etapa de latencia en los experimentos realizados a 30 °C. No obstante se ha comprobado que la presencia de concentraciones de fenol elevadas afecta a la integridad de la membrana citoplasmática (Sarfaraz *et al.*, 2004).

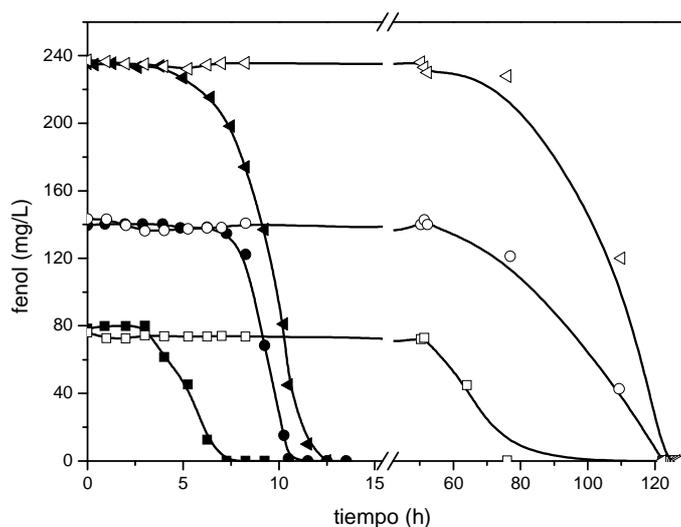


Fig. 6.3. Evolución de la concentración de fenol a 15 (símbolos abiertos) y 30 °C (símbolos cerrados).

6.3.1.2 Degradación de 4-CF

La capacidad de *C. testosteroni* para degradar 4-CF como única fuente de carbono y energía se evaluó empleando concentraciones iniciales de este de 15 y 30 mg/L (Fig. 6.4). La velocidad inicial de degradación de 4-CF tras la etapa de latencia resultó aproximadamente de 11,1 mg 4-CF/g SSV·h para ambas concentraciones, lo que indica la reducida biodegradabilidad de dicho compuesto. El aumento de la concentración inicial de 15 a 30 mg/L redujo la conversión obtenida al cabo de 75 h de experimentación desde el 36,9 al 15,3%. El crecimiento celular durante la degradación del compuesto fue muy baja, obteniendo un rendimiento biomasa - sustrato (Y_{xs}) de $0,025 \pm 0,015$ g SSV/g DQO. Este hecho se debe a que durante el tratamiento de monoclórofenoles como único sustrato, el NADH^+ y NADPH^+ necesarios para su transformación se producen a través de la respiración endógena mediante la oxidación de la biomasa (Sáez y Rittmann, 1991).

Durante la experimentación se observó la aparición de un color amarillo, indicando la presencia de 5-cloro,2-hidroxi ácido mucónico semialdehído, el cual se considera el intermedio más común de la degradación de 4-CF mediante la ruta *meta* (Wieser *et al.*, 1994; Hollender *et al.*, 1997). La ruta degradativa del 4-CF mediante *C. testosteroni* más común es la *meta* (Hollender *et al.*, 1994, 1997; Bae *et al.*, 1997a). A pesar de que la mineralización del 4-CF mediante dicha ruta no es habitual, algunos trabajos han logrado su degradación completa (Feist y Hegeman, 1969; Bae *et al.*, 1996; Hollender *et al.*, 1997; Mars *et al.*, 1997; Farrel y Quilty, 1999).

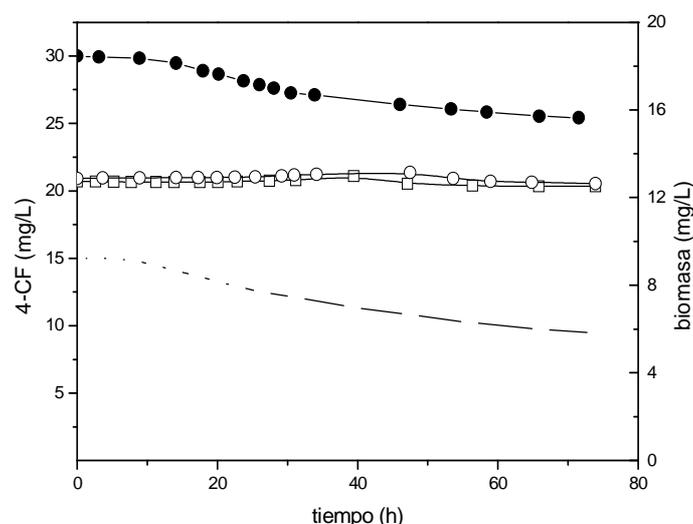


Fig. 6.4. Evolución de las concentraciones de 4-CF (símbolos cerrados) y biomasa (símbolos abiertos) durante el crecimiento de *C. testosteroni*.

6.3.1.3 Influencia de la aclimatación en la degradación cometabólica de 4-CF con fenol

La aclimatación de *C. testosteroni* se realizó mediante ensayos sucesivos en los que se emplearon mezclas compuestas por 150 mg/L de fenol y dos concentraciones de 4-CF (20 y 40 mg/L). En la Fig. 6.5 se muestra la evolución de la concentración de ambos compuestos para los distintos ciclos realizados. Durante el primero de los ciclos, sin aclimatación previa, se logró eliminar el fenol tras 50 h y no se observó degradación de 4-CF, por lo que el contacto directo con el 4-CF sin aclimatación previa resulta ineficaz para el tratamiento de dicho compuesto. La baja velocidad de consumo observada en dicho experimento puede deberse a la pérdida de viabilidad de *C. testosteroni* provocada por el efecto tóxico del 4-CF. El empleo de ciclos sucesivos disminuyó el tiempo para la degradación de ambos compuestos, lo que permitió obtener elevadas velocidades de degradación. Los perfiles de concentración a lo largo de los ciclos de aclimatación resultaron similares para las dos concentraciones de 4-CF empleadas, por lo que se puede afirmar que la exposición repetida de *C. testosteroni* a ambos compuestos induce la modificación metabólica necesaria para llevar a cabo su degradación de una forma más eficiente.

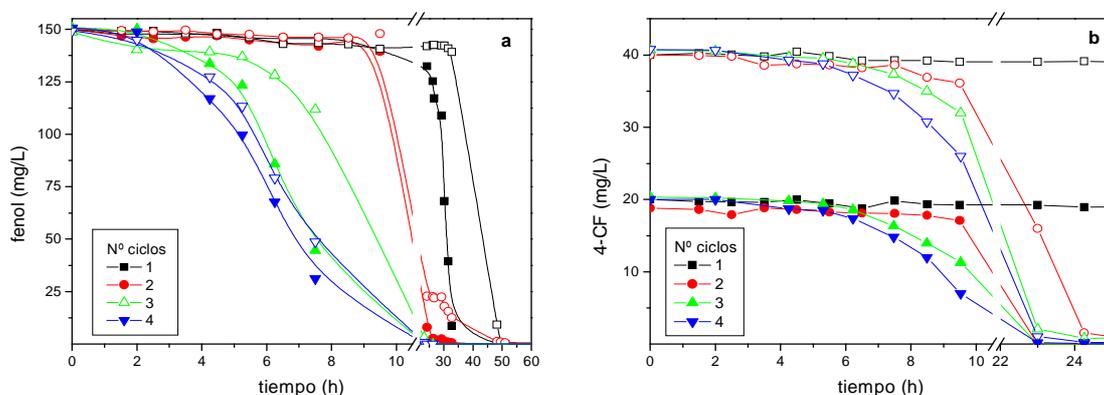


Fig. 6.5. Evolución de las concentraciones de fenol (a) y 4-CF (b) durante el crecimiento de *C. testosteroni*. $[\text{fenol}]_0 = 150 \text{ mg/L}$; $[\text{4-CF}]_0 = 20$ (símbolos cerrados) y 40 mg/L (símbolos abiertos).

6.3.1.4 Degradación cometabólica de 4-CF con fenol

La influencia de la aclimatación a fenol (25 mg/L) sobre la degradación cometabólica de 4-CF en presencia de dicho cosustrato se analizó tratando diferentes concentraciones de fenol (40 y 200 mg/L) y 20 mg/L de 4-CF. En la Fig. 6.6 se muestra

la evolución de la concentración de fenol, 4-CF y biomasa durante la degradación cometabólica de ambos compuestos. Los resultados del experimento abiótico muestran que el efecto de la volatilización o adsorción es despreciable. En todos los casos se observó una reducción de la etapa de latencia respecto a la observada durante el tratamiento individual de ambos compuestos. El fenol se transformó más rápidamente que el 4-CF en todo el intervalo de concentraciones tratadas. La degradación completa del fenol coincide con el comienzo de la fase de muerte celular y con una clara reducción de la velocidad de consumo de 4-CF, por lo que, incluso en presencia de fenol, el 4-CF no es un sustrato de crecimiento para *C. testosteroni*.

El fenol supone un buen sustrato de crecimiento en la degradación cometabólica de 4-CF, ya que, suministra los electrones necesarios para inducir la formación de la monooxigenasa necesaria para la degradación del 4-CF y, mediante su oxidación, se regenera eficientemente el NADH consumido (Bali y Sengül, 2002). Además, la adición de fenol acelera sustancialmente la degradación de 4-CF debido al aumento de la masa celular (Bae *et al.*, 1996, 1997b).

La degradación total o parcial del 4-CF viene determinada por la relación de concentraciones 4-CF/biomasa (S/X) en el momento en el que cesa la degradación de fenol. Para valores de $S/X \leq 0,11$ el 4-CF se degrada completamente, mientras que para $S/X \geq 0,31$ es parcialmente degradado. Los valores de S/X obtenidos en el presente trabajo son similares a los obtenidos por Sáez y Rittmann (1993) para *Pseudomonas putida* según los cuales si $S/X \leq 0,21$ la degradación es total y si $S/X \geq 0,38$ es parcial.

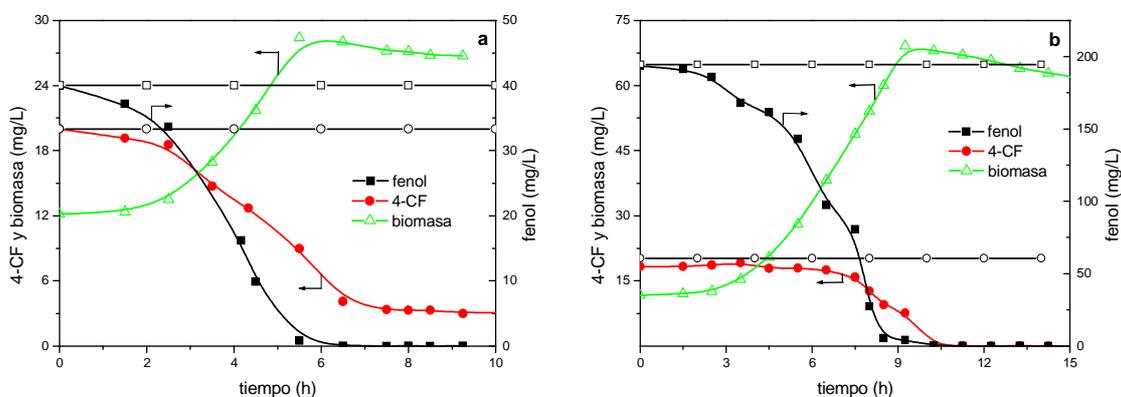


Fig. 6.6. Evolución de la concentración de fenol, 4-CF y biomasa tratando mezclas de 4-CF (20 mg/L) y fenol: (a) 40 mg/L y (b) 200 mg/L con *C. testosteroni* adaptada a fenol (25 mg/L). Experimentos abióticos: fenol (□) y 4-CF (○).

6.3.1.5 Degradación cometabólica de 4-CF con glucosa

A pesar de que la glucosa es una fuente de carbono convencional comúnmente empleada en la degradación de algunos compuestos clorados, entre los que se incluye el 4-CF, la adición de glucosa en monocultivos no garantiza la mejora de la degradación de xenobióticos (Ellis *et al.*, 1996; Tomei *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005a, 2005b). La influencia de la adición de glucosa como sustrato de crecimiento para la degradación de 4-CF por *C. testosteroni* se estudió utilizando dos concentraciones de 4-CF (20 y 40 mg/L). La glucosa se adicionó en un amplio intervalo de concentraciones (10 - 250 mg/L). En la Fig. 6.7a se observa que la adición de glucosa elimina la etapa de latencia en la degradación de 4-CF, logrando su completa eliminación empleando concentraciones de glucosa superiores a 180 mg/L. Por lo tanto, el consumo de 4-CF está estrechamente ligado a la presencia de glucosa en el medio, reduciendo la eficacia de eliminación de 4-CF del 97 al 60% al disminuir la concentración inicial de glucosa de 80 a 10 mg/L. Respecto al consumo de glucosa, esta es consumida rápidamente en presencia de 4-CF empleando diferentes especies de *Pseudomonas* (Loh y Wang, 1998; Wang y Loh, 1999a; Tarighian *et al.*, 2003; Fakhruddin y Quilty, 2005).

Aunque el crecimiento celular coincide con la degradación de 4-CF, la producción celular está ligada al consumo de glucosa (6.7b), ya que, como se ha mostrado anteriormente, el 4-CF no es un sustrato de crecimiento para *C. testosteroni*.

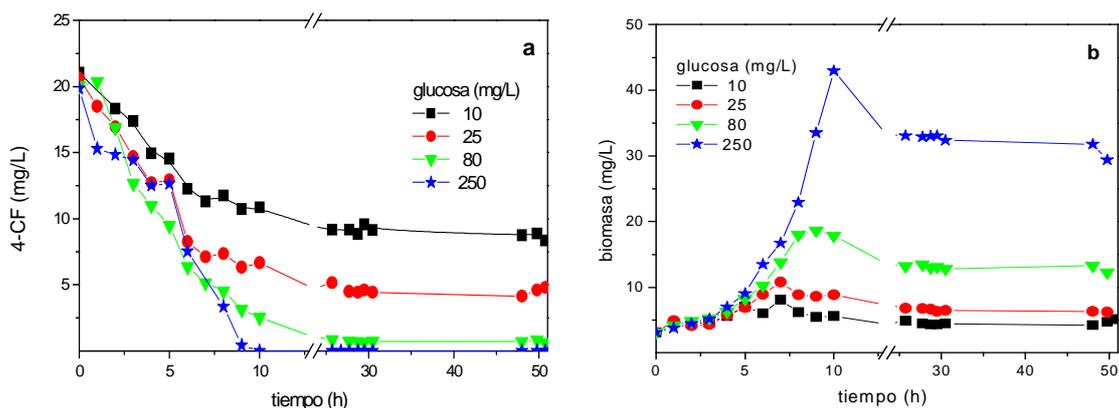


Fig. 6.7. Evolución de las concentraciones de 4-CF (a) y biomasa (b) durante la degradación cometabólica de 4-CF (20 mg/L) empleando glucosa como cosustrato.

El análisis de la evolución de la concentración de fenol empleando fenol o glucosa como cosustratos (200 mg/L) muestran una clara influencia sobre el tiempo de latencia de los mismos, siendo sustancialmente menor en el caso de la glucosa (Fig. 6.8). Sin embargo, mientras que en presencia de fenol el 4-CF fue completamente eliminado, únicamente el 58,4% se eliminó al añadir glucosa. Los valores de Y_{XS} fueron de 0,12 y 0,06 kg SSVLM/kg DQO empleando fenol y glucosa respectivamente. La baja producción de biomasa observada en ambos casos puede estar relacionada con el desacople catabólico provocado por la presencia de 4-CF, siendo más acusado al emplear glucosa como cosustrato.

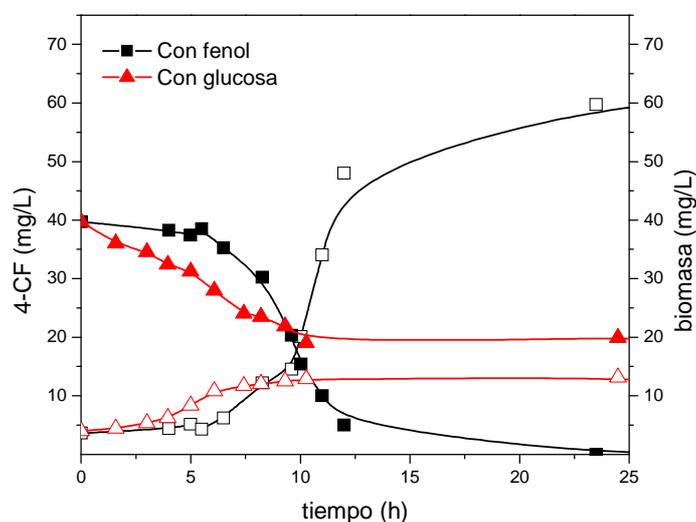


Fig. 6.8. Evolución de las concentraciones de 4-CF (símbolos cerrados) y biomasa (símbolos abiertos) durante la degradación cometabólica de 4-CF en presencia de cosustratos.

El grado de mineralización durante el tratamiento cometabólico de 4-CF también fue distinto añadiendo fenol o glucosa, siendo superiores los rendimientos de eliminación de COT en el caso de emplear fenol como cosustrato (Fig. 6.9). El aumento de la concentración de ambos cosustratos permitió alcanzar mayores rendimientos de eliminación de COT. Sin embargo, para concentraciones de fenol y glucosa superiores a 80 y 250 mg/L, respectivamente, no se observó un aumento de los rendimientos de eliminación de COT. En ocasiones la mineralización del 4-CF se ve limitada por la generación del 4-CC, el cual puede reducir la actividad metabólica al anclarse irreversiblemente a la enzima catecol 2,3-dioxigenasa de la ruta *meta* (Farrell y Quilty,

1999). Sin embargo, en los experimentos realizados no se detectó acumulación de 4-CC en el medio, por lo que, deben ser otros compuestos los que limitan la mineralización.

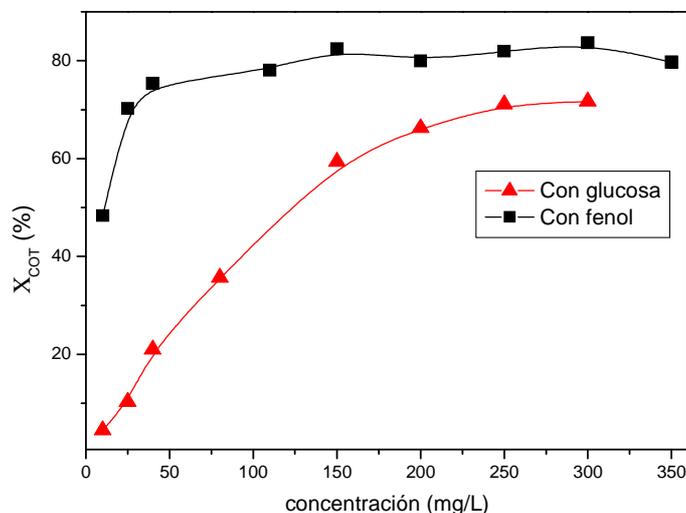


Fig. 6.9. Eficacias de eliminación de COT en la degradación cometabólica de 4-CF (20 mg/L) y diferentes concentraciones de fenol y glucosa.

6.3.1.6 Degradación cometabólica de 4-CF con fenol y glucosa

Las plantas de tratamiento de aguas residuales generalmente reciben influentes que contienen una mezcla de compuestos recalcitrantes y biogénicos. En este sentido, se pretende analizar la influencia de la adición de una fuente de carbono convencional (glucosa) en el tratamiento de mezclas compuestas por un compuesto primario (fenol) y un cometabolito (4-CF). En este tipo de medios ternarios las posibles interacciones entre los tres compuestos son complejas debido principalmente a su toxicidad y competencia por enzimas y cofactores implicados en la degradación de los mismos.

El estudio se realizó empleando una concentración inicial de fenol y 4-CF de 150 y 40 mg/L, respectivamente, utilizando diferentes concentraciones de glucosa (0 - 300 mg/L). La evolución de la concentración de fenol y 4-CF indica que el aumento de la concentración de glucosa aumenta significativamente las velocidades de transformación de ambos compuestos (Fig. 6.10). Este hecho se debe a la mayor generación de biomasa activa y a la reducción de la toxicidad e inhibición del 4-CF al añadir la glucosa (Loh y Wang, 1998; Wang y Loh, 2000a). Aunque el empleo de azúcares como sustrato primario no requiere oxigenasas para su metabolismo, el

proceso cometabólico del 4-CF se realiza a través de la generación del NADH (Wang y Loh, 1999a, 1999b).

Las etapas de latencia para fenol y 4-CF se reducen significativamente en presencia de glucosa, lo cual puede deberse al rápido consumo de glucosa respecto al del fenol y 4-CF. Este hecho ha sido previamente observado durante el tratamiento de medios ternarios mediante *Pseudomonas putida* (Tarighian *et al.*, 2003; Loh y Wang, 1998; Wang *et al.*, 2003). El aumento de la concentración de glucosa de 150 a 300 mg/L no provocó una reducción significativa del tiempo requerido para obtener la completa degradación de fenol y 4-CF.

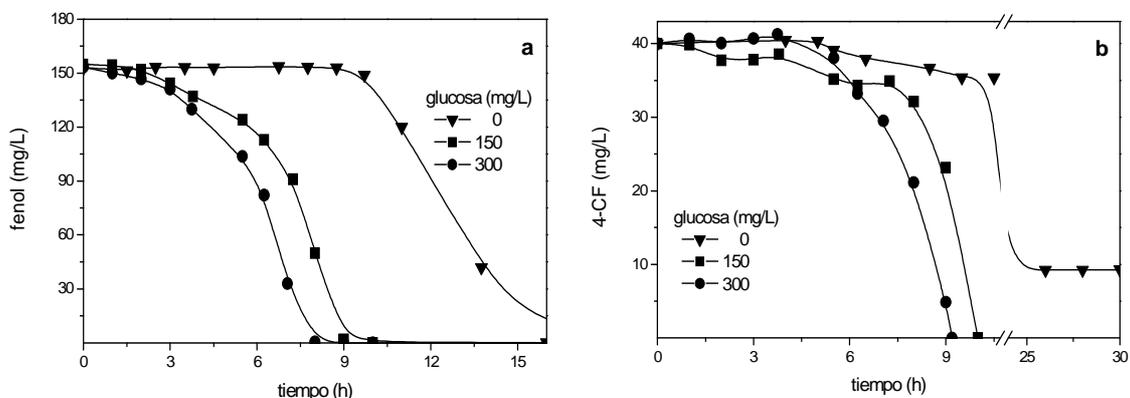


Fig. 6.10. Evolución de las concentraciones de fenol (a) y 4-CF (b) en la degradación cometabólica de fenol, 4-CF y glucosa.

La adición de fenol a medios bifásicos glucosa/4-CF permite la completa eliminación de 4-CF (Fig. 6.11). La energía obtenida durante la oxidación del fenol facilita la recuperación celular tras la inactivación provocada por la presencia de 4-CF, disminuyendo el efecto tóxico sobre las enzimas oxidativas de la glucosa. En general, la utilización simultánea de mezclas de sustratos es más deseable que la utilización secuencial de tratamientos biológicos, ya que, habitualmente la velocidad de transformación y la eficiencia de degradación en sistemas multisustrato son mayores (Wang y Loh, 2000b). Los resultados obtenidos muestran que la presencia conjunta de fenol y glucosa aumenta tanto la velocidad como la extensión de la biotransformación de 4-CF mediante *C. testosteroni*.

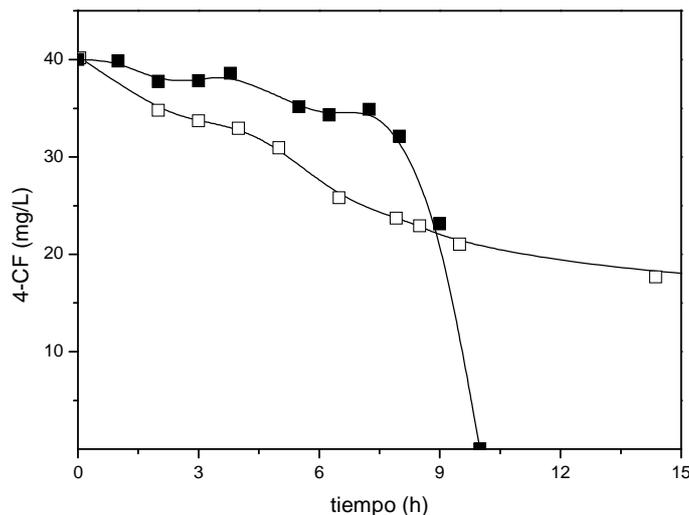


Fig. 6.11. Evolución de la concentración de 4-CF en la degradación cometabólica con glucosa en ausencia (símbolos abiertos) y presencia (símbolos cerrados) de fenol (150 mg/L).

6.3.2. Degradación de Fenol y 4-CF mediante *Pseudomonas putida*

6.3.2.1 Efecto de la temperatura en la degradación de fenol y mezclas fenol/4-CF

La mayoría de los estudios sobre la biodegradación de fenoles y clorofenoles utilizando *P. putida* se han llevado a cabo entre 25 y 30 °C (Kim y Hao, 1999; Wang y Loh, 1999a; Hinteregger *et al.*, 1992; Farrel y Quilty, 2002a; Nuhoglu y Yalcin, 2004). Sin embargo, habitualmente los bioreactores empleados para el tratamiento de aguas residuales operan a menores temperaturas. El estudio de la influencia de la temperatura se llevó a cabo tratando un amplio intervalo de concentraciones de fenol (40 - 185 mg/L) analizando temperaturas de entre 15 y 30 °C. El análisis de la evolución de la concentración de fenol (Fig. 6.12^a) mostró que las mayores velocidades de eliminación de fenol se obtienen a 30 °C, observando que un aumento de la concentración de fenol hace que el efecto de la temperatura sea más notable. La aceleración de la actividad degradativa a dicha temperatura hace que las etapas de crecimiento de biomasa exponencial y de muerte celular se den a tiempos más cortos (Fig. 6.12b). Estudio previos han mostrado que para temperaturas superiores a 30 °C la velocidad de degradación disminuye (Annadurai *et al.*, 2002).

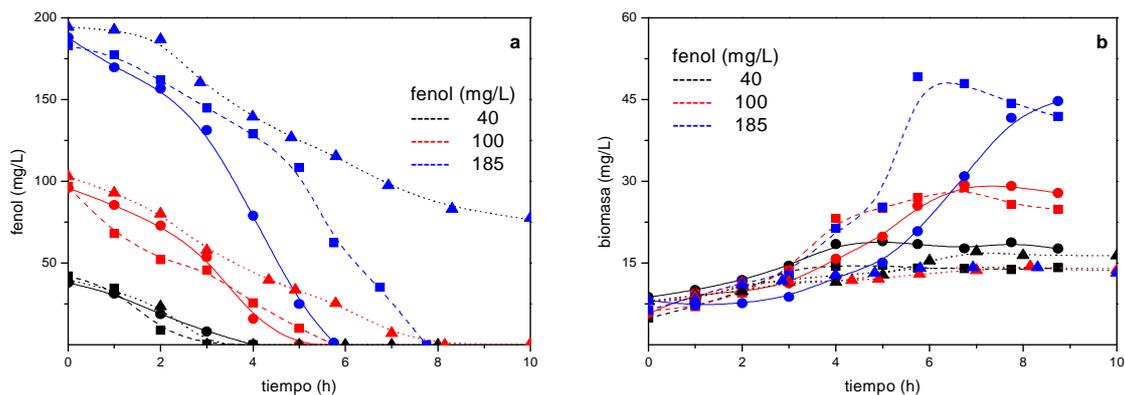


Fig. 6.12. Evolución de las concentraciones de fenol (a) y biomasa (b) a 15 (línea de puntos), 25 (discontinua) y 30 °C (continua).

Del mismo modo se estudió la influencia de la temperatura sobre la degradación conjunta de fenol (185 mg/L) y 4-CF (25 mg/L) (Fig. 6.13). La disminución de la temperatura de 30 a 15 °C redujo la eficacia de eliminación de fenol del 100 al 40%, lo que provocó la caída del rendimiento de degradación de 4-CF, llegando a ser despreciable a 15 °C. Este hecho se debe a que la degradación cometabólica de 4-CF depende en gran medida del consumo de fenol, mediante el cual aumenta la disponibilidad de la enzima monooxigenasa necesaria para la degradación de 4-CF.

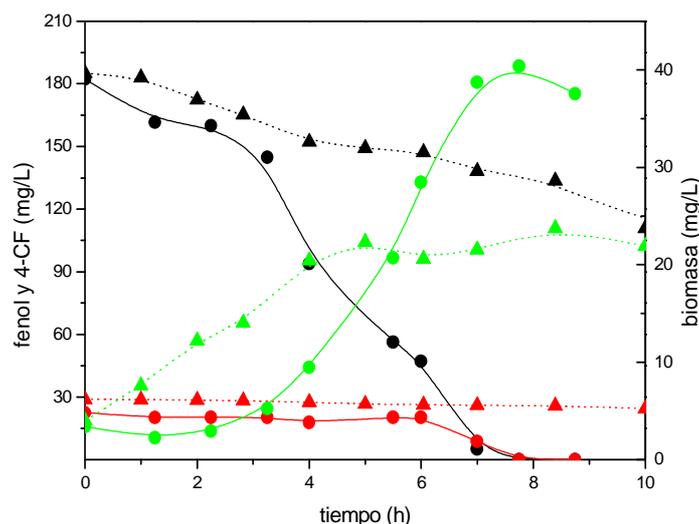


Fig. 6.13. Evolución de las concentraciones de fenol (negro), 4-CF (rojo) y biomasa (verde) durante el tratamiento a 15 (línea de puntos) y 30 °C (línea continua).

6.3.2.2 Cinética de la degradación de fenol

El estudio cinético de la degradación de fenol como única fuente de carbono y energía con *P. putida* se realizó tratando un amplio intervalo de concentraciones de fenol (40 - 550 mg/L) a 30 °C. En la Fig. 6.16 se muestra la evolución de la concentración de fenol, biomasa y sus correspondientes ajustes tratando diferentes concentraciones de fenol.

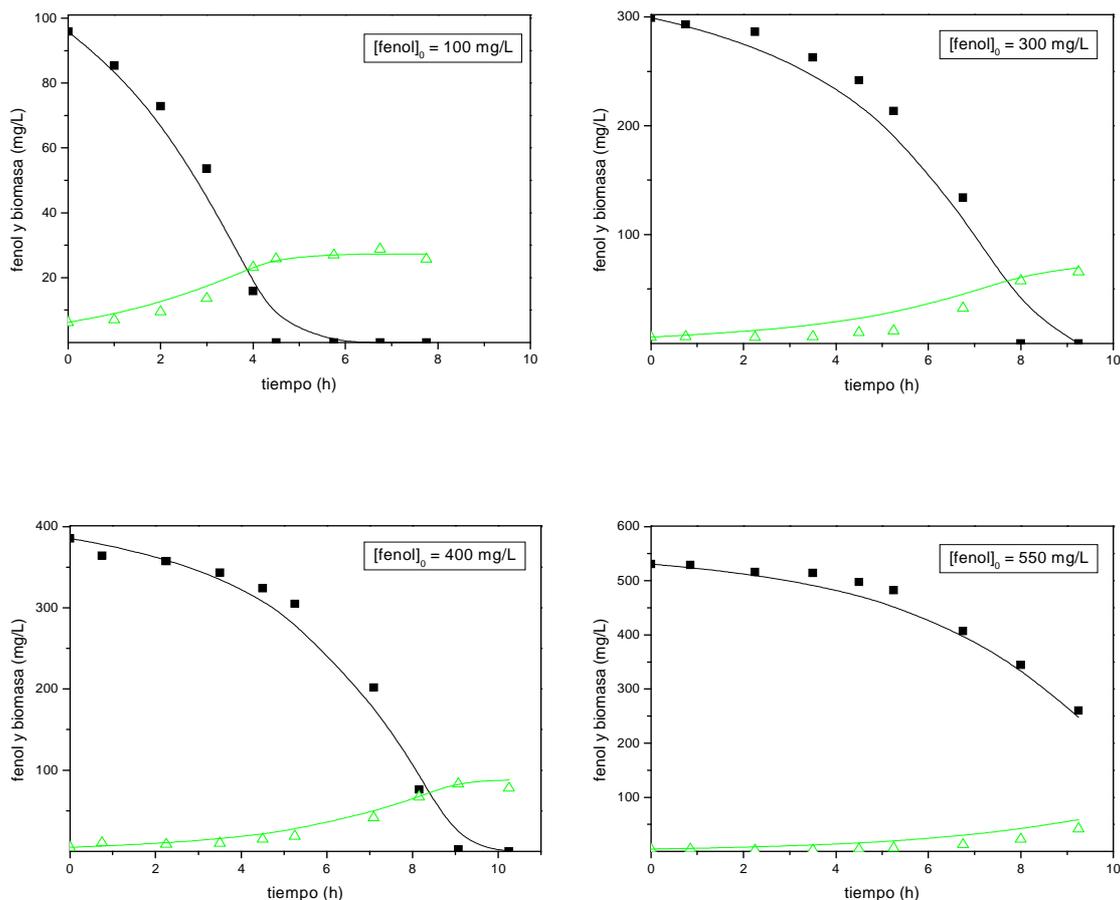


Fig. 6.16. Evolución de los datos experimentales de concentración de fenol (■) y biomasa (Δ) y ajustes (líneas).

Para el cálculo de la velocidad específica máxima de crecimiento de microorganismos (μ_{\max}) se tuvo en cuenta que, durante la etapa de crecimiento exponencial, la biomasa celular (X) sigue una cinética de primer orden del tipo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad [6.1]$$

Uno de los modelos más relevantes que proponen una expresión para μ es el de Monod. La velocidad específica de crecimiento de los microorganismos mediante este modelo se describe en la Ec. 6.2.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad [6.2]$$

donde S es la concentración de sustrato y K_S es la constante de semisaturación o constante de Monod.

De la integración de la Ec. [6.1] se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln X = \ln X_0 + \exp(\mu \cdot t) \quad [6.3]$$

En la Fig. 6.14 se muestra un ejemplo de la evolución temporal del $\ln X$ para una concentración inicial de 530 mg/L. El tramo lineal de dicha representación se ajusta a una recta de cuya pendiente se obtiene el valor de μ para cada una de las concentraciones de fenol ensayadas.

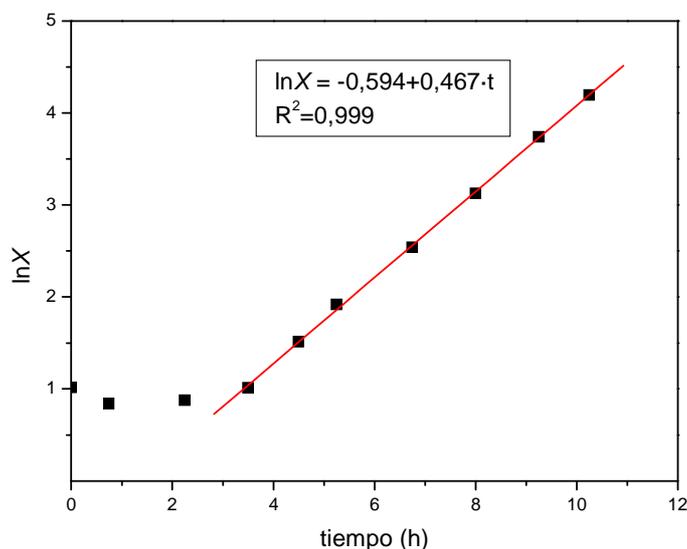


Fig. 6.14. Representación del $\ln X$ frente al tiempo tratando 530 mg/L de fenol.

El análisis mediante la regresión no lineal de los valores de μ frente a la concentración de fenol (Fig. 6.15) mostró valores para K_S y μ_{\max} de $10,22 \pm 6,79$ mg/L

y $0,42 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. La bondad del ajuste al modelo de Monod sugiere que la aclimatación de la biomasa reduce la inhibición del fenol en el intervalo de concentraciones estudiado (González *et al.*, 2001).

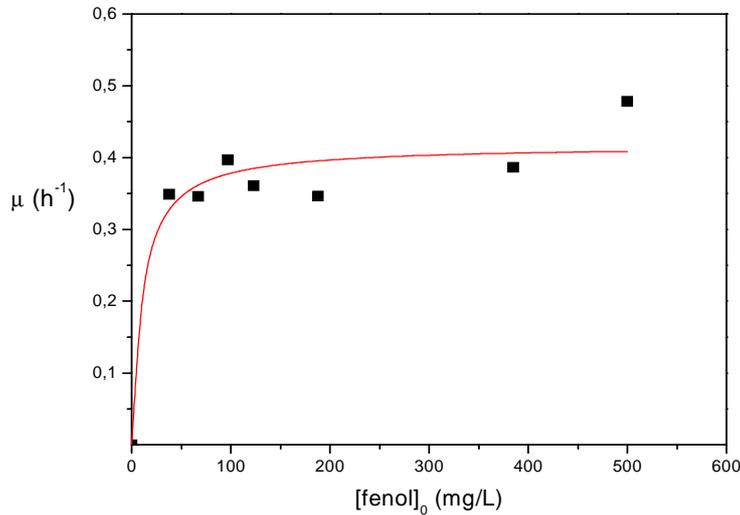


Fig. 6.15. Representación de μ frente a la concentración inicial de fenol.

La modelización simultánea de las curvas de crecimiento celular y de consumo de sustrato se particularizan para la degradación de fenol en las Ecs. [6.4] y [6.5]. Para realizar dichos ajustes se empleó el programa Scientist 3.0.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot [\text{fenol}] \cdot X}{K_S + [\text{fenol}]} \quad \text{donde } K_S = 10,22 \text{ mg/L} \quad [6.4]$$

$$\frac{d[\text{fenol}]}{dt} = \left(\frac{-1}{Y_{XS}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} \quad [6.5]$$

Los valores de Y_{XS} y μ_{\max} de los parámetros resultantes del ajuste se resumen en la Fig. 6.17. El tratamiento de concentraciones de fenol superiores a 200 mg/L hace que los valores de ambos parámetros no muestren diferencias significativas para distintas concentraciones de fenol, lo cual indica que tanto la producción de biomasa como la velocidad de crecimiento no dependen de la concentración tratada.

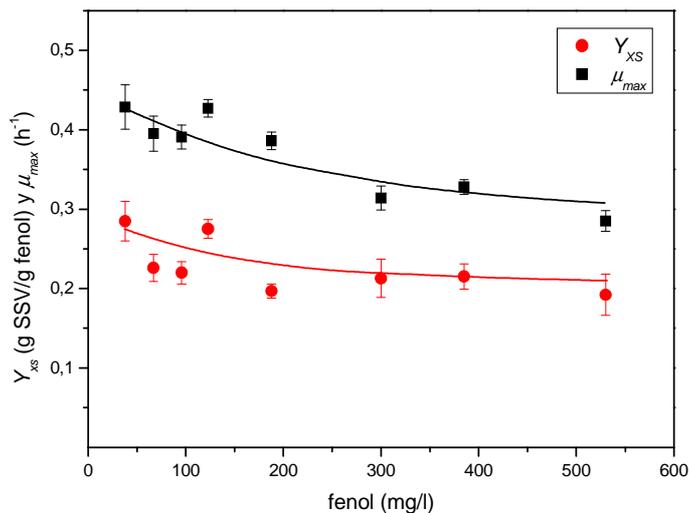


Fig. 6.17. Valores de Y_{XS} y μ_{max} obtenidos mediante el ajuste al modelo de Monod de la degradación de fenol a 30 °C mediante *P. putida*.

6.3.2.3 Degradación de 4-CF

Los rendimientos de degradación de 4-CF y COT durante el tratamiento de 4-CF como única fuente de carbono y energía disminuyeron notablemente al aumentar la concentración tratada, lo cual se debe al aumento de ecotoxicidad (Fig. 6.21). Las bajas velocidades iniciales específicas de consumo de 4-CF ($21 \pm 13 \mu\text{g 4-CF/g SSV}\cdot\text{h}$) indican la reducida biodegradabilidad de dicho compuesto por *P. putida*. El Y_{XS} obtenido para los diferentes experimentos fue de $0,019 \pm 0,017 \text{ g SSV/g DQO}$ lo que indica que el 4-CF no soporta el crecimiento celular, por lo que el tratamiento de 4-CF como única fuente de carbono y energía con *P. putida* no resulta viable.

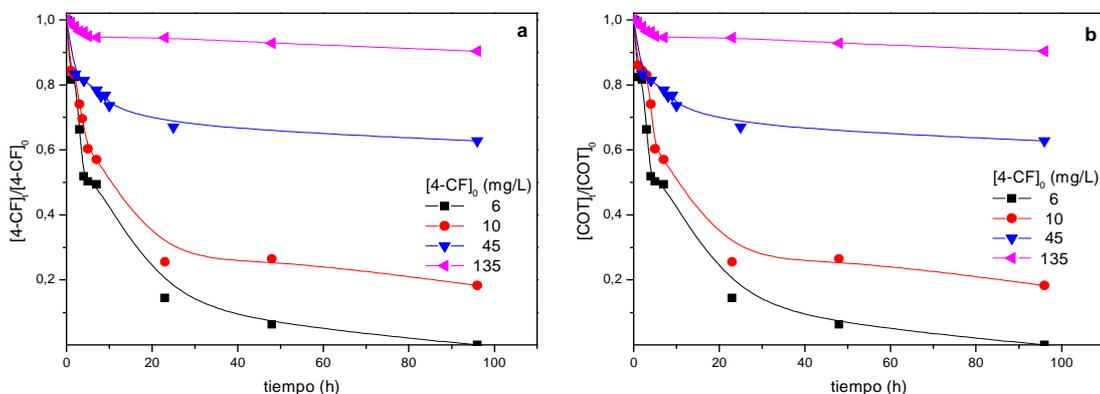


Fig. 6.21. Evolución de la concentración normalizada de 4-CF (a) y COT (b) para diferentes concentraciones iniciales de 4-CF.

6.3.2.4 Influencia de la aclimatación sobre la degradación cometabólica de 4-CF

La aclimatación de *P. putida* a fenol (400 mg/L) se realizó en ensayos en discontinuo. Al final de cada uno de los ensayos la cepa se lavó en medio tamponado para utilizarse en sucesivos ciclos de adaptación. La biomasa resultante en cada uno de dichos ciclos se utilizó en la degradación de 25 mg/L 4-CF en presencia de 150 mg/L de fenol. La Fig. 6.18 muestra la evolución de la concentración de fenol y 4-CF durante su degradación cometabólica tras varios ciclos de aclimatación.

Durante el tratamiento sin aclimatación se observó una etapa de latencia de aproximadamente 10 h. Tras un ciclo de aclimatación se eliminó el fenol y más del 90% del 4-CF. El aumento en el número de ciclos de aclimatación originó un aumento de la velocidad de degradación de fenol, aunque no se observó un aumento significativo de la velocidad de eliminación de 4-CF.

Los elevados rendimientos de degradación de 4-CF obtenidos indican que la aclimatación de *P. putida* con fenol mejora considerablemente las eficacias de eliminación de ambos compuestos. El fenol tiene un papel determinante en la activación de la enzima monooxigenasa e incluso en la inducción de la enzima hidrolasa (Hollender *et al.*, 1997). A pesar de que la actividad de esta última es menor que la de el enzima deshidrogenasa, el tratamiento conjunto de fenol y 4-CF permite la aparición de procesos sinérgicos, permitiendo obtener elevadas eficacias de eliminación de 4-CF.

Estos resultados muestran la importancia de la aclimatación del microorganismo a otro compuesto de naturaleza química similar y de menor toxicidad para aumentar la tolerancia a la presencia de xenobióticos, lo cual suele estar relacionado con cambios en la composición de la membrana celular (Inoue y Horikoshi, 1989; Ramos *et al.*, 2001; Heipieper *et al.*, 2003). Dichas modificaciones incluyen el grado de saturación de ácidos grasos (Pinkart *et al.*, 1996), isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados (Heipieper *et al.*, 1991, 1992) y modificaciones en la composición de fosfolípidos (Ramos *et al.*, 1997) y lipopolisacáridos (Pinkart *et al.*, 1996). Otro de los procesos por el cual la adaptación a fenol mejora la capacidad de degradación de *P. putida* es el aumento de tamaño y la reducción de la relación superficie/volumen de las células aclimatadas (Neumann *et al.*, 2005).

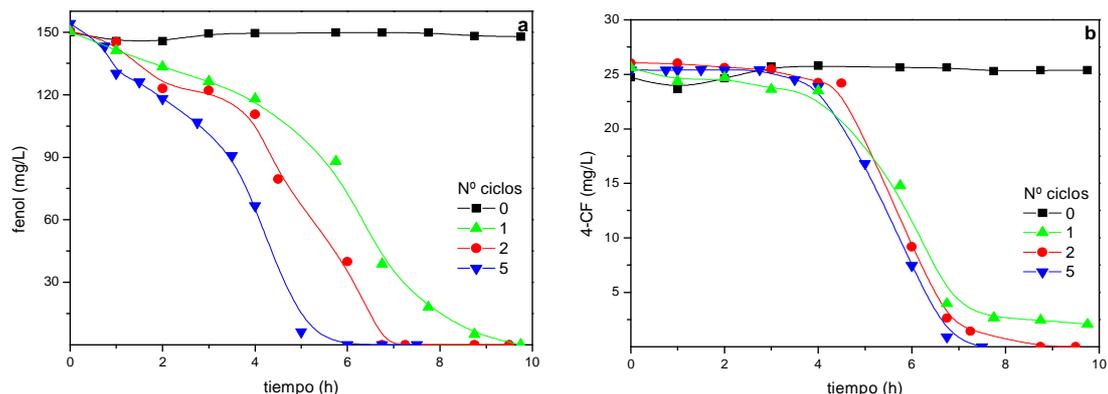


Fig. 6.18. Evolución de fenol (a) y 4-CF (b) para diferentes ciclos de aclimatación.

6.3.2.5 Empleo de cosustratos en la degradación de 4-CF

El estudio de la influencia de la adición de cosustratos sobre la degradación de 4-CF con *P. putida* se llevó a cabo añadiendo catecol (14 y 28 mg/L), ciclohexanol (c-hexanol) (12 y 24 mg/L), fenol (14 y 28 mg/L) y glucosa (30 y 60 mg/L). Se trataron dos concentraciones de 4-CF (20 y 40 mg/L), por lo que las proporciones iniciales de $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$ variaron entre 1:0,5 y 1:2.

En la Fig. 6.19 se muestran las eficacias de degradación de 4-CF y COT obtenidas al tratar 20 mg/L de 4-CF en ausencia de cosustratos y añadiendo proporciones de $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$ de 1:1 y 1:2 después de 24 h. Las eficacias de transformación de 4-CF fueron superiores a las de eliminación de COT, lo que indica la generación de intermedios difícilmente biodegradables por *P. putida*. Respecto al tratamiento cometabólico de 4-CF, los mayores rendimientos de degradación de COT y 4-CF se obtuvieron con fenol y glucosa. Los rendimientos de degradación de 4-CF y COT obtenidos añadiendo catecol como cosustrato resultaron inferiores a los obtenidos en ausencia de cosustratos, lo que puede deberse a la inhibición competitiva entre ambos compuestos, ya que el aumento de la concentración de catecol reduce el consumo de 4-CF.

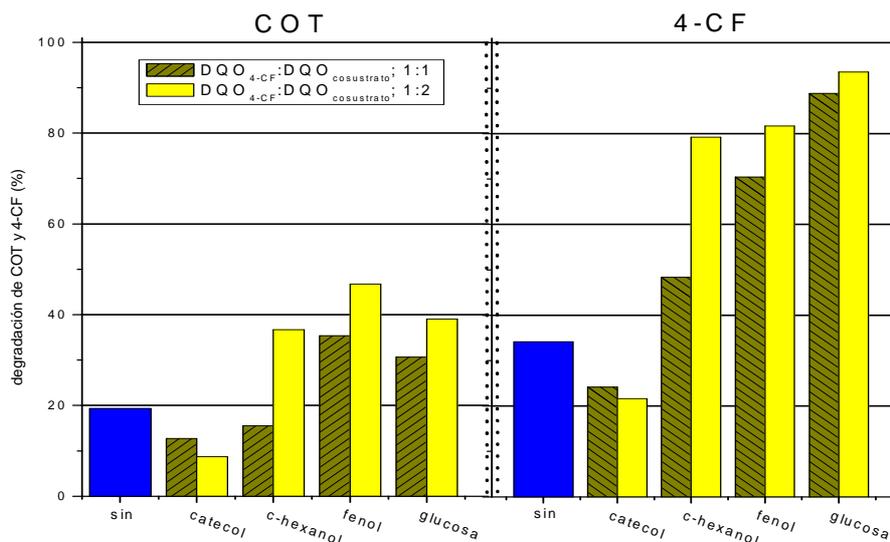


Fig. 6.19. Eficacias de eliminación de COT y 4-CF en presencia de diferentes cosustratos en proporciones 1:1 y 1:2. [4-CF] = (20 mg/L).

La Fig. 6.20 muestra los porcentajes de reducción de los rendimientos de degradación de COT y de 4-CF al aumentar la concentración de 4-CF de 20 a 40 mg/L empleando una proporción de $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$ de 1:1. El aumento de la concentración de 4-CF provocó un mayor efecto inhibitorio sobre la biomasa, lo que redujo las eficacias de eliminación de COT y 4-CF entorno a un 70%. En todos los casos el empleo de cosustratos disminuyó dicha pérdida de eficacia. A pesar de que la adición de catecol redujo significativamente la pérdida de eficacia, los rendimientos obtenidos con dicho cosustrato fueron muy bajos para ambas concentraciones de 4-CF. El empleo de fenol y glucosa condujo a una notable reducción del efecto inhibitorio, observando pérdidas de eficacia de eliminación de COT y 4-CF inferiores al 55%.

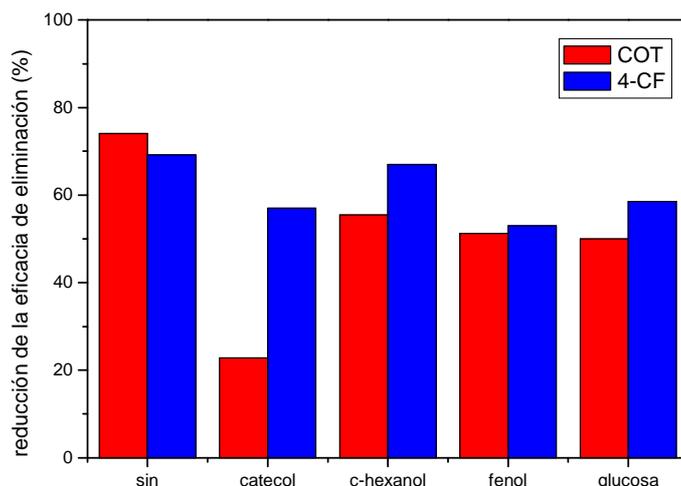


Fig. 6.20. Reducción de la eficacia de eliminación de COT y 4-CF al aumentar la concentración de 4-CF de 20 a 40 mg/L en presencia de diferentes cosustratos en proporciones 1:1.

6.3.2.6 Degradación cometabólica de 4-CF en presencia de fenol o glucosa

A la vista de los resultados obtenidos, resulta interesante estudiar el empleo de diferentes concentraciones de fenol y glucosa (25 - 690 mg DQO/L) sobre la degradación de CF (50 mg/L), al ser los cosustratos que mostraron los resultados más interesantes para la degradación de 4-CF.

En la Fig. 6.21 se muestra la evolución de las concentraciones de 4-CF y biomasa empleando diferentes concentraciones de ambos cosustratos. Fue necesario añadir una DQO de 390 mg/L de fenol o glucosa para eliminar completamente el 4-CF en el tiempo de ensayo, lo que equivale a emplear un ratio aproximado de $DQO_{4-CF}:DQO_{cosustratos}$ de 1:8.

El aumento de la concentración de fenol alargó la etapa de latencia, lo cual se debe probablemente a la competencia por el enzima monooxigenasa para la degradación de fenol y 4-CF. La estructura química similar de fenol y 4-CF hace que los sistemas oxidativos implicados en su degradación sean semejantes, lo que provoca la inhibición competitiva entre ambos, disminuyendo la velocidad inicial de consumo del 4-CF para mayores concentraciones de fenol (latencia aparente). Una vez el fenol es degradado hasta alcanzar una baja concentración (< 10 mg/L), la velocidad de degradación de 4-CF aumenta notablemente. Por otro lado, la adición de glucosa redujo la etapa de

latencia a menos de 1 h, alcanzando mayores velocidades iniciales específicas de degradación de 4-CF al aumentar su concentración. Este hecho parece estar relacionado con los cambios fisiológicos del sistema metabólico, tales como reajustes enzimáticos, cambios del tamaño, composición y caracteres genéticos de las células, a lo que se denomina latencia de aclimatación (Wang y Loh, 1999b).

La degradación de 4-CF con glucosa se extiende tras finalizar la etapa de crecimiento celular exponencial, lo que indica que la degradación de 4-CF prosigue tras el agotamiento del cosustrato, sin embargo, no se observó degradación de 4-CF una vez consumido todo el fenol. Por lo que a pesar de que fenol y glucosa son sustratos de crecimiento y, por lo tanto, responsables de la generación de biomasa, ambos juegan un papel metabólico diferente. En el caso del fenol la clave parece residir en la inducción enzimática y la regeneración del poder reductor (NADH o NADPH), por lo que el consumo continuo de fenol sustenta una biomasa capaz de transformar cometabólicamente el 4-CF. Por otro lado, la glucosa también aporta poder reductor, sin embargo, la mayor contribución es la generación de células activas (Wang y Loh, 2001).

Al igual que para *C. testosteroni*, la degradación total o parcial de 4-CF por *P. putida* puede determinarse por la relación de concentraciones de 4-CF y biomasa en el momento en el que se agota el cosustrato (4-CF/biomasa o S/X). Empleando fenol como cosustrato la degradación total de 4-CF se obtuvo para valores de S/X menores de 0,45, mientras que para valores mayores el 4-CF fue parcialmente degradado. En el caso de la glucosa el ratio se calculó teniendo en cuenta que el cese de crecimiento celular coincide con el punto de agotamiento del cosustrato. La degradación completa de 4-CF se obtuvo para valores de $S/X \leq 0,19$, mientras que para valores de $S/X \geq 0,65$ la degradación de 4-CF fue parcial.

Por lo tanto, la utilización de glucosa para la degradación de 4-CF resulta interesante ya que se reduce la etapa de latencia, no supone un riesgo adicional de contaminación ambiental ya que no se considera tóxica, no provoca inhibición competitiva y es más económica que el fenol. Por otro lado, resulta de interés el estudio de la degradación conjunta de fenoles y clorofenoles ya que, habitualmente, estos aparezcan conjuntamente en aguas residuales.

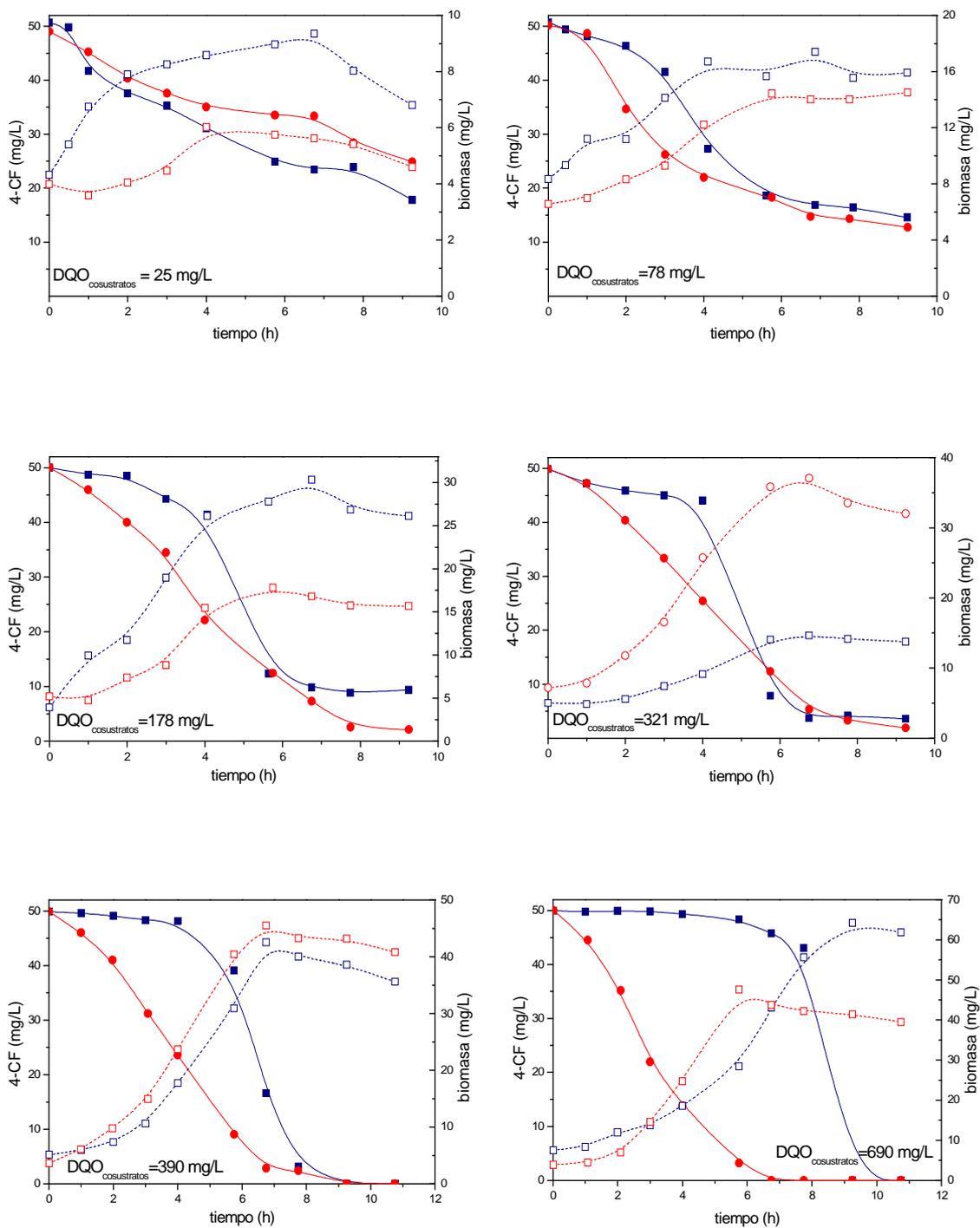


Fig. 6.21. Evolución de las concentraciones de 4-CF (símbolos cerrados) y biomasa (símbolos abiertos) empleando como cosustratos fenol (azul) y glucosa (rojo). Medio: $[4\text{-CF}]_0 = 50 \text{ mg/L}$; $[DQO_{\text{cosustratos}}] = 25 - 690 \text{ mg/L}$.

En la Fig. 6.22 se muestra un ejemplo de la evolución de las concentraciones de fenol, 4-CF y biomasa, así como el COT (medido y calculado). El $COT_{\text{calculado}}$ se obtuvo

teniendo en cuenta el COT asociado a las concentraciones de fenol y 4-CF para cada tiempo. Como puede verse en la Fig. 6.22, la eliminación del COT se extiende hasta el momento en que el fenol es completamente eliminado, a partir del cual no se observa una mayor reducción. El COT_{medido} coincide con el $COT_{calculado}$ hasta el momento en el que comienza la degradación de 4-CF, a partir del cual las diferencias entre ambos aumentan. Finalmente se detectó una concentración de COT refractaria, la cual coincide con el $COT_{calculado}$ inicial del 4-CF, lo que indica que el 4-CF no se mineraliza sino que se transforma en otros compuestos no biodegradables por *P. putida*. Tanto en presencia de fenol como de glucosa se observó visualmente la presencia de 5-CHMS, el cual ha sido identificado como un compuesto de degradación final no degradable por *P. putida* (Admassu y Korus, 1996).

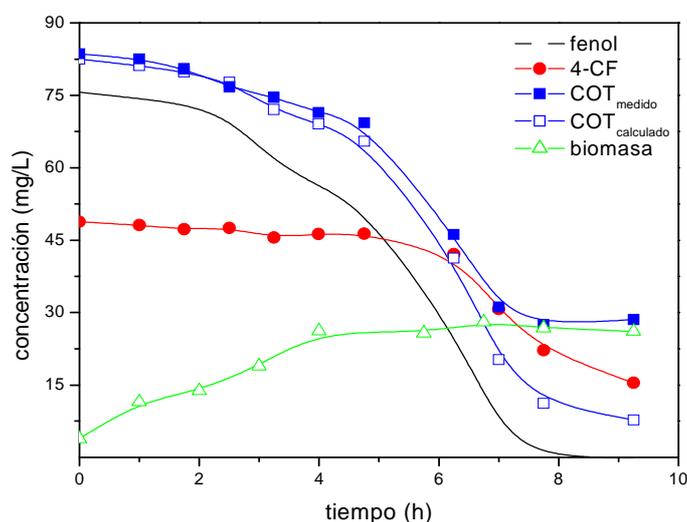


Fig. 6.22. Evolución del proceso de degradación de fenol (90 mg DQO/L) y 4-CF (50 mg/L).

Estos resultados sugieren que la rotura del anillo aromático durante la degradación de 4-CF en presencia de ambos cosustratos se lleva a cabo siguiendo la vía *meta*, ya que esta provoca un metabolismo incompleto que finaliza con la generación de intermedios considerados no biodegradables por *P. putida* (Westmeier y Rehm, 1987; Reineke *et al.*, 1982; Balfanz y Rehm, 1991).

En la Fig. 6.23 se muestra la evolución conjunta de las concentraciones de fenol, 4-CF y biomasa tratando 25 y 50 mg/L de 4-CF cometabólicamente con fenol (10 y 275 mg/L). Algunos autores como Wang *et al.* (1997) han propuesto cinéticas competitivas

con inhibición cruzada mientras otros como Hutchinson y Robinson (1988) presentaron un modelo de crecimiento dual en el que se incluye el efecto de la inhibición.

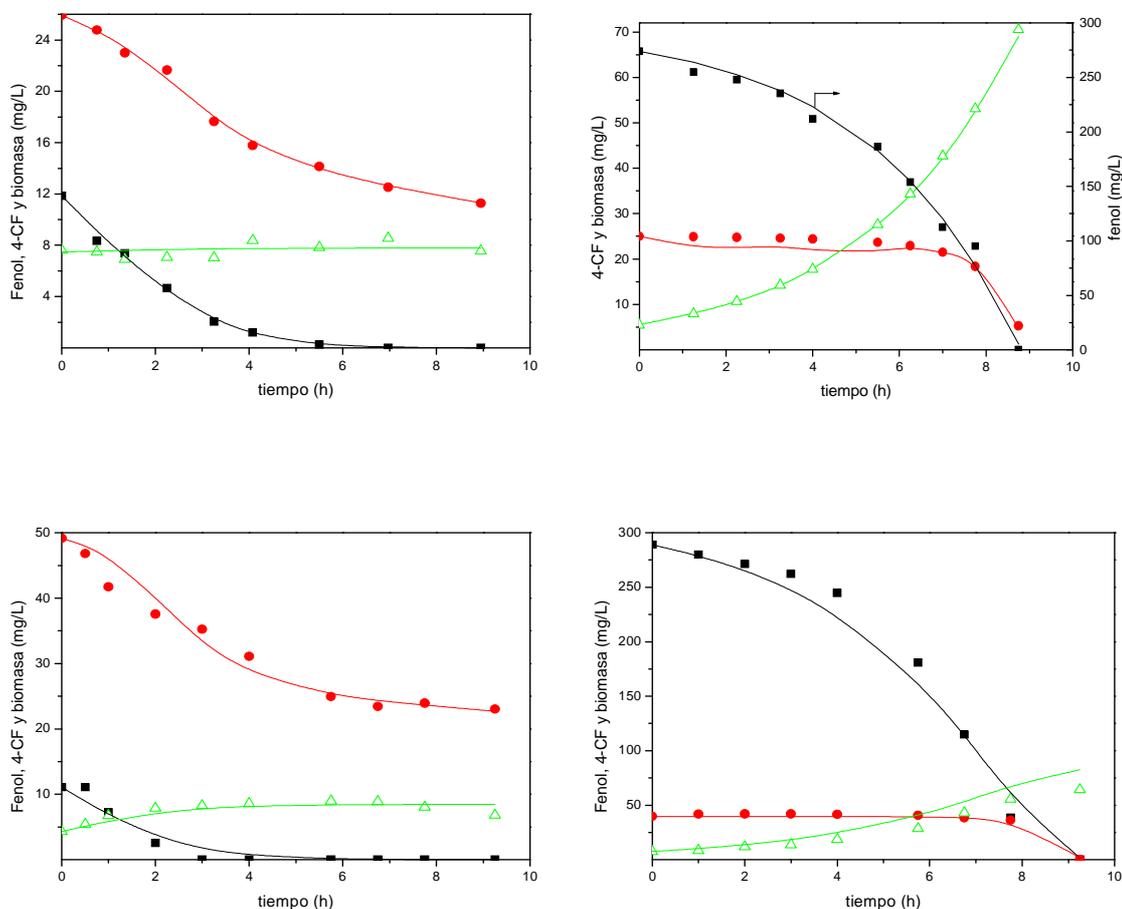


Fig. 6.23. Evolución de las concentraciones de fenol (■), 4-CF (●) y biomasa (△) durante el tratamiento conjunto de ambos compuestos.

6.3.3. Tratamiento de 4-CF Empleando Lodo Bioaumentado con *P. putida* en SBR

6.3.3.1 Influencia de la aclimatación y bioaumentación en la puesta en marcha

Se realizó un estudio previo sobre la puesta en marcha de reactores biológicos empleando diferentes inóculos para analizar la influencia de la bioaumentación y la aclimatación sobre la degradación cometabólica de fenol (80 mg/L) y 4-CF (50 mg/L). Se emplearon reactores discontinuos de 2 L, termostatzados a 19 ± 3 °C, agitados y aereados en continuo, inoculados con fango activo (2.500 mg SSVLM/L). Los ensayos

de bioaumentación se llevaron a cabo empleando un 0,3% de *P. putida* respecto al lodo mixto.

En la Fig. 6.24 se muestra la evolución de las concentraciones de fenol y 4-CF. El lodo no aclimatado no mostró actividad degradativa, sin embargo, tras la adaptación del mismo, ambos compuestos se eliminaron en 8 h. Debido a la elevada tolerancia de *P. putida* a la presencia de xenobioticos, los rendimientos obtenidos con la cepa sin aclimatar fueron mayores que con el licor mezcla no aclimatado, sin embargo, los rendimientos de eliminación de fenol y 4-CF no superaron el 35%. Tras la aclimatación de la cepa al consumo de ambos compuestos se obtuvieron eficacias de eliminación de fenol y 4-CF del 100 y 82% respectivamente.

La bioaumentación con *P. putida* no aclimatada no mejoró los rendimientos obtenidos empleando el licor mezcla aclimatado, por lo que la bioaumentación de reactores biológicos adaptados al tratamiento de ambos compuestos únicamente resulta efectiva si se emplea una cepa de *P. putida* adaptada. Este hecho parece deberse al aumento de la velocidad de consumo al aclimatar la cepa antes de inocularse en el licor mezcla, lo cual aumenta la supervivencia de la misma durante la puesta en marcha (Timmis, 1997; Van Limbergen *et al.*, 1998). De este modo se obtuvieron rendimientos muy superiores a los obtenidos utilizando licor mezcla o *P. putida* individualmente.

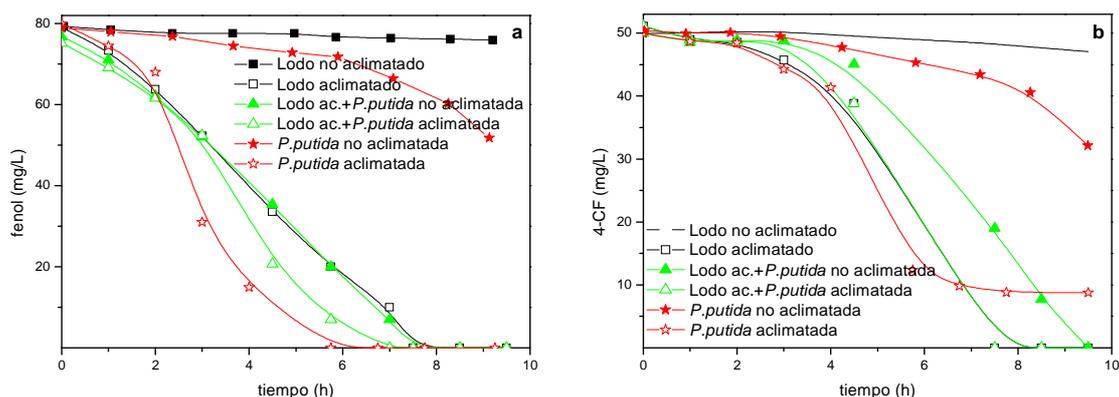


Fig. 6.24. Evolución de las concentraciones de fenol (a) y 4-CF (b) empleando diferentes inóculos para el tratamiento conjunto de fenol (80 mg/L) y 4-CF (50 mg/L).

6.3.3.2 Degradación cometabólica de 4-CF con fenol

Durante el análisis de la influencia de la bioaumentación sobre la degradación cometabólica de 4-CF con fenol mediante SBR se compararon los rendimientos

obtenidos empleando licor mezcla, *P. putida* y lodo bioaumentado como inóculos. La bioaumentación del licor mezcla con *P. putida* mejoró notablemente las velocidades de consumo de ambos compuestos (Fig. 6.25). Este hecho puede deberse a la elevada supervivencia de la cepa y la transferencia genética entre la cepa y el licor mezcla, lo que podría dar lugar a transconjugados con una elevada capacidad degradativa tal y como se ha observado en estudios sobre la bioaumentación con *P. putida* para la eliminación de xenobióticos (Van Liembergen *et al.*, 1998; Venkata Mohan *et al.*, 2009). Esto explica que las velocidades de degradación sean superiores a las obtenidas en el SBR-*P. putida*. Estos resultados sugieren la aparición de una relación sinérgica entre el licor mezcla y *P. putida*, alcanzando elevados rendimientos de degradación de fenol y 4-CF cuando ambas poblaciones se cultivan conjuntamente en un sistema SBR. El aumento de la eficacia observado en el SBR-lodo bioaumentado puede deberse y a la generación de un gran número de microorganismos transconjugados,

Además, las concentraciones de fenol detectadas tras el llenado en el SBR-licor mezcla y el SBR-lodo bioaumentado fueron menores a las esperadas, lo cual indica que dicho compuesto es parcialmente degradado durante el llenado anóxico. Los rendimientos de degradación de fenol durante el llenado anóxico en ambos reactores disminuyeron del 24 al 5% al aumentar la concentración de 4-CF de 525 a 1.575 mg/L.

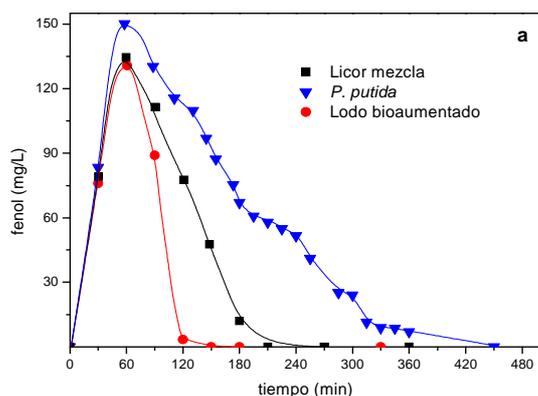


Fig. 6.25a. Evolución de la concentración de fenol durante el tratamiento cometabólico de 4-CF (1.050 mg/L) y fenol (3.150 mg/L) en los diferentes SBR.

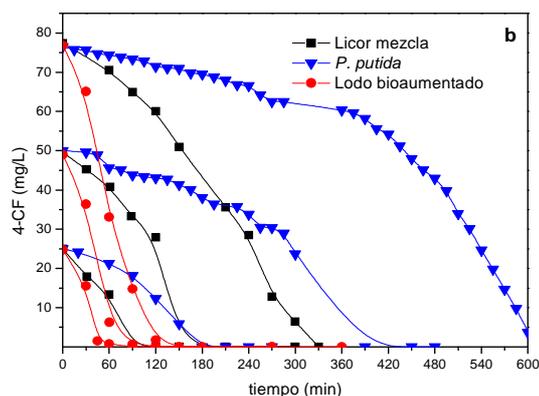


Fig. 6.25b. Evolución de la concentración de 4-CF durante el tratamiento cometabólico de 4-CF (525, 1.050 y 1.575 mg/L) y fenol (3.150 mg/L) en los diferentes SBR.

El análisis del COT mostró una fracción de COT no biodegradable similar en el SBR-licor mezcla y lodo bioaumentado, la cual fue mayor en el caso del SBR-*P. putida* (Fig. 6.26). Si no se tiene en cuenta dicha concentración remanente, en los tres reactores se obtuvo la completa eliminación del COT tratado en cada ciclo. Las velocidades de consumo de COT en el SBR-lodo bioaumentado fueron significativamente mayores a las obtenidas en el resto de reactores.

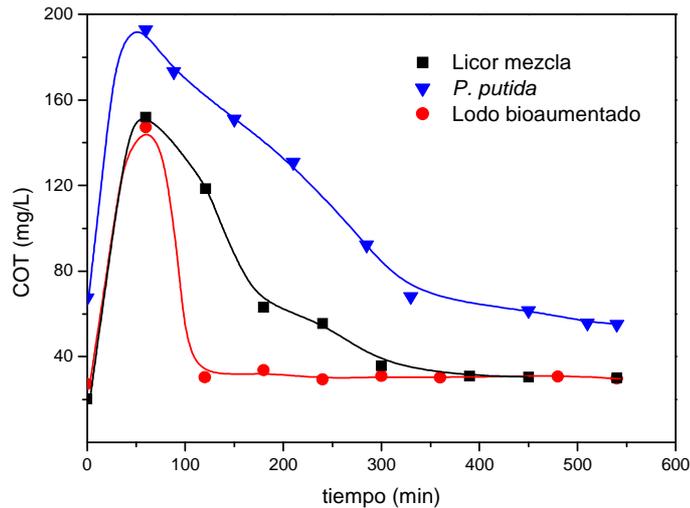


Fig. 6.26. Evolución del COT durante el tratamiento cometabólico de 4-CF (1.050 mg/L) y fenol (3.150 mg/L) empleando diferentes microorganismos.

El tipo de interacción metabólica entre 4-CF y fenol en el caso del SBR-*P. putida*, por el cual el 4-CF no es degradado hasta que el fenol es prácticamente consumido, hizo que en este caso se obtuviesen las menores velocidades de degradación de 4-CF (Fig. 6.27). Tal y como se observó en los experimentos en discontinuo, este tipo de utilización diáuxica de dos sustratos es común en procesos degradativos empleando una única bacteria. Este tipo de metabolismo hace que el 4-CF solamente sea transformado si ciertos compuestos orgánicos presentes en el medio son previamente degradados (Kuiper y Hanstveit, 1984). De hecho, este tipo de interacciones negativas entre compuestos en mezclas de sustratos similares entre sí son comunes (Reardon *et al.*, 2002).

El aumento de la concentración de 4-CF tratada hasta 1.575 mg/L, hizo que el tiempo de degradación en el SBR-*P. putida* se extendiese hasta 660 min, por lo que el

tratamiento de concentraciones mayores de 4-CF requiere ciclos más largos que los empleados en el presente estudio.

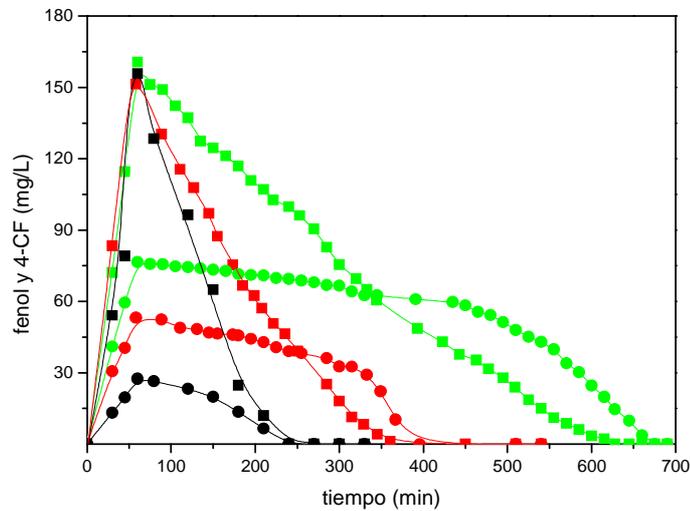


Fig. 6.27. Evolución de la concentración de fenol (cuadrados) y 4-CF (círculos) tratando mezclas de 525 (negro), 1.050 (rojo) y 1.575 mg/L (verde) de 4-CF con 3.150 mg/L de fenol en el SBR-*P. putida*.

A diferencia del sistema SBR-*P. putida*, en los SBR-licor mezcla y SBR-lodo bioaumentado la degradación de fenol y 4-CF se produce de forma simultánea, por lo que el consumo de 4-CF comenzó desde el inicio de la etapa aerobia (Fig. 6.28). El empleo de licor mezcla reduce los procesos de inhibición competitiva en la degradación de ambos sustratos. Este hecho se debe a que, habitualmente, en la degradación de efluentes complejos por una comunidad microbiana heterogénea aclimatada los compuestos se degradan simultáneamente por especies diferentes (Alexander, 1994). En ambos casos el aumento de la concentración de fenol condujo a un aumento de las velocidades de degradación de 4-CF, lo que permitió aumentar la concentración de 4-CF tratable mediante ambos sistemas hasta 3.150 mg/L (150 mg/L en el interior).

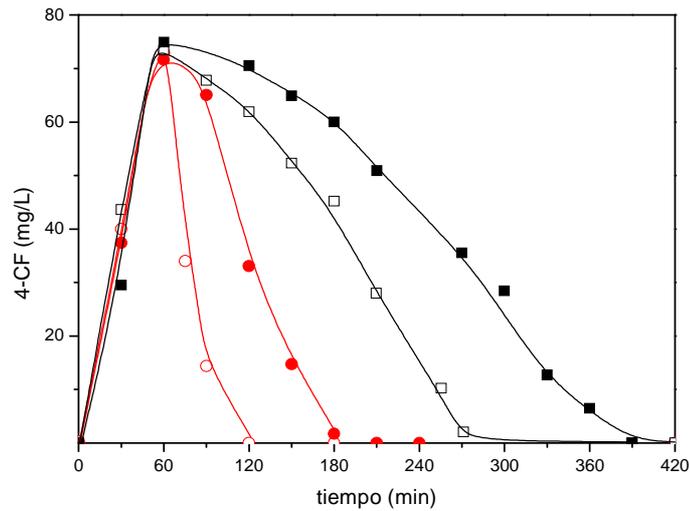


Fig. 6.28. Evolución de la concentración de 4-CF tratando mezclas de 4-CF (1.575 mg/L) con 525 (símbolos abierto) y 3.150 mg/L (símbolos cerrados) de fenol mediante SBR-licor mezcla (negro) y SBR-lodo bioaumentado (rojo).

Análisis bioindicativo

Durante los experimentos en discontinuo así como en la puesta en marcha del SBR-*P. putida* la cepa creció en suspensión individualmente en forma de bacilos (Fig. 6.29a). Tras la operación de varios meses del reactor se formaron agregados de diámetros entre 1,0 y 2,0 mm (Fig. 6.29b). Lo cual puede deberse al stress químico, como el provocado por la presencia de 4-CF en el presente estudio (Farrell y Quilty, 2002b; Bossier y Verstraete, 1996). Esta capacidad para formar agregados confiere una mayor protección contra la depredación protozoaria (Van Limbergen *et al.*, 1998), pudiendo permanecer en los reactores durante largos periodos de tiempo. Para la formación de agregados es necesario que *P. putida* crezca en presencia de monoclorofenoles, ya que con fenol o glucosa como únicos sustratos la cepa crece dispersa (Fakhrudin y Quilty, 2007). Según Farrell y Quilty (2002b) la agregación ocurre durante el tratamiento de concentraciones de 4-CF mayores de 100 mg/L. Sin embargo, en el presente trabajo, la formación de agregados en el SBR-*P. putida* se observó tratando incluso concentraciones de 4-CF de 25 mg/L.

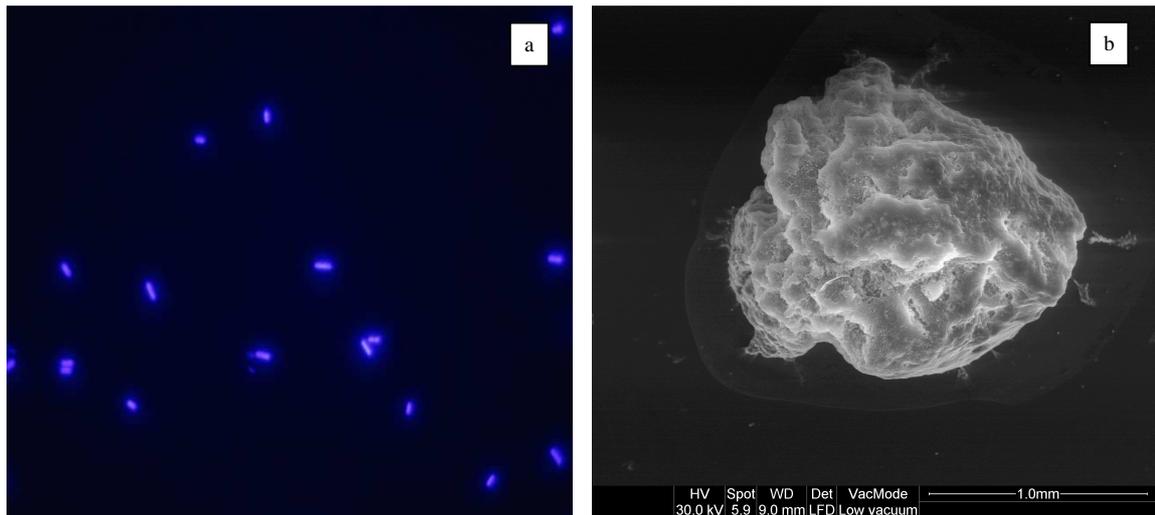


Fig. 6.29. Crecimiento de *P. putida* en suspensión durante un ensayo en discontinuo (a) y en agregados durante el tratamiento en SBR (b).

El examen de la superficie de los agregados mostró la presencia de bacterias dentro de una matriz probablemente constituida por exopolímeros (Fig. 6.30). Se observó una evolución de la forma celular de *P. putida* de bacilos a cocos como respuesta a la presencia de los tóxicos, ya que de este modo se reduce la superficie expuesta (Neumann *et al.*, 2005).

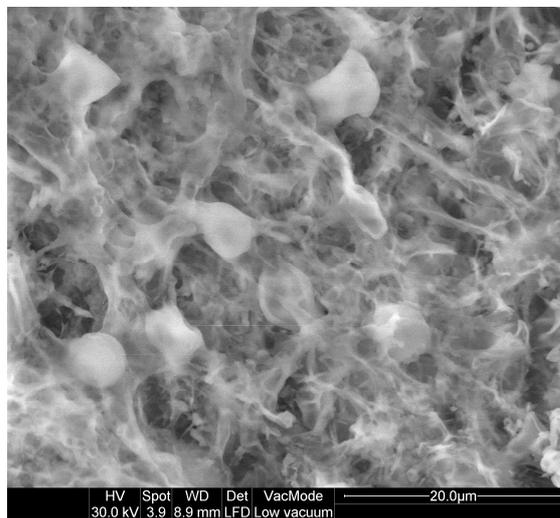


Fig. 6.30. Superficie de los agregados obtenidos en el reactor SBR-*P. putida*.

En la Fig. 6.31a se muestra el inóculo de licor mezcla empleado en el SBR-licor mezcla y SBR-lodo bioaumentado, el cual presentó una elevada densidad de flóculos y una buena capacidad de sedimentación. La capacidad de autoagregación de *P. putida* también se evidenció en el SBR-lodo bioaumentado, desarrollando colonias de

geometría esférica y con un mayor brillo al microscopio óptico que el licor mezcla (Fig. 6.31b). Las colonias de *P. putida* no crecieron en suspensión sino que se adhirieron a los flóculos del licor mezcla, mejorando así su supervivencia en el SBR (Fig. 6.31c). A lo largo de la experimentación las colonias de *P. putida* adheridas al lodo se integraron en la matriz del flóculo tal y como muestran las micrografías tomadas a los 3 (Fig. 6.31b) y 7 (Fig. 6.31d) meses de operación. Por lo que el proceso de inclusión de *P. putida* al licor mezcla con una primera adhesión reversible, debido a la presencia de fuerzas de larga distancia, y una segunda adhesión irreversible mediante el contacto directo entre las superficies por medio de diferentes interacciones como las hidrofóbicas, finaliza con una última etapa de recubrimiento de la cepa con los exopolímeros celulares presentes en los flóculos del licor mezcla.

Las Figs. 6.xe y 6.xf muestran las poblaciones de filamentosas detectadas tras 7 meses de operación del reactor SBR-lodo bioaumentado y el SBR-licor mezcla, respectivamente. La bacteria filamentosa predominante en ambos reactores fue *Microthrix parvicella* (Fig. 6.31e), cuya presencia puede deberse al elevado Θ y reducido F/M con los que se operó. Debido a la presencia de dicha bacteria, el SBR-licor mezcla mostró una notable reducción de la sedimentabilidad, cuyo control resulta especialmente complicado, ya que presenta una elevada tolerancia a la adición secuencial de influente y es capaz de crecer a pesar de establecer llenados anóxicos (Jenkins *et al.*, 2004). La densidad de *M. parvicella* se redujo tras la bioaumentación con *P. putida*, reduciendo notablemente los problemas de sedimentación observados en el SBR-licor mezcla. Este hecho podría estar relacionado con el mayor F/M alcanzado en el SBR-lodo bioaumentado (0,62 kg DQO/kg SSV·d) respecto al SBR-licor mezcla (0,48 kg DQO/kg SSV·d), ya que el aumento del F/M supone un método efectivo para el control del crecimiento de *M. parvicella* (Jenkins *et al.*, 2004).

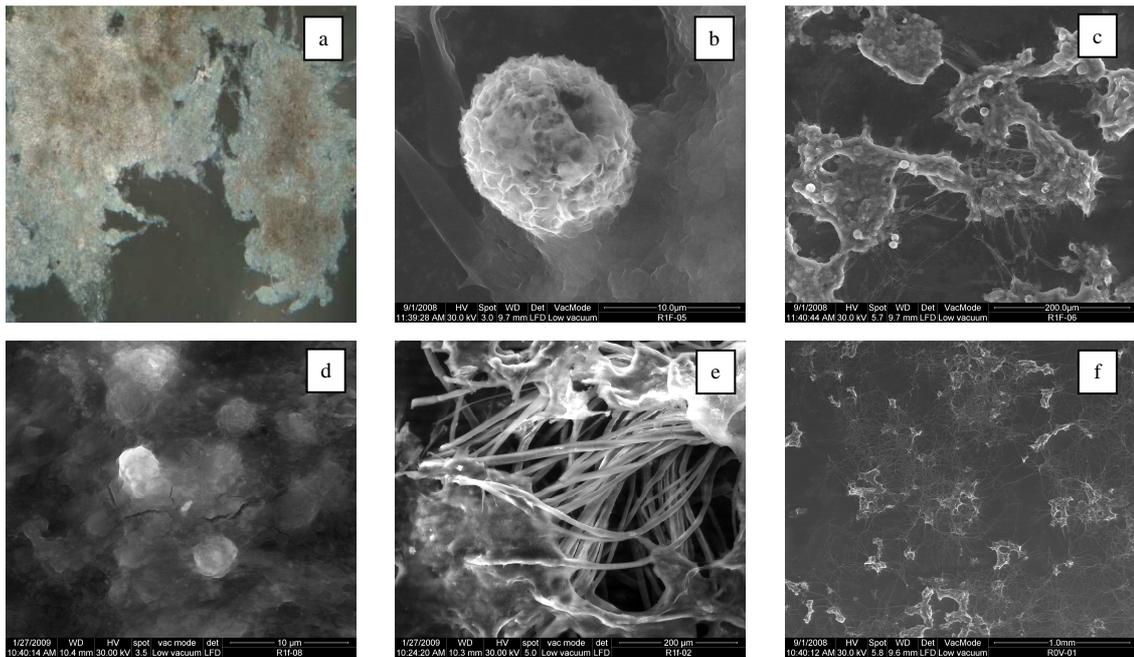


Fig. 6.31. Micrografías SEM del licor mezcla y bioaumentado.

- | | | |
|--|--|---|
| a. SBR-licor mezcla (3 meses)
(25x) | b. Colonia de <i>P. putida</i> del SBR-
lodo bioaumentado (3 meses) | c. SBR-lodo bioaumentado (3
meses) |
| d. SBR-lodo bioaumentado (7
meses) | e. Bacterias filamentosas en el
SBR-lodo bioaumentado (7
meses) | f. Bulking filamentosos en el
SBR-licor mezcla (7 meses) |

6.3.3.3 Degradación de 4-CF como única fuente de carbono y energía

El objetivo del presente estudio es analizar la influencia de la bioaumentación del licor mezcla con *P. putida* para el tratamiento de 4-CF como único sustrato mediante un sistema SBR. En la Fig. 6.32 se muestra la evolución de la concentración de 4-CF durante la etapa aerobia en el SBR no bioaumentado (a) y bioaumentado (b). El tratamiento de 4-CF como única fuente de carbono y energía mediante el SBR-*P. putida* condujo a la inactivación de la cepa, por lo que no pudo degradarse mediante dicho sistema. En ambos reactores las concentraciones de 4-CF tras el llenado fueron las esperadas por lo que el tóxico no se degradó durante la etapa de llenado anóxico. Las concentraciones máximas tratables en el SBR-lodo bioaumentado fueron notablemente superiores a las del SBR-licor mezcla, por lo que la adición de la cepa confiere al SBR una resistencia mayor a valores elevados de toxicidad. En ambos reactores los perfiles obtenidos son claramente inhibitorios, por lo que se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Haldane cuyos parámetros de ajuste se resumen en la Tabla 6.3.

La evolución de la concentración de 4-CF obtenida en ambos reactores muestra diferencias significativas, ya que en el SBR-licor mezcla los perfiles más lineales indican que las velocidades de eliminación son constantes a lo largo del proceso degradativo. Mientras que en el SBR-lodo bioaumentado los perfiles cóncavos indican que la velocidad de degradación aumenta a medida que la concentración de 4-CF se reduce, alcanzando mayores velocidades al final del proceso.

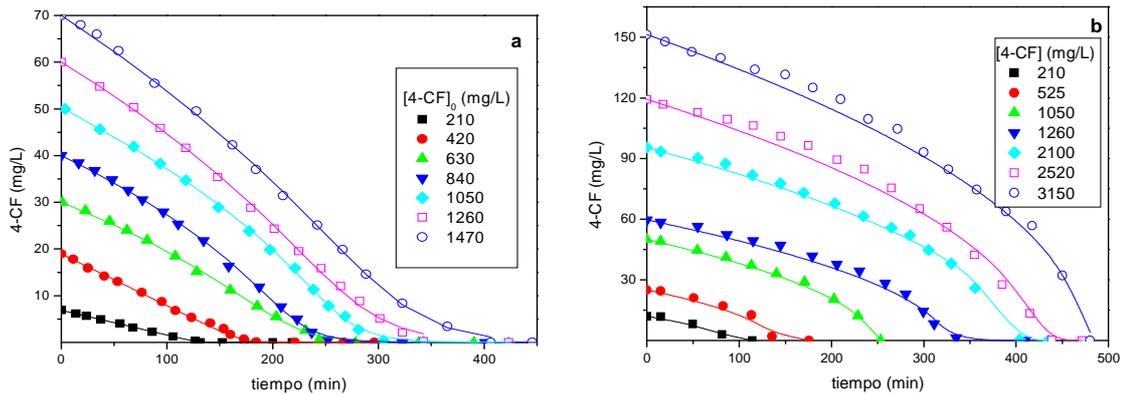


Fig. 6.32. Evolución de la concentración de 4-CF experimental (símbolos) y de los ajustes (líneas) durante la etapa aerobia en el SBR-licor mezcla (a) y SBR-lodo bioaumentado (b).

Los valores de K_I obtenidos en el caso del SBR-licor mezcla decrecen al tratar mayores cargas de 4-CF debido al mayor efecto tóxico provocado por el aumento de la concentración de 4-CF en los influentes (Tabla 6.3). Sin embargo, en el SBR-lodo bioaumentado los valores de K_I muestran una tendencia creciente, lo que sugiere una evolución de la aclimatación a lo largo de la experimentación. La integración de las colonias de *P. putida* en los flóculos del SBR-lodo bioaumentado podría mejorar las interacciones simbióticas entre el licor mezcla y la cepa, aumentando la capacidad de degradación de elevadas concentraciones de 4-CF.

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos obtenidos para la degradación de 4-CF en el SBR-licor mezcla y SBR-lodo bioaumentado.

SBR-licor mezcla					SBR-lodo bioaumentado				
4-CF (mg/L)	V_{max} (mg 4-CF/g SSV·min)	K_S (mg/L)	K_I (mg/L)	R^2	4-CF (mg/L)	V_{max} (mg 4-CF/g SSV·min)	K_S (mg/L)	K_I (mg/L)	R^2
210	0,059	0,115	47,427	0,999	210	0,344	1,116	1,115	0,997
525	0,128	0,638	136,780	0,999	525	0,591	1,279	1,577	0,993
630	0,675	15,857	5,283	0,999	1050	0,880	1,573	2,393	0,999
840	2,038	43,397	2,445	0,999	1260	1,101	1,533	2,315	0,997
1050	1,892	43,246	3,417	0,999	2100	1,514	2,166	3,504	0,999
1260	2,174	83,151	4,514	0,999	2520	1,590	1,990	4,424	0,998
1470	0,977	38,856	13,92	0,999	3150	2,912	2,239	4,575	0,999

En la Fig. 6.33 se observa que las velocidades iniciales de consumo de 4-CF tratando las mismas concentraciones del mismo son similares en ambos casos, sin embargo, las velocidades de degradación obtenidas al final del proceso en el SBR-lodo bioaumentado aumentan considerablemente respecto a las del SBR-licor mezcla. Lo cual redujo el tiempo requerido para degradar completamente el 4-CF (Fig. 6.33).

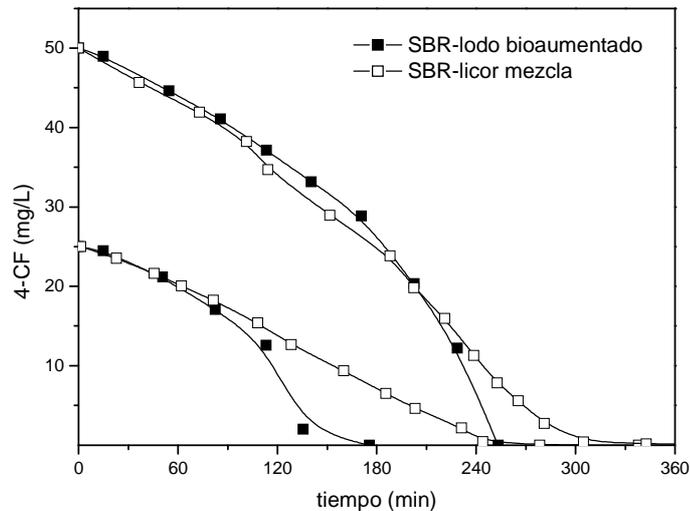


Fig. 6.33. Comparativa de la evolución de la concentración de 4-CF empleando SBR con y sin bioaumentación.

La evolución de las V_{max} específicas para cada una de las concentraciones de 4-CF muestra un aumento de la V_{max} específica de consumo de 4-CF al aumentar la concentración de 4-CF tratada en ambos reactores (Fig. 6.34). Aunque no se observaron diferencias significativas entre las V_{max} específicas obtenidas en ambos reactores, la adición de la cepa permitió tratar eficazmente mayores concentraciones del tóxico

manteniendo elevadas eficacias de eliminación. Las mejoras del proceso degradativo obtenidas en el SBR-lodo bioaumentado se deben a que la cepa fue eficazmente retenida en el SBR gracias a su capacidad de floculación e integración en los flóculos del fango activo. En el caso del SBR-licor mezcla, el tratamiento de concentraciones mayores de 1.470 mg/L provocó una drástica caída de la eficacia del sistema y la completa desestabilización del mismo.

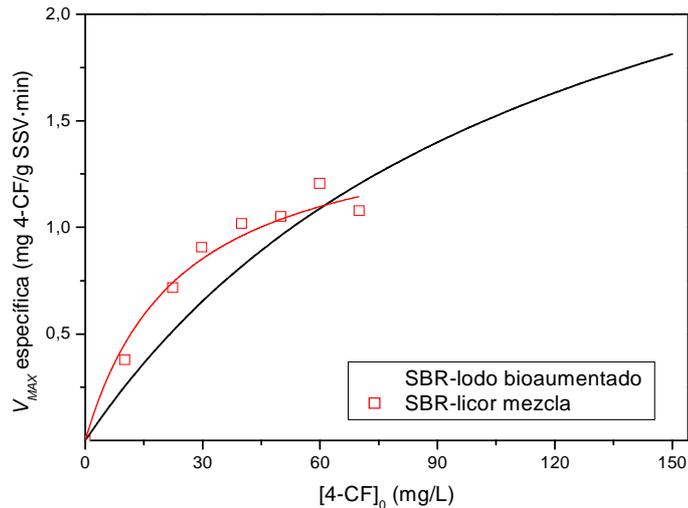


Fig. 6.34. V_{max} específica de consumo tratando diferentes concentraciones de 4-CF mediante SBR con y sin bioaumentación.

En las condiciones de operación empleadas, las V_{max} específicas alcanzadas para distintas concentraciones de 4-CF pueden ajustarse adecuadamente según las siguientes expresiones:

- SBR-lodo bioaumentado:

$$V_{MAX} \text{ específica} = \frac{(3,249 \pm 0,300) \cdot [4 - CF]_0}{(118,978 \pm 20,081) + [4 - CF]_0} \quad R^2 = 0,993 \quad [6.6]$$

- SBR-licor mezcla:

$$V_{MAX} \text{ específica} = \frac{(1,538 \pm 0,207) \cdot [4 - CF]_0}{(24,053 \pm 8,745) + [4 - CF]_0} \quad R^2 = 0,955 \quad [6.7]$$

VII. CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)

Are you ambitious?, Nigel Horan, Wakefield (2007)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El 4-CF presenta una elevada toxicidad, que provoca la inhibición de la actividad del fango activo aerobio. Debido a la inactivación de la biomasa se requieren largos períodos de aclimatación para degradar parcialmente dicho compuesto.
2. La utilización de biomasa aclimatada, así como la adición de cosustratos, mejora notablemente la capacidad de adaptación, aumenta la velocidad de degradación y permite el tratamiento de concentraciones elevadas de 4-CF, aumentando el grado de mineralización del mismo.
3. Las velocidades de degradación de fenol y 4-CF aumentan significativamente con la temperatura dentro del intervalo estudiado (20 - 35 °C), llegando a triplicarse en el caso del 4-CF. Del mismo modo, el aumento de la temperatura permitió incrementar la carga de 4-CF tratable hasta 80 mg 4-CF/g SSV·d, mejorar la sedimentabilidad del lodo y reducir la ecotoxicidad de los efluentes. La degradación cometabólica de 4-CF solamente resultó posible durante la etapa de reacción aerobia. La presencia de bajas concentraciones de 4-CF permitió la degradación de fenol en condiciones anóxicas.
4. La biomasa parcialmente granulada, obtenida al operar con una velocidad ascensional de aire de 0,5 cm/s, mostró tamaños de gránulos entre 100 μm y 2 mm. Los gránulos se asociaron mediante fibras de entre 2 y 5 μm de diámetro, distribuidas paralelamente en multicapas. Esta estructura confirió a la biomasa una buena sedimentabilidad (IVF \approx 43,5 mL/g) y una alta estabilidad ante la toxicidad del 4-CF, pudiéndose tratar una carga de 584 mg 4-CF/g SSV·d. El grado de mineralización conseguido con este sistema fue mayor que con lodo floculento convencional, lográndose reducir el COT refractario hasta 7 mg/L.
5. Los adsorbentes preparados a partir de biosólidos de EDAR presentaron características químicas y estructurales muy diferentes en función del método empleado. Las capacidades máximas de adsorción de 4-CF se sitúan entre 82 y 362 mg 4-CF/g para el biosólido seco y activado con KOH, respectivamente. La carbonización simple de los biosólidos permitió obtener materiales con áreas BET en torno a 44 m^2/g , lo que conduce a un aumento sustancial de la capacidad de adsorción con respecto a la de los biosólidos secos. Aunque mediante la gasificación parcial con aire de los carbonizados

se alcanzaron áreas BET próximas a $340 \text{ m}^2/\text{g}$, las capacidades de adsorción de 4-CF resultaron similares. Los materiales obtenidos por activación química con KOH arrojaron áreas de hasta $1.832 \text{ m}^2/\text{g}$, mientras que la activación física condujo a valores de superficie específica no superiores a $100 \text{ m}^2/\text{g}$. A pesar de estas notables diferencias, las capacidades de adsorción de 4-CF de ambos materiales resultaron muy similares. Los materiales obtenidos por gasificación parcial con aire resultan especialmente atractivos, por ser un método de preparación económico, medioambientalmente aceptable y que proporciona buenas capacidades de adsorción.

6. El empleo de biosólidos pirolizados como soporte en SBR permitió el desarrollo de una biopelícula con un espesor inferior a $150 \mu\text{m}$, lo cual favorece la difusión de sustrato, nutrientes y oxígeno al interior de la misma, alcanzándose elevadas velocidades específicas de degradación de 4-CF. La adición de carbón activo comercial condujo a la formación de agregados más compactos de hasta $300 \mu\text{m}$, constituyendo un sistema con mayor resistencia al choque tóxico. La formación de estos agregados mejoró notablemente la sedimentabilidad del lodo, alcanzándose valores de IVF en torno a 30 y 120 mL/g para los sistemas SBBR con carbón activo y biosólidos pirolizados, respectivamente.
7. La utilización de soportes adsorbentes redujo sensiblemente el período de aclimatación y puesta en marcha del SBR, lo que permitió procesar una concentración de 4-CF tres veces mayor a la tratable durante la puesta en marcha del SBR con biomasa floculenta. Se consiguió, así, aumentar la carga de 4-CF tratable hasta $653 \text{ mg 4-CF/g SSV}\cdot\text{d}$, alcanzándose una concentración de 170 mg/L en el interior del reactor. A pesar de que el 4-CF se eliminó mayoritariamente durante la etapa aerobia, en ambos sistemas SBBR fue parcialmente degradado en condiciones anóxicas, lo cual puede deberse al desarrollo de nichos anóxicos en el interior de los agregados.
8. *Comamonas testosteroni* y *Pseudomonas putida* mostraron una elevada capacidad para eliminar fenol. Mediante *P. putida* se alcanzaron mayores rendimientos y velocidades de degradación, llegándose a tratar eficazmente concentraciones de hasta 550 mg/L . La presencia de 4-CF como único sustrato provocó una fuerte inhibición de ambas cepas, impidiendo la degradación del mismo. Tras su aclimatación a fenol o a mezclas de fenol y 4-CF, los rendimientos de eliminación aumentaron significativamente alcanzándose velocidades específicas medias de degradación de $0,9 \text{ mg 4-CF/mg SSV}\cdot\text{h}$ con *P.*

putida. Dicho valor se duplicó durante la degradación cometabólica de 4-CF con fenol o glucosa empleando una concentración de los mismos equivalente a 690 mg DQO/L. La evolución de la concentración de 4-CF mostró dos fases durante el consumo diáuxico con fenol, ya que una vez que el fenol ha sido degradado en su práctica totalidad, la velocidad de degradación de 4-CF aumenta notablemente. La adición de glucosa redujo la etapa de latencia, alcanzándose velocidades específicas iniciales de degradación de 4-CF diez veces mayores que en el caso del fenol. La utilización simultánea de ambos cosustratos durante el tratamiento de 4-CF con *C. testosteroni* mostró que el empleo de sistemas multisustrato fenol/glucosa/4-CF permite triplicar la velocidad específica media de degradación de 4-CF observada con dichos cosustratos individualmente.

La bioaumentación con *P. putida* de reactores biológicos debe realizarse utilizando cepa adaptada a la presencia de fenol y/o 4-CF, ya que de este modo las velocidades de consumo cometabólico de ambos compuestos mejoran significativamente. La elevada supervivencia de la cepa y la posible transferencia genética entre ésta y los microorganismos del fango activo, generando transconjugados con una elevada capacidad degradativa, confirió al SBR una mayor resistencia a altas cargas tóxicas. La presencia en el medio de 4-CF propició que *P. putida* formase agregados de entre 1 y 2 mm, con una evolución de la forma celular de bacilos a cocos, llegando a formar colonias esféricas en el sistema SBR bioaumentado.

The results presented in this work support the following conclusions:

1. The high toxicity showed by 4-CP caused a remarkable inhibition of the aerobic activated sludge. Due to the inactivation of the biomass, long acclimation periods are needed to achieve partial removal of 4-CP.
2. The acclimation of the biomass and the addition of cosubstrates led to a significant enhancement of the adaptation capacity of the activated sludge, increasing the 4-CP removal rate, the maximum treatable 4-CP concentrations and the extension of mineralization of this toxicant.
3. The phenol and 4-CP removal rates greatly increased with temperature within the range tested (10 - 35 °C), especially in the case of 4-CP, where a threefold increase was observed. Similarly, the increase of temperature allowed to increase the 4-CP loading rate up to 80 mg 4-CP/g VSS·d, as well as improve the sludge settleability and reduce the ecotoxicity of the resulting effluents. The cometabolic degradation of 4-CP was only possible during the aerobic stage. A significant phenol removal was observed during the anoxic filling stage at low 4-CP concentrations.
4. The partially granular biomass developed at superficial air upflow velocity of 0.5 cm/s showed a size range of 0.1 - 2 mm. These granules built associations by means of parallel fibres of 2 - 5 µm diameter distributed in multilayers. This structure gives rise to a biomass with a high settleability (SVI \approx 43.5 mL/g) and stability versus the toxicity of 4-CP, treating 4-CP loads up to 584 mg 4-CP/g VSS·d. The mineralization achieved with this system was higher than that obtained with conventional flocculent sludge, being the refractory TOC reduced below 7 mg/L.
5. The adsorbents obtained from sewage sludge showed fairly different chemical and textural properties, depending on the preparation method. The resulting carbonaceous materials showed maximum 4-CP adsorption capacities of 82 and 362 mg 4-CP/g, for the dried sewage sludge and KOH-activated material, respectively. The carbonization of the biosolids allowed to obtain materials with BET surface areas around 44 m²/g, which led to a substantial increase of the adsorption capacity in comparison with the dried biosolids used as precursor. In spite of the fact that the materials from air gasification of the pyrolytic char reached values of BET surface areas about 340 m²/g, both showed similar adsorption capacities for 4-CP. Whilst the materials obtained by chemical activation with KOH showed BET surface areas up to 1832 m²/g, physical activation

led to materials with BET areas lower than 100 m²/g. Nevertheless, both materials showed similar 4-CP adsorption capacities. Thus, air-activation can be viewed as a simple, economical and environmentally friendly way of valorisation of sewage sludge biosolids to inexpensive activated carbons with good adsorption capacities.

6. The use of pyrolyzed biosolids as biomass carrier in SBR allowed developing a biofilm narrower than 150 µm, which facilitates the diffusion of substrate, nutrients and oxygen thus leading to high specific 4-CP removal rates. The use of activated carbon allowed the formation of larger ($\varnothing \leq 300$ µm) and more compact aggregates leading to a more stable system under severely toxic conditions. The formation of these aggregates greatly improved the sludge settleability, reaching SVI values about 30 and 120 mL/g for the SBBR with activated carbon and pyrolyzed biosolids, respectively.
7. The use of adsorptive carriers reduced the acclimation and start-up times of the SBR, which allowed to treat a 4-CP concentration three times higher than that treatable during the start-up of SBR with conventional flocculent biomass. In addition, the 4-CP loading rate was increased up to 653 mg 4-CP/g VSS·d, reaching a 4-CP concentration of 170 mg/L in the reactor. 4-CP was majorly removed during the aerobic stage. However, it was partially removed under anoxic conditions in both SBBR, which could be due to the development of anoxic niches inside the aggregates.
8. *Comamonas testosteroni* and *Pseudomonas putida* showed a high capacity for phenol removal. Higher efficiencies and rates were obtained with *P. putida*, which allowed treating 550 mg/L of phenol efficiently. The presence of 4-CP as sole substrate caused a high inhibition effect on both strains, which hindered its degradation. After their acclimation to the presence of phenol or mixtures of phenol/4-CP, the removal efficiencies increased significantly, reaching average specific removal rates of 0.9 mg 4-CP/mg VSS·h with *P. putida*. This rate was doubled when 4-CP was cometabolized in presence of 690 mg COD/L of phenol or glucose. The time-evolution of the 4-CP concentration during its diauxic consumption with phenol showed two stages, since when phenol was almost depleted a noticeable increase of the 4-CP removal rate was observed. The addition of glucose reduced the lag time, reaching initial specific 4-CP removal rates ten times higher than with phenol. Under the simultaneous addition of both cosubstrates for the treatment of 4-CP by *C. testosteroni* in a ternary medium the average specific 4-CP removal rates were triple of those with such cosubstrates added separately.

The bioaugmentation of biological reactors with previously adapted *P. putida* to phenol and/or 4-CP increased the consumption rates of both compounds. The high survival of the strain and a possible genetic transference with the microorganisms contained in the activated sludge make the SBR a more stable system to highly toxicity loads. The presence of 4-CP caused the formation of *P. putida* aggregates of 1 - 2.0 mm. The cell morphology also varied from bacillus to coccus, which led to spherical colonies in the bioaugmented SBR.

VIII. NOMENCLATURA

4-CF	4-Clorofenol
BP	Biosólido pirolizado
<i>C. testosteroni</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
CA	Carbón activo
c-hexanol	Ciclohexanol
COT	Carbono orgánico total
DQO	Demanda química de oxígeno
EC ₅₀	Concentración de extinción al 50%
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EPA	Environmental protection agency
F/M	Relación másica de sustrato y biomasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IVF	Índice volumétrico de fangos
K _{La}	Coefficiente volumétrico global de transferencia de oxígeno
OD	Oxígeno disuelto
OD [*]	Concentración de saturación de oxígeno
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Q _{in}	Caudal de entrada
Q _{out}	Caudal de salida
S	Concentración de sustrato
SBBR	Sequencing batch biofilm reactor
SBBR	Sequencing batch biofilm reactor
SBR	Sequencing batch reactor
SBR-licor mezcla	SBR inoculado con fango activo

SBR-lodo bioaumentado	SBR inoculado con fango activo bioaumentado con <i>P. putida</i>
SBR- <i>P. putida</i>	SBR inoculado con <i>P. putida</i>
SEM	Scanning electron microscopy
S_{in}	Concentración de sustrato en la entrada
S_{out}	Concentración de sustrato en la salida
T	Temperatura
t_{HR}	Tiempo de residencia hidráulico
TPD	Temperature programmed desorption
UV	Ultravioleta
VECO	Velocidad específica de consumo de oxígeno
V_I	Velocidad específica inicial de degradación
V_L	Volumen de líquido
X	Concentración de biomasa
Θ	Tiempo medio de residencia celular

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abe K., Tanaka K., 1996. Degradation of phenol, asulam and lignin in aqueous solution by ozonation. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 54, 187-193.
- Abuhamed T., Bayraktar E., Mehmetoglu T., Mehmetoglu U., 2004. Kinetic model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 39, 983-988.
- Adav S.S., Lee D-J., Ren N.Q., 2007a. Biodegradation of pyridine using granules in the presence of phenol. *Water Research*, 41, 2903-2910.
- Adav S.S., Chen M-Y., Lee D-J., Ren N-Q., 2007b. Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 5, 844-852.
- Admassu W., Korus R.A., 1996. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In *Bioremediation Principles and Applications*. University Press: Cambridge, UK., 14-31.
- Ahmaruzzaman Md., 2008. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 143, 48-67.
- Aksu Z., Kutsal T., Gün S., Haciosmanoglu N., Gholaminejad M., 1991. Investigation of biosorption of Cu (II), Ni (II) and Cr (VI) ions to activated sludge bacteria. *Environmental Technology*, 12, 915-921.
- Aksu Z., Yener J., 2001. A comparative adsorption/biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents. *Waste Management*, 21, 695-702.
- Alaerts G.J., Jitjaturunt V., Kelderman P., 1989. Use of coconut shell-based activated carbon for chromium (VI) removal. *Water Science and Technology*, 21 (12), 1701-1704.
- Alexander M., 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, Inc.; San Diego, CA, 177-195 y 226-247.
- Allsop P.J., Chisti Y., Moo-Young M., Sullivan G.R., 1993. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology Bioengineering*, 41, 572-580.
- Amabile-Cuevas C.F., Chicurel M.E., 1996. A possible role for plasmids in mediating the cell-cell proximity required for gene flux. *Journal of Theoretical Biology*, 181, 237-243.

- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta, R. 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53, 51-59.
- Annachatre A.P. y Gheewala S.H., 1996. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*, 14, 35-56.
- Annadurai G., Juang R-S., Lee D-J., 2002. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. *Waste Management*, 22, 703-710.
- Arai H., Akahira S., Ohishi T., Maeda M., Kudo T., 1998. Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology*, 144, 2895-2903.
- Armenante P.M., Colella L.S., Kafkewitz D., Larkin M.J., 1996. Effect of a biofilm on the adsorption of 4-chlorophenol on activated carbon. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 46, 667-672.
- Arnold E., Bohm B., Wilderer P.A., 2000. Application of activated sludge and biofilm sequencing batch reactor technology to treat reject water from sludge dewatering systems: a comparison. *Water Science and Technology*, 41 (1), 115-122.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A., Garrido J.M., Méndez R., 2004. Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Research*, 38, 3389-3399.
- Atlas R.M., 1988. *Microbiology: fundamentals and applications*. 2nd Edition, McMillan, 643.
- Azzam M.O., Al-Tarazi M., Tahboub Y., 2000. Anodic destruction of 4-chlorophenol solution. *Journal of Hazardous Materials*, 75, 99-113.
- Bae H.S., Lee J.M., Kim Y.B., Lee S-T., 1996. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*, 7, 463-469.
- Bae H.S., Rhee S.K., Cho Y.G., Hong J.K., Lee S.T., 1997a. Two different pathways (a chlorocatechol and a hydroquinone pathway) for the 4-chlorophenol degradation in two isolated bacterial strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 237-241.
- Bae, H.S., Lee, J.M., Kim, Y.B., Lee, S-T., 1997b. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*, 7, 463-469.

- Bae H.S., Yamagishi T., Suwa Y., 2002. Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology*, 148, 221-227.
- Bagreev A., Bandosz T.J., Locke D.C., 2001. H₂S adsorption/oxidation on unmodified activated carbons: importance of prehumidification. *Carbon*, 39, 2303-2311.
- Bagreev A., Bandosz T.J., 2002. H₂S adsorption/oxidation on materials obtained using sulphuric acid activation of sewage sludge-derived fertilizer. *J. Colloid Interface Science*, 252, 188-194.
- Baillo C.R., Faith B.M., Masi O., 1982. Fate of specific pollutants during wet oxidation and ozonation. *Environmental Progress*, 1, 217-227.
- Bajaj M., Gallert C., Winter J., 2008. Anaerobic biodegradation of high strength 2-chlorophenol-containing synthetic wastewater in a fixed bed reactor. *Chemosphere*, 73, 705-710.
- Bak F., Widdel F., 1986. Anaerobic degradation of phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. *Archives of Microbiology*, 146, 177-180.
- Balfanz J., Rehm H.J., 1991. Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A7-2 in soil. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 35, 662-668.
- Bali U., Sengül F., 2002. Performance of a fed-batch reactor treating a wastewater containing 4-chlorophenol. *Process Biochemistry*, 37, 1317-1323.
- Bali U., Sengül F., 2003. The fate and effect of 4-chlorophenol in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *Process Biochemistry*, 38, 1201-1208.
- Bansal R.C., Donnet J.B., Stoeckli F., 1988. *Active carbon*. Marcel Dekker, INC.
- Basu S. K., Oleszkiewicz J. A., 1995. Factors affecting aerobic biodegradation of 2-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Environmental Technology*, 16 (12), 1135-43.
- Bathe S., 2004. Conjugal transfer of plasmid pNB2 to activated sludge bacteria leads to 3-chloroaniline degradation in enrichment cultures. *Lett. Applied Microbiology*, 38, 527-531.
- Bathe S., Schwarzenbeck N., Hausner M., 2005. Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2. *Lett. Applied Microbiology*, 41, 242-247.

- Belanger D., Bergevin P., Lapierre J., Zaloum R., 1986. Conception, control and efficiency of a sequencing batch reactor for the purification of wastewater from a slaughterhouse. *Science Technology Eau*, 19, 142.
- Benaddi H., Legras D., Rouzaud J.N., Beguin F., 1998. Influence of the atmosphere in the chemical activation of wood by phosphoric acid. *Carbon*, 36, 306.
- Benítez F.J., Beltrán-Heredia J., Acero J.L., Rubio F.J., 2000. Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation processes. *Chemosphere*, 41, 1271-1277.
- Benítez F.J., Acero J.L., Real F.J., Garcia J., 2003. Kinetics of pentachlorophenol ozonation. Abstracts of Papers, 226th ACS National Meeting, New York, United States, September 7-13.
- Berestovskaya Y.Y., Ignatov V.V., Markina L.N., Kamenev A. A. y Makarov O.E., 1995. Degradation of *ortho*-chlorophenol, *para*-chlorophenol, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by the bacterial community of anaerobic sludge, *Microbiology*, 69, 397-400.
- Beristain-Cardoso R., Texier A-C., Alpuche-Solís Á., Gómez J., Razo-Flores E., 2009. Phenol and sulfite oxidation in a denitrifying biofilm reactor and its microbial community analysis. *Process Biochemistry*, 44, 23-28.
- Betancur M.J., Moreno J., Buitrón G., 2004. Event-driven control for treating toxicants in aerobic sequencing batch bioreactors. Proceedings of the 9th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB9), Nancy, France, 457-468.
- Betancur M.J., Moreno J.A., Moreno-Andrade I., Buitrón G., 2006. Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *Int. J. Robust Nonlinear Control*, 16, 173-190.
- Beun J.J., Hendriks A., Van Loosdrecht M.C.M., Morgenroth E., Wilderer P.A., Heijnen J.J., 1999. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 33, 10, 2283-2290.
- Bjornsson L., Mattiasson B., Welander T., 1997. Supports made from recycled glass as biofilm carriers in anaerobic packed bed treatment of high-strength wastewaters. *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 243-256.

- Boller M., Gujer W., 1985. Nitrification in tertiary trickling filters followed by deep-bed filters. *Water Research*, 20, 1363-1373.
- Boon N., Goris J., De Vos P., Verstraete W., Top E.M., 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Environmental Microbiology*, 66, 2906-2913.
- Boopathy R., 1995. Isolation and characterization of a phenol-degrading, sulphate-reducing bacterium from swine manure. *Bioresource Technology*, 54, 29-33.
- Bortone G., Malaspina F., Stante L., Tilche, A., 1994. Biological nitrogen and phosphorus removal in an anaerobic/anoxic sequencing batch reactor with separated biofilm nitrification. *Water Science and Technology*, 30, 303-313.
- Bossier P., Verstraete W., 1996. Triggers for microbial aggregation in activated sludge?. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 45, 1-6.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Wagner M., Deigenes P., Moletta R., 2000a. Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water Science and Technology*, 41, 61-68.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko P., Dore S., Deigenes J., Moletta P., Wagner M., 2000b. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2, 179-190.
- Boyd S.A., Shelton D.R., 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated alusge. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 2, 272-277.
- Bravo J.J., Giraldo S.A., Centeno A., Páez Mozo E., 1998. Catalizadores para purificación de aguas industriales que contengan compuestos resistentes a la biodegradación. *Monografías, Centro de Investigaciones en Catálisis, UIS, Colombia*, 259-264.
- Bridle T.R., Rovel J-M., 2003. *Pyrolysis and gasification of biomass and waste*. A.V. Bridgwater, UK.
- Brillas E., Sauleda R., Casado J., 1998. Degradation of 4-chlorophenol by anodic oxidation, electro-Fenton, photoelectron-Fenton, and peroxi-coagulation processes. *Journal of the Electrochemical Society*, 145, 759-765.
- Brinkmann U., Reineke W., 1992. Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of *meta*-pathway. *FEMS Microbiology Lett.*, 96, 81-88.

- Brunauer S., Deming L.S., Deming W.E., Teller E., 1940. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62, 1723-1732.
- Buitrón G., Capdeville B., 1995. Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculum. *Environmental Technology*, 16, 12, 1175-1184.
- Buitrón G., González A., 1996. Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds. *Water Science and Technology*, 34, 289-294.
- Buitrón G., González A., Lopez-Marin L.M., 1998. Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science and Technology*, 37 (4-5), 371-378.
- Buitrón G., Ortiz J., 1998. Biodegradation of phenolic compounds with a sequencing batch biofilter. *Proceedings of the Industrial Waste Conference*, 52, 263-269.
- Buitrón G., Soto G., Vite G., Moreno J., 2001. Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Water Science and Technology*, 43 (3), 283-290.
- Buitrón G., Melgoza R.M., Jimenez L., 2003. Pharmaceutical wastewater treatment using an anaerobic/aerobic sequencing batch biofilter. *J. Environ. Sci. and health. Part A, Toxic/hazardous substances and environmental engineering*, 38, 2077-88.
- Buitrón G., Moreno J., 2004. Modelling of the acclimation/deacclimation process of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*, 49, 1, 79-86.
- Buitrón G., Schoeb M.E., Moreno I., Moreno J.A., 2005. Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Research*, 39, 1015-1024.
- Caldeira M., Heald S.C., Carvalho M.F., Vasconcelos I., Bull A.T., Castro P.M.L., 1999. 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 52, 722-729.
- Calin C., Miron M., 1995. Future of the textile finishing industry in the year 2000. *Ind. Text (Bucharest)*, 46, 140.
- Calvo L., Mohedano A.F., Casas J.A., Gilarranz M.A., Rodríguez J.J., 2004. Treatment of chlorophenols-bearing wastewaters through hydrodechlorination using Pd/activated carbon catalysts. *Carbon* 42, 1377-1381.

- Calvo L., Gilarranz M.A., Casas J.A., Mohedano A.F., Rodríguez J.J., 2005. The role of oxygen surface groups in the hydrodechlorination activity of Pd/C catalysts. World Congress of Chemical Engineering, 7th, Glasgow, United Kingdom, July 10-14.
- Calvo L., Gilarranz M.A., Casas J.A., Mohedano A.F., Rodríguez J.J., 2006. Hydrodechlorination of 4-chlorophenol in aqueous phase using Pd/AC catalysts prepared with modified active carbon supports. *Applied Catalysis, B: Environmental* 67, 68-76.
- Canals-Batlle C., Ros A., Lillo-Rodenas M.A., Fuente E., Montes-Moran M.A., Martin M.J., Linares-Solano A., 2008. Carbonaceous adsorbents for NH₃ removal at room temperature. *Carbon*, 46, 176-178.
- Canto C.S.A., Ratusznei S.M., Rodrigues J.A.D., Zaiat M., Foresti E., 2008. Effect of ammonia load on efficiency of nitrogen removal in a SBBR with liquid-phase circulation. *Brazilian J. of Chemical Engineering*, 25, 275-289.
- Carini D., 1999. Treatment of industrial wastewater using chemical-biological sequencing batch biofilm reactor (SBBR) processes. Tesis doctoral, Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- Carpenter B.H., Wilson D.L., 1988. Technical/economic assessment of selected PCB decontamination processes. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 125-148.
- Carucci A., Milia S., De Gioannis G., Piredda M., 2008. Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology*, 58, 2, 309-315.
- Carucci A., Milia S., Cappai G., Muntoni A., 2010. A direct comparison amongst different technologies (aerobic granular sludge, SBR and MBR) for the treatment of wastewater contaminated by 4-chlorophenol. *Journal of Hazardous Materials*, 177, 119-1125.
- Carvalho M. F., Vasconcelos I., Bull A. T., Castro P. M. L., 2001. A GAC biofilm reactor for the continuous degradation of 4-chlorophenol: treatment efficiency and microbial analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 419-426.
- Cassidy D.P., Belia E., 2005. Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Water Research*, 39, 19, 4817-4823.

- Centi G., Perathoner S., Torre T., Verduna M.G., 2000. Catalytic wet oxidation with H_2O_2 of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneous Fenton-type catalysis. *Catalysis Today*, 55, 61-69.
- Chakraborty S., Veeramani H., 2006. Effect of HRT and recycle ratio on removal of cyanide, phenol, thiocyanate and ammonia in an anaerobic-anoxic-aerobic continuous system. *Process Biochemistry*, 41, 96-105.
- Chaliha S., Bhattacharayya K.G., 2008. Catalytic wet oxidation of 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol in water with Mn(II)-MCM41. *Chemical Engineering Journal*, 139, 575-588.
- Chamarro E., Marco A., Esplugas S., 2001. Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Research*, 35, 1047-1051.
- Chang C-N., Chen H.R., Huang C.H., Chao A., 2000. Using sequencing batch biofilm reactor (SBBR) to treat ABS wastewater. *Water Science and Technology*, 41 (4-5), 433-440.
- Characklis W.G., Marshall K.C., 1990. *Biofilms. Ecological and applied microbiology.* Wiley & Sons, New York.
- Chen B., Hui C.W., McKay G., 2001. Film-pore diffusion modelling for the sorption of metal ions from aqueous effluents onto peat. *Water Research*, 35, 3345-3356.
- Chen C.Y., Lu C.L., 2002. An analysis of the combined effects of organic toxicants. *Science of the Total Environment*, 289, 123-132.
- Chen X., Jeyaseelan S., Graham N., 2002. Physical and chemical properties study of the activated carbon made from sewage sludge. *Waste Management*, 22, 755-760.
- Chen Y., Jiang W., Liang D.T., Tay J.H., 2008. Aerobic granulation under the combined hydraulic and loading selection pressures. *Bioresource Technology*, 99, 7444-7449.
- Chen Y-X., Liu H., Chen H-L., 2003. Characterization of phenol biodegradation by *Comamonas testosteroni* ZD4-1 and *Pseudomonas aeruginosa* ZD4-3. *Biomedical and Environmental Sciences*, 16, 2, 163-72.
- Chiavola A., McSwain B.S., Irvine R.L., Boni M.R., Baciocchi R., 2003. Biodegradation of 3-Chlorophenol in a Sequencing Batch Reactor. *Journal of Environmental Science and Health*, A38 (10), 2113-2123.

- Chiavola A., Baciocchi R., Irvine R. L., Gavasci R., Sirini P., 2004. Aerobic biodegradation of 3-chlorophenol in a sequencing batch reactor: effect of cometabolism. *Water Science and Technology*, 50 (10), 235-242.
- Chozick R., Irvine R.L., 1991. Preliminary studies on the granular activated carbon sequencing batch biofilm reactor. *Environmental Progress*, 10, 282-289.
- Cocci A.A., McCarthy P.J., Almost S., 1998. Sequencing batch reactors in the pulp and paper industry. A bench-marking study. *Proceedings of the 1998 Environmental Conference*, 3, 1203.
- Collins G., Foy C., McHugh S., O'Flaherty V., 2005. Anaerobic treatment of 2,4,6-trichlorophenol in an expanded granular sludge bed-anaerobic filter (EGSB-AF) bioreactor at 15°C. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53, 167.
- Costerton J.W., 1999, Introduction to biofilms, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217-221.
- Cotoruelo L.M., Marqués M.D., Rodríguez-Mirasol J., Cordero T., Rodríguez J.J., 2007b. Adsorption of aromatic compounds on activated carbons from lignin: equilibrium and thermodynamic study, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46, 4982-4990.
- Criddle C.S., 1993. The kinetics of cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1048-1056.
- Cunningham A.B., Characklis W.G., Abedeen F., Crawford D., 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environmental Science and Technology*, 25 (7), 1305-11.
- Dapaah S., Hill G., 1992. Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1353-1358.
- De Bruin L.M.M., de Kreuk M.K., van der Roest H.F.R., Uijterlinde C., van Loosdrecht M.C.M., 2004. Aerobic granular sludge technology: and alternative to activated sludge. *Water Science and Technology*, 49, 11-12, 1-7.
- De Kreuk, M.K., Bruin L.M.M., van Loosdrecht M.C.M., 2004. Aerobic granular sludge: From idea to pilot plant. In Wilderer, P.A. (Ed.), *Granules 2004. IWA Workshop Aerobic Granular Sludge, Technical University of Munich, 26-28 September 2004*, 1-12.

- De Kreuk M.K., McSwain B.S., Bathe S., Tay S.T.L., Schwarzenbeck, Wilderer P.A., 2005. Discussion outcomes. Ede. In: Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series. IWA Publishing. Munich, 165-169.
- Del Pino M. P. y Zirk W. E., 1982. Temperature effects on biological treatment of petrochemical wastewater. Environmental Progress, 1 (2), 104-110.
- Derylo-Marczewska A., Swiatkowski A., Biniak S., Walczyk M., 2008. Effect of properties of chemically modified activated carbon and aromatic adsorbate molecule on adsorption from liquid phase. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 327, 1-8.
- Di Iaconi C., Bonemazzi F., Lopez A., Ramadori R., 2004. Integration of chemicals and biological oxidation in a SBBR for tannery wastewater treatment. Water Science and Technology, 50 (10), 107-114.
- Díaz E., Casas J.A., Mohedano A.F., Calvo L., Gilarranz M.A., Rodríguez J.J., 2008. Kinetics of the hydrodechlorination of 4-Chlorophenol in water using Pd, Pt and Rh/Al₂O₃ catalysts. Industrial Engineering Chemistry Research, 47, 3840-3846.
- Directiva 80/68/EEC sobre la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por ciertas sustancias peligrosas.
- Directiva del consejo 91/271/CE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE 135/L, de 30/05/91.
- Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DOCE 330/33/L, de 5/12/98.
- Directiva 2006/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 15 de febrero de 2006, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.
- Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 12 de diciembre de 2006, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro.
- Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE,

- 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Doellerer J., Wilderer P.A., 1995. Reinigung von Bruedenkondensaten aus der Klaerschlammtrocknung durch Einsatz des Sequencing-batch-biofilm-reaktorverfahrens. *Korrespondenz Abwasser*, 1, 69-73
- Doellerer J., Wilderer P.A., 1996. Biological treatment of leachates from hazardous waste landfills using SBBR technology. *Water Science and Technology*, 34 (7-8), 437-444.
- Doke J., Adhyapak U., Kalyan V., 2004. Application of moving bed biofilm reactor for removal of 2-chlorophenol from wastewaters. *Nature*, 3, 519-522.
- Droste R.L., Kennedy K.J., Lu J.G., Lentz M., 1998. Removal of chlorinated phenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Science and Technology*, 38 (8-9), 359-367.
- Edgehill R.U., Finn R.K., 1983. Activated sludge treatment of synthetic waste water containing pentachlorophenol. *Biotechnology Bioengineering*, 25, 2165-2176.
- Ehrhardt H.M., Rehm H.J., 1989. Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon. *Applied Microbiology Biotechnology*, 30, 312.
- Eker S., Kargi F., 2006. Impacts of COD and DCP loading rates on biological treatment of 2,4-dichlorophenol (DCP) containing wastewater in a perforated tubes biofilm reactor. *Chemosphere*, 64, 1609-1617.
- El-Hendawy A-N. A., 2005. Surface and adsorptive properties of carbons prepared from biomass. *Applied Surface Science*, 252, 287-295.
- Ellis T.G., Barbeau D.S., Smets B.F., Grady Jr. C.P.L., 1996. Respirometric technique for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation. *Water Environmental Research*, 68, 917-926.
- Ellis T.G., Smets B.F., Magbauna B.S. Jr, Grady C.P.L. Jr, 1996. Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Science and Technology*, 34, 35-42.
- Erb R.W., Eichner C.A., Wagner-Döbler I., Timmis K.N., 1997. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by genetically designed *Pseudomonas*. *Natural Biotechnology*, 15, 378-382.

- Esplugas S., Jiménez J., Contreras S., Pascual E., Rodríguez M., 2002. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Research*, 36, 1034-1042.
- Fakhruddin A.N.M., Quilty B., 2005. The influence of glucose and fructose on the degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1541-1548.
- Fakhruddin A.N.M., Quilty B., 2007. Measurement of the growth of floc forming bacterium *Pseudomonas putida* CP1. *Biodegradation*, 18, 189-197.
- Fang H.H.P., Yeong, C.L.Y., Book, K.M., Chiu, CM., 1993. Removal of COD and nitrogen in wastewater using sequencing batch reactor with fibrous packing. *Water Science and Technology*, 28 (7), 125-131.
- Fang H.H.P., Ling J.W.C, 1995. Removal of nitrogen and phosphorus in batch reactors with fibrous packing. *Bioresource Technology*, 53, 141-145.
- Farabegoli G., Chiavola A., Rolle E., 2008. Remediation of chlorophenol- and phenol-contaminated groundwater by a sequencing batch biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 58 (2), 295-301.
- Farhadian M., Duchez D., Vachelard C., Larroche C., 2008. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors - A review. *Water Research*, 42, 1325-1341.
- Farrel A., Quilty B., 1999. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a *meta*-cleave pathway. *Biodegradation*, 10, 353-362.
- Farrel A, Quilty B., 2002a. The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Research*, 36, 2443-2450.
- Farrel A, Quilty B., 2002b. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *Microbiology and Biotechnology*, 28, 316-324.
- Fava F., Armenante P.M., Kafkewitz D., Marchetti L., 1995. Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 43, 633-657.
- Feist C.F., Hegeman G.D., 1969. Phenol and Benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriology*, 100, 2, 869-877.
- Felis V., De Bellefon C., Fouilloux P., Schweich D., 1999. Hydrodechlorination and hydrodearomatization of monoaromatic chlorophenols into cyclohexanol on Ru/C

- catalysts applied to water depollution: influence of the basis solvent and kinetics of the reactions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37, 91.
- Field J. A., Sierra-Alvarez R., 2007. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Environmental Science and Biotechnology*, 7, 211-241.
- Finkel'shtein Z. I., Baskunov B. P., Golovlev E. L., Moisseva O. V., Vervoort J., Rietjens I., Golovleva L.A., 2000. Dependence of the conversion of chlorophenols by *Rhodococci* on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology*, 69, 40-47.
- Fitch M.W., Weisman D., Phelps P., Georgiou G., Speitel G.E., 1996. Trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* 0B3B mutants in a sequencing biofilm reactor. *Water Research*, 30, 2655-2664.
- Folgueras M.B., Díaz R.M., Xilberta J., Prieto I., 2003. Volatilisation of trace elements for coal–sewage sludge blends during their combustion. *Fuel*, 82, 1939-1948.
- Franta J., Wilderer P.A., 1997. Biological treatment of papermill wastewater by sequencing batch reactor technology to reduce residual organics. *Water Science and Technology*, 35 (1), 129-136.
- Furness D.T., Hoggett L.A., Judd S.J., 2000. Thermochemical treatment of sewage sludge. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 14, 57-65.
- Galindez-Mayer J., Ramon-Gallegos J., Ruiz-Ordaz N., Juarez-Ramirez C.; Salmeron-Alcocer A., Poggi-Varaldo H.M., 2008. Phenol and chlorophenol biodegradation by yeast *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 147-157.
- Gallizia I., McClean. S, Banat I., 2003. Bacterial Biodegradation of phenol and 2,4-dichlorophenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 959–963
- Ganesh R., Balaji G., Ramanujam R.A., 2005. Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor-Respirometric assessment. *Bioresource Technology*, 97, 1815-1821.
- Gaofeng W., Hong X., Mei J., 2004. Biodegradation of chlorophenols: a review. *Chemical Journal on Internet*, 6, 10-67.

- García-Molina V., Barcardit J., Kallas J., Esplugas S., 2006. Kinetics of wet oxidation reactions. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 9, 20-26.
- García-Molina V., Kallas J., Esplugas S., 2007. Wet oxidation of 4-chlorophenol, Kinetic study. *Chemical Engineering Journal*, 126, 59-65.
- Garrido J., Linares-Solano A., Martín-Martínez J.M., Molina-Sabio M., Rodríguez-Reinoso F., Torregrosa R., 1987. The effect of gasification by air (623 K) or CO₂ (1098 K) in the development of microporosity in activated carbons. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 83, 1081-1088.
- Garzon-Zuniga M.A., Gonzalez-Martinez S., 1996. Biological phosphate and nitrogen removal in a biofilm sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 34 (1-2), 293-301.
- Gascó G., Méndez A. y Gascó J.M., 2005. Preparation of carbon-based adsorbents from sewage sludge pyrolysis to remove metals from water. *Desalination*, 180, 245-251.
- Genthner B.R.S., Price W.A. y Pritchard P.H., 1989. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 1466-1471.
- Gharaibew S.H., Abu-el-Shar W.Y., Al-Kofahi M.M., 1998. Removal of selected heavy metals from aqueous solutions using processed solid residue of olive mill products. *Water Research*, 32, 498-502.
- Ghatbandhe A.S., Yenkie M.K.N., 2008. 2,4 dichlorophenol (2,4-DCP) sorption from aqueous solution using granular activated carbon and polymeric adsorbents and studies on effect of temperature on activated carbon adsorption. *Environmental Science and Engineering*, 50, 163-168.
- Glaze W. H., Kang J. W., 1989. Advanced oxidation processes. Description of a kinetic model for the oxidation of hazardous materials in aqueous media with ozone and hydrogen peroxide in a semibatch reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 28, 1573-1580.
- Gloyna Earnest F., Li L., 1995. Supercritical water oxidation research and development uptake. *Environmental Progress*, 14, 182.
- Gómez-Serrano V., Valenzuela-Calahorra C., Pastor-Villegas J., 1993. Characterization of rockrose wood, char and activated carbon. *Biomass Bioenergy*, 4, 355-364.

- Gómez-Serrano V, Pastor-Villegas J, Durán-Valle C.J., Valenzuela-Calahorro C., 1996. Heat treatment of rockrose char in air. Effect on surface chemistry and porous texture. *Carbon*, 34, 533-538.
- Gonzalez G., Herrera G., 1995. Biodegradation of phenol by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Acta Microbiologica Polonica*, 44, 285-296.
- González G., Herrera M. G., García M. T., Pena M. M., 2000. Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactors. *Bioresource Technology*, 76, 245-251.
- Gonzalez G., Herrera G., García M.T., Peña M., 2001. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*, 80, 137-142.
- González Serrano E., Cordero T., Rodríguez Mirasol J., Rodríguez J.J., 1997. Development of porosity upon chemical activation of kraft lignin with $ZnCl_2$. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 36, 4832-4838.
- Gonzalez-Martinez, S., Wilderer, P.A., 1991. Phosphate removal in a biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 23, 1405-1415.
- Gottschalk G., 1986. *Bacterial Metabolism*. 2nd ed. Springer-Verlag, Inc., New York.
- Gulerman S. y Dilek C. F., 1990. Effects of temperature, pH and DO concentration on settleability of activated sludge. *Environmental Technology*, 11 (3), 205-212.
- Haigler B.E., Nishino S.F., Spain J.C., 1988. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas sp.* *Appl. Environmental Microbiology*, 54, 294-301.
- Hajji K.T., Lepine F., Bisaillon J.G., Beauder R., Hawari R., Guiot S.R., 2000. Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds. *Biotechnology Bioengineering*, 67, 418-423.
- Hallas L.E., Adams W.J., Heitkamp M.A., 1992. Glyphosate degradation by immobilized bacteria: field studies with industrial wastewater effluent. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1215.
- Hamdaoui O., Naffrechoux E., 2007a. Modelling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon: Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 147, 381-394.

- Hamdaoui O., Naffrechoux E., 2007b. Modelling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon: Part II. Models with more than two parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 147, 401-411.
- Hamdaoui O., Naffrechoux E., Suptil J., Fachinger C., 2005. Ultrasonic desorption of p-chlorophenol from granular activated carbon. *Chemical Engineering Journal*, 106, 153-161.
- Han R., Ding D., Xu Y., Zou W., Wang Y., Li Y., Zou L., 2008. Use of rice husk for the adsorption of congo red from aqueous solution in column mode. *Bioresource Technology*, 99, 2938-2946.
- Hao H., Chen Y., Wu M., Wang H., Yin Y., Lü Z., 2004. Sonochemistry of degrading p-chlorophenol in water by high frequency ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 43-46.
- Hao O.J., Kim M.H., Seagren E.A., Kim H., 2002. Kinetics of phenol and chlorophenols utilization by *Acinetobacter* species. *Chemosphere*, 46, 797-807.
- Heipieper H., Meinhardt F., Segura A., 2003. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Lett.*, 229, 1-7.
- Heipieper H.J., Keweloh H., Rehm H.J., 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 1213-1217.
- Heipieper H.J., Diefenbach R., Keweloh H., 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1847-1852.
- Hendricks D., 2006. *Water Treatment Unit Processes*, Cap. Adsorption (XV), pp. 841, CRC Boca Raton.
- Hendriksen H.V., Larsen S., Ahring B.K., 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 365-370.
- Herrera R., 2002, *Avances en Depuración Biológica: SBR*.

- Higgins M.J. y Novak J.T., 1977. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environmental Engineering*, 123, 4979-4986.
- Higson F.K., Focht D.D., 1992. Utilization of 3-chloro-2methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2 through the *meta* fission pathway. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 2501-2504.
- Hill G. A., Milne B. J., Nawroci P. A., 1996. Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 163-168.
- Hines A.L., Maddox R.N., 1985. *Mass Transfer. Fundamentals and Applications*, Prentice-Hall PTR.
- Hinteregger C., Leitner R., Loidl M., Ferschl A., Streichsbier F., 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Applied Microbiology Biotechnology*, 37, 252-259.
- Hoffman C., Sales D. y Christofi N., 2003. Combination ecotoxicity and testing of common chemical discharges to sewer using the *Vibrio fischeri* luminescence bioassay. *Int. Microbiology*, 6, 41-47.
- Hoigné J., Bader H., 1983. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. I. Non dissociating organic compounds. *Water Research*, 17, 173-183.
- Hollender J., Dott W., Hopp J., 1994. Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2330-2338.
- Hollender J., Hopp J., Dott W., 1997. Degradation of 4-chlorophenol via the *meta* cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4567-4572.
- Horowitz A., Suflita J.M., Tiedje J.M., 1983. Reductive dehalogenations of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganism. *Appl. Environmental Microbiology*, 45, 1459-1465.
- Hosseini S.H., Borghei S.M., 2005. The treatment of phenolic wastewater using a moving bed bio-reactor. *Process Biochemistry*, 40, 1027-1031.

- Hu J.Y., Ong S.L., Ng. W.J., Liu W., 2005. Use of a sequencing batch reactor for nitrogen and phosphorous removal from municipal wastewater. *Journal Environmental Engineering*, 131, 734-744.
- Hu X., Li A., Fan J., Deng C., Zhang Q., 2008. Biotreatment of *p*-nitrophenol and nitrobenzene in mixed wastewater through selective bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 99, 4529-4533.
- Hu Z., Ferraina R.A., Ericson J.F., MacKay A.A., Smets B.F., 2005a. Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Water Research*, 39, 710-720.
- Hu Z., Ferraina R.A., Ericson J.F., MacKay A.A., Smets B.F., 2005b. Effect of long-term exposure, biogenic substrate presence, and electron acceptor conditions on the biodegradation of multiple substituted benzoates and phenolates. *Water Research*, 39, 3501-3510.
- Hutchinson D.H., Robinson C.W., 1988. Kinetics of the simultaneous batch degradation of *p*-cresol and phenol by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 29, 599-604.
- Hutchinson D.H., Robinson C.W., 1990. A microbial regeneration process for granular activated carbon II: regeneration studies. *Water Research*, 24, 1217-1224.
- Ibrahim M., Ali H., Taylor K., Biswas N., Bewtra J., 1998. Removal of phenol from industrial wastewaters using *Arthromyces ramosus* peroxidase in a continuous flow system. *Proceedings of the Industrial Waste Conference*, 52, 271.
- Ileri R, Sengil I.A., Kulac S., Damar Y., 2003. Treatment of mixed pharmaceutical industry and domestic wastewater by sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, A38, 2101-2111.
- Ince N.H., Apikyan I.G., 2000. Combination of activated carbon adsorption with light-enhanced chemical oxidation via hydrogen peroxide. *Water Research*, 34, 4169-4176.
- Inguanzo M., Domínguez M., Menéndez J.A., Blanco C.G., Pis J.J., 2002. On the pyrolysis of sewage sludge: the influence of pyrolysis conditions on solid, liquid and gas fractions. *J. Analytical and Applied Pyrolysis*, 63, 209-222.

- Inizan M., Freval A., Cigana J., Meinhold J., 2005. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor (SBR) for industrial wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52, 10-11, 335-343.
- Inoue A., Horikoshi K., 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338, 264-266.
- Irvine R.L., Moe W.M., 2001. Periodic biofilter operation for enhanced performance during unsteady-state loading conditions. *Water Science and Technology*, 43 (3), 231.
- Ivancev-Tumbas I., Dalmacija B., Tamas Z., Karlovic E., 1998. Reuse of biologically regenerated activated carbon for phenol removal. *Water Research*, 32, 1085-1094.
- Iwai S., Oshino Y., Tsukada T., 1990. Design and operation of small wastewater treatment plants by microbial film process. *Water Science and Technology*, 22 (3-4), 139-144.
- Jaar M.A.A., 1991. Biologische regeneration schadstoffbeladener aktivkohle am beispiel der modellsbstanz 3-chlorbenzoesaure und thioglykols. Tesis doctoral, Hamburgo, Alemania.
- Jaar M.A.A., Wilderer P.A., 1992. Granular activated carbon sequencing batch biofilm reactor to treat problematic wastewaters. *Water Science and Technology*, 26 (5-6), 1195-1203.
- Jankowska H., Swiatkowski A., Choma J., 1991. Active carbon, Ellis Horwood Limited and Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- Janssen D. B., Oppentocht J.E., Poelarends G. J., 2001. Microbial dehalogenation, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 254-258.
- Jarvinen K.T., Melin E.S., Puhakka J.A., 1994. High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low-temperatures. *Environmental Science and Technology*, 28 (13), 2387-2392.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T., 2004. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. 3rd edition, Lewis Publishers.
- Jiang H.L., Tay J.H., Tay S.T.L., 2004a. Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbial Technology*, 63, 602-608.

- Jiang H.L., Tay J.H., Maszenan A.M., Tay S.T.L., 2004b. Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 6767-6775.
- Jiang X., Hua X., Ren W., Qian Z., Qian X., 1998. Treatment of industrial phenol wastewater by SBR process. *Huanjing Baohu*, 35, 23.
- Jiang Y., Petrier C., Waite T.D., 2006. Sonolysis of 4-chlorophenol in aqueous solution: Effects of substrate concentration, aqueous temperature and ultrasonic frequency. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 415-422.
- Jianlong W., Xianghum Q., Libo W., Yi Q., Hegemann W., 2002. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal refractory compound in coke plant wastewater. *Proc. Biochemechistry*, 38, 777-781.
- Jindarom C., Meeyoo V., Kitiyanan B., Rirksomboon T., Rangsunvigit P., 2007. Surface characterization and dye adsorptive capacities of char obtained from pyrolysis/gasification of sewage sludge. *Chemical Engineering*, 133, 239-246.
- Juang R.S., Wu F.C., Tseng R.L., 2000. Mechanism of adsorption of dyes and phenols from water using activated carbons prepared from plum kernels. *Colloid Interface Science*, 227, 437-444.
- Juang R.S., Wu F.C., Tseng R.L., 2002. Characterization and use of activated carbons prepared from bagasses for liquid-phase adsorption. *Colloids and Surfaces*, 201, 191-199.
- Jung M-W., Ahn K-H., Lee Y., Kim K-P., Rhee J-S., Park J.T., Paeng K-J., 2001. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons GAC. *Microchemical Journal*, 70, 123-131.
- Jung-Hwa K., Oh K., Lee S., Kim S, Hong S., 2002. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry*, 37, 1367-1373.
- Kaballo H-P., 1997. Shock loading management with the sequencing batch biofilm reactor technology. *Water Science and Technology*, 35 (1), 35-40.
- Kaballo H-P., 1998a. Treatment of chloroorganic substances with a SBBR in comparison with a continuous flow biofilm reactor. *Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft*, 141, 1-152.

- Kaballo H-P., 1998b. The sequencing batch biofilm reactor (SBBR) process for the treatment of chlorine-organics loaded wastewater in a performance comparison with a continuous biofilm process of similar dimension and design. *Berichte aus Wasserguete- und Abfallwirtschaft*, 141, 1-152.
- Kaballo H-P., Wilderer P.A., 1993. Sequencing-batch-biofilm-reactor-technology- a tool to control biomass distribution in fixed bed reactors. *Biofilm Newsletter*, 2/93, 10-13.
- Kaballo H-P., Rehbein V., Zhao Y., Wilderer P.A., 1994. Das Sequencing-Batch-Biofilm-Reactor (SBBR) - Verfahren. *Awt Abwassertechnik Abfalltechnik und Recycling*, 2, 49-54.
- Kaballo H-P., Wilderer P.A., 1995. The sequencing batch biofilm reactor technology: a new and advanced method to treat industrial wastewater. *New and Emerging Environ. Technologies and Products Conference: For Wastewater Treatment and Stormwater Collection*. 10, 51-62.
- Kaballo H-P., Zhao Y., Wilderer P.A., 1995. Elimination of *p*-chlorophenol in biofilm reactors - A comparative study of continuous flow and sequenced batch operation. *Water Science and Technology*, 31 (1), 51-60.
- Karamanev D.G., Samson R., 1998. High-rate biodegradation of pentachlorophenol by biofilm developed in the immobilized soil bioreactor. *Environmental Science and Technology*, 32 (7), 994-999.
- Kargi F., Eker S., 2006. Effect of sludge age on performance of an activated sludge unit treating 2,4 dichlorophenol-containing synthetic wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 60-64.
- Kargi F., Konya I., 2006. COD, *para*-chlorophenol and toxicity removal from *para*-chlorophenol containing synthetic wastewater in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials*, B132, 226-231.
- Kargi F., Konya I., 2006. COD, *para*-chlorophenol and toxicity removal from *para*-chlorophenol containing synthetic wastewater in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials*, B132, 226-231.
- Kargi F., Konya I., 2007. *para*-chlorophenol containing synthetic wastewater treatment in an activated sludge unit: Effects of hydraulic residence time. *Journal of Environmental Management*, 84, 20-26.

- Kargi F., Eyiisleyen S., 1995. Batch biological treatment of synthetic wastewater in a fluidized bed containing wire mesh sponge particules. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 119-123.
- Kargi F., Uygur A., Baskaya H. S., 2005. *para*-Chlorophenol inhibition on COD, nitrogen and phosphate removal from synthetic wastewater in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 96, 1696-1702.
- Keen R., Baillod C.R., 1985. Toxicity to *Daphnia* of the end products of wet oxidation of phenol and substituted phenols. *Water Research*, 19, 767-772.
- Kennedy K.J., Lu J., Mohn W.W., 1992. Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular sludge. *Water Research*, 26, 1085-1092.
- Kennedy K.J., Ning Z., Fernandes L., 2001. Modelling simultaneous removal of primary substrates and chlorinated phenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Canadian Journal Civil Engineering*, 28, 910-921.
- Keweloh H., Heipieper H.J., Rehm H.J., 1989. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 31, 383-389.
- Khoury N., Dott W., Kämpfer P., 1992. Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 524-528.
- Kim C.J., Maier W.J., 1986. Acclimation and biodegradation of chlorinated organic compounds in the presence of alternate substrates. *J. Water Pollution Control Fed.*, 58, 157-164.
- Kim J.H., Oh K.K., Lee S.T., Kim S.W., Hong S.I., 2002. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry*. 37, 1367-1373.
- Kim J.K., Martínez F., Metcalfe I.S., 2007. The beneficial role of use of ultrasound in heterogeneous Fenton-like system over supported copper catalysts for degradation of *p*-chlorophenol. *Catalysis Today*, 124, 224-231.
- Kim M.H., Hao O.J., 1999. Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species. *Water Research*, 33, 562-574.

- Klimiuk E., Kulikowska D., 2006. Organics removal from landfill leachate and activated sludge production in SBR reactors. *Waste Management*, 26, 1140-1147.
- Knackmuss H. J., Hellwing M., 1978. Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Archives of Microbiology*, 117, 1-7.
- Knackmuss H.J., 1982. Xenobiotic degradation in industrial sewage: haloaromatics as target substrates. *Biochemical Society Symposia*, 48, 173-190.
- Ko S.O., Lee D.H., Kim Y-H., 2007. Kinetic studies of reductive dechlorination of chlorophenols with Ni/Fe bimetallic particles. *Environmental Technology*, 28, 583-593.
- Koch B., Ostermann M., Hoeke H., Hempel D.C., 1991. Sand and activated carbon as biofilm carriers for microbial degradation of phenols and nitrogen-containing aromatic compounds. *Water Research*, 25, 1-8.
- Kolb F.R., 1997. Biological purification of wastewater containing xenobiotics with the aid of a loop flow reactor packed with activated carbon and equipped with a membrane oxygen transfer unit. *Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft*, 128.
- Kolb F.R., Wilderer P.A., 1995. Activated carbon membrane biofilm reactor for the degradation of volatile organic compounds. *Water Science and Technology*, 31 (1), 205-213.
- Kolb F.R., Wilderer P.A., 1996. Activated carbon sequencing batch biofilm reactor to treat industrial wastewater. *Water Science and Technology*, 35, (1), 169-176.
- Konya I., Eker S., Kargi F., 2007. Mathematical modelling of 4-chlorophenol inhibition on COD and 4-chlorophenol removals in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 233-239.
- Kovenklioglu S., Cao Z., Shah D., Farrauto R.J., Balko E.N., 1992. Direct catalytic hydrodechlorination of toxic organics in wastewater. *AIChE Journal*, 38, 1003-1012.
- Krumme M. L., Boyd S. A., 1988. Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. *Water Research*, 22, 171-177.
- Kuiper J., Hanstveit A.O., 1984. Fate and effects of 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol in marine plankton communities in experimental enclosures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 15-33.
- Kulkarni M., Chaudhari A., 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *P. putida*. *Bioresource Technology*, 97(8), 982-988.

- Langwaldt J.H., Mannisto M.K., Wichmann R., Puhakka J.A., 1998. Simulation of in situ subsurface biodegradation of polychlorophenols in air-lift percolators. *Applied Microbiology Biotechnology*, 49, 663-668.
- Lanthier M., Juteau P., Lepine F., Beudet R., Villemur R., 2005. *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 1058-1065.
- Lazarova V., Manem J., 2000. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment, *Biofilms*, 159-206.
- Lee E. G. H., Mueller J. C. y Walden C. C., 1975. Effect of temperature and sludge loading on BOD5 [five-day biochemical oxygen demand] removal and sludge settleability in activated sludge systems treating bleached kraft effluents. *B. C. Re.*, 58 (6), 100-103.
- Lehninger A.L., 1970. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochemistry*, 119, 129-138.
- Lewis D.L., Kolip H.P., Hodson R.E., 1986. Nutrient limitation and adaptation of microbial population to chemical transformations. *Applied Environmental Microbiology*, 51, 598-603.
- Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. BOE 189, de 08/08/85.
- Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento de la Comunidad de Madrid. B.O.C.M núm. 269 de 12/11/1993.
- Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrado de la contaminación. BOE 157, de 02/07/2002.
- Li R., Thornton T.D., Savage P.E., 1992. Kinetics of carbon dioxide formation from the oxidation of phenols in supercritical water. *Environmental Science and Technology*, 26 (12), 2388-2395.
- Li Y., Loh K.C., 2006. Activated carbon impregnated polysulfone hollow fiber membrane for cell immobilization and cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol in the presence of phenol. *Journal of Membrane Science*, 276, 1-2, 81-90.

- Lillo-Ródenas M.A., Lozano-Castelló D., Cazorla-Amorós D. y Linares-Solano A., 2001. Preparation of activated carbons from Spanish anthracite II. Activation by NaOH. *Carbon*, 39, 751-759.
- Lillo-Ródenas M.A., Ros A., Fuente E., Montes-Morán M.A., Martín M.J., Linares-Solano A., 2008. Further insights into the activation process of sewage sludge-based precursors by alkaline hydroxides. *Chemical Engineering Journal*, 142, 168-174.
- Lin J.E., Wang H.Y., 1991. Degradation of pentachlorophenol by non-immobilized, immobilized and co-immobilized *Arthrobacter* cells. *J. Fermentation Bioengineering*, 72, 311-314.
- Lin K-S., Wang H.P., 2001. Catalytic oxidation of 2-chlorophenol in confined channels of ZSM-48. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 4956-4960.
- Lin Y-T., Lu M-C., 2007. Catalytic action of goethite in the oxidation of 2-chlorophenol with hydrogen peroxide. *Water Science and Technology*, 55, 101-106.
- Liu H., Wu J., Chen Y., 2004. Biodegradation mechanism of aromatic compounds by *Comamonas testosteroni* ZD 4-1 and *Pseudomonas aeruginosa* ZD 4-3. *Weishengwu Xuebao*, 44, 107-110.
- Liu Y., Tay J-H., 2001. Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 111-117.
- Liu Y., Tay J.H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36, 1653-1665.
- Liu Y., Tay, J.H., 2004. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22, 533-63.
- Loh K.C., Cao B., 2008. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*- A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 1-12.
- Loh K.C., Yu Y.G., 2004. Kinetics of carbazole degradation by *Pseudomonas putida* in presence sodium salicylate. *Water Research*, 34, 4131-4138.
- Loh K.C., Wang S-J., 1998. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation*, 8, 329-338.

- Lozano-Castelló D., Lillo-Ródenas M.A., Cazorla-Amorós D., Linares-Solano A., 2001. Preparation of activated carbons from Spanish anthracite I. Activation by KOH. *Carbon*, 39, 741-749.
- Lu C., Chen S., 1992. The effects of the secondary carbon source on the biodegradation of chlorinated phenols in biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 26 (9-11), 2113-2116.
- Lu C.J., Lee C.M., Huang C.Z., 1996. Biodegradation of chlorophenols by immobilized pure-culture microorganisms. *Water Science and Technology*, 34, 67-72.
- Lu G.Q., Lau D.D., 1996. Characterization of sewage sludge-derived adsorbents for H₂S removal. Part 2. Surface and pore structural evolution in chemical activation. *Gas Separation and Purification*, 10, 103-111.
- Lu G.Q.M., 1996. Preparation and evaluation of adsorbents from waste carbonaceous materials from SO_x and NO_x removal. *Environmental Progress*, 15, 12-18.
- Lücking F., Köser H., Jank M., Ritter A., 1998. Iron powder, graphite and activated carbon as catalysts for the oxidation of 4-chlorophenol with hydrogen peroxide in aqueous solution. *Water Research*, 32, 2607-2614.
- Mace S., Mata Álvarez J., 2002. Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 41, 5539-5553.
- Magbanua B.S.Jr., Hoover P.A., Campbell P.J., Bowers A.R., 1994. The effect of cosubstrates on phenol degradation kinetics. *Water Science and Technology*, 30, 67-77.
- Mäkinen P.M., Theno T.J., Ferguson J.F., Ongerth J.E. y Puhakka J.A., 1993. Chlorophenol toxicity removal and monitoring in aerobic treatment: recovery from process upsets. *Environmental Science and Technology*, 27, 1434-1439.
- Malato S., Blanco J., Cáceres J., Fernández-Alba A.R., Agüera A., Rodríguez A., 2002. Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. *Catalysis Today*, 76, 209-220.
- Manju G.N., Raji C., Anirudhan T.S., 1998. Evaluation of coconut husk carbon for the removal of arsenic from water. *Water Research*, 32, 3062-3070.

- Marco A., Esplugas S., Saum G., 1997. How and why combine chemical and biological processes for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 35 (4), 321-327.
- Mars A.E., Kasberg T., Kaschabek S.R., van Agteren M.H., Janssen D.B., Reineke W., 1997. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*- cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriology*, 179, 4530-4537.
- Martin M.J., Balaguer M.D., Rigola M., 1996. Feasibility of activated carbon production from biological sludge by chemical activation with $ZnCl_2$ and H_2SO_4 . *Environmental Technology*, 17, 667-671.
- Martin M.J., Artola A., Balaguer M.D., Rigola M., 2002. Towards waste minimisation in WWTP: activated carbon from biological sludge and its application in liquid phase adsorption. *J. of Chemical Technology Biotechnology*, 77, 825-833.
- Martin M.J., Artola A., Balaguer M.D., Rigola M., 2003. Activated carbons developed from surplus sewage sludge for the removal of dyes from dilute aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 94, 231-239.
- Martin M.J., Serra E., Ros A., Balaguer M.D., Rigola M., 2004. Carbonaceous adsorbents from sewage sludge and their application in a combined activated sludge-powdered activated carbon (AS-PAC) treatment. *Carbon*, 42, 1389-1394.
- Martínez-Huitle C.A., Brillas E., 2009. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 87, 105-145.
- Matatov-Meytal Y.I., Sheintuch M., 1998. Catalytic abatement of water pollutants. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37, 309-326.
- Mattson J.S., Mark H.B.Jr., Malbin M.D., Weber W.J.Jr., Crittenden J.C., 1969. Surface chemistry of active carbon: specific adsorption of phenols. *J. Colloid and Interface Science*, 31, 116-130.
- McClure N.C., Weightman A.J., Fry J.C., 1989. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl. Environmental Microbiology*, 55, 2627-2634.
- McClure N.C., Fry J.C., Weightman A.J., 1991. Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory scale activated sludge unit. *Appl. Environmental Microbiology*, 57, 366-373.

- McLaughlin H., Farrell A., Quilty B., 2006. Bioaugmentation of activated sludge with two *Pseudomonas putida* strains for the degradation of 4-chlorophenol. *J. Environmental Science and Health Part A*, 41, 763-777.
- Melin E.S., Puhakka J.A., Shieh W.K., 1993. Degradation of 4-chlorophenol in denitrifying fluidized-bed process. *J. Environ. Sci. Health, A* 28, 1801-1811.
- Melin E.S., Ferguson J.F., Puhakka J.A., 1997. Pentachlorophenol biodegradation kinetics of an oligotrophic fluidized bed enrichment culture. *Applied Microbiology Biotechnology*, 47, 675-682.
- Melin E.S., Jarvinen K.T., Puhakka J.A., 1998a. Effects of temperature on chlorophenol biodegradation kinetics in fluidized-bed reactors with different biomass carriers. *Water Research*, 32, 81-90.
- Melin E.S., Puhakka J.A., Ferguson J.F., 1998b. Enrichment and operation strategies for polychlorophenol degrading microbial cultures in an aerobic fluidized-bed reactor. *Water Environmental Research*, 70, 171-180.
- Méndez A., Gascó G., Freitas M.M.A., Siebielec G., Stuczynski T., Figueiredo J.L., 2005. Preparation of carbon-based adsorbents from pyrolysis and air activation of sewage sludges. *Chemical Engineering*, 108, 169-177.
- Metcalf & Eddy, 2000. *Ingeniería de Aguas Residuales*, Editorial Mc-Graw Hill.
- Mohan S.V., Rao N.C., Sarma P.N., 2007. Low-biodegradable composite Chemicals wastewater treatment by biofilm configured sequencing batch reactor (SBBR). *J. Hazardous Materials*, 144, 108-117.
- Mohan S.V., Falkentoft C., Nancharaiyah Y.V., McSwain B., Wattiau P., Wilderer P.A., Wuertz S., Hausner M., 2009. Bioassessment of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresource Technology*, 100, 1746-1753.
- Molina C.B., Casas J.A., Zazo J.A., Rodriguez J.J., 2006. A comparison of Al-Fe and Zr-Fe pillared clays for catalytic wet peroxide oxidation. *Chemical Engineering Journal*, 118, 29-35.
- Moos L.P., Kirsch E.J., Wukasz R.F., Grady C.P.L.J., 1983. Pentachlorophenol biodegradation 1. Aerobic. *Water Research*, 17, 1575-1584.

- Morales J.C., González S., González O., 2006. Remoción biológica simultánea de fósforo y nitrógeno de agua residual. Tratamiento de aguas en zonas industriales, urbanas y rurales. *Ingeniería Ambiental*, 173-174.
- Moreno Castilla C., López Ramón M.V., Carrasco Marín F., 2000. Changes in surface chemistry of activated carbons by wet oxidation. *Carbon*, 38, 1995-2001.
- Moreno G., Buitron G., 2004. Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresource Technology*, 94, 215-218.
- Moreno H.A.; Droppelmann C.V.; Verdejo M.E., 2006. Production and evaluation of activated carbon from sludge generated in a sewage treatment plant. *Información Tecnológica*, 17, 9.
- Moreno-Andrade I., Buitron G., 2004. Variation of the microbial activity the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*, 50 (10), 251-258.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G., 2008. Performance of an optimally filled discontinuous bioreactor degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*, 57 (12), 1991-1997.
- Morgenroth E., Sherden T., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J., Wilderer P.A., 1997. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 31, 3191-3194.
- Mun C.H., Ng W.J., He J., 2008. Acidogenic sequencing batch reactor start-up procedures for induction of 2,4,6-trichlorophenol dechlorination. *Water Research*, 42, 1675-1683.
- Munoz-Colunga A., Gonzalez-Martinez S., 1996. Effects of population displacements on biological phosphorus removal in a biofilm SBR. *Water Science and Technology*, 34 (1-2), 303-313.
- Munter R., 2001. Advanced oxidation processes - current status and prospects. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry* 50, 59-80.
- Munter R., Preis S., Kallas J., Trapido M., Veressinina Y., 2001. Advanced oxidation processes (AOPs): water treatment technology for the twenty-first century. *Kemia-Kemi*, 28, 354-362.

- Nagata Y., Nkagawa M., Okuno H., Mizukoshi Y., Yim B., Maeda Y., 2000. Sonochemical degradation of chlorophenols in water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7, 115-120.
- Nakhla, G., Abuzaid, N., Farooq, S, 1994. Activated carbon adsorption of phenolics in oxic systems: effect of pH and temperature variations. *Water Environment Research*, 66, 842-850.
- Nalbur B.E., Alkan U., 2007. The inhibitory effects of 2-CP and 2,4-DCP containing effluents on sequencing batch reactors. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60, 178-188.
- Namasivayam C., Periasamy K., 1993. Bicarbonate-treated peanut hull carbon for mercury (II) removal from aqueous solution. *Water Research*, 27, 1663-1668.
- Namasivayam C., Radhika R., Suba S., 2001. Uptake of dyes by a promising locally available agricultural solid waste: coir pith. *Waste Management*, 21, 381-387.
- Namasivayam C., Sangeetha D., Gunasekaran R., 2007. Removal of anions, heavy metals, organics and dyes from water by adsorption onto a new activated carbon from jatropha husk, an agro-industrial solid waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 85, 181-184.
- Nanzai B., Okitsu K., Takenaka N., Bandow H., Maeda Y., 2008. Sonochemical degradation of various monocyclic aromatic compounds: Relation between hydrophobicities of organic compounds and the decomposition rates. *Ultrasonic Sonochemistry*, 15, 478-483.
- Nerger C., Rehbein V., Wilderer P.A., 1996. Nitrification of municipal wastewater by biofiltration. Comparative studies of continuous and SBBR operations at a pilot plant. *Wasser, Luft und Boden*, 40, 29-32.
- Neumann G., Veeranagouda Y., Karegoudar T.B., Sahin Ö., Mäusezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Haipeper H.J., 2005. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter sp.* Adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles*, 9, 163-168.
- Nevalainen I., Kostyal E., Nurmiolahassila E.L., Puhakka J.A., Salkinoja-Salonen M.S., 1993. Dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a nitrifying biofilm. *Water Research*, 27, 757-767.

- Ning Z., Kennedy K.J., Fernandes L., 1997. Anaerobic degradation kinetics of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) with linear sorption. *Water Science and Technology*, 35 (2-3), 67-75.
- Nüblein K., Maris D., Timmis K., Dwyer D.F., 1992. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harboured by *Pseudomonas* spp. Introduced into activated sludge microcosm. *Appl. Environmental Microbiology*, 58, 3380-3386.
- Nuhoglu B., Yalcin B., 2004. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, 40, 1233-1239.
- Obaja M.S., Costa J., Sans C., Mata-Álvarez J., 2003. Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 87, 103-111.
- Okada M., Ueno Y., Lin, Chi K., Murakami, A., 1991. Population dynamics of bacteria for phosphorus removal in sequencing batch reactor (SBR) activated sludge processes. *Suishitsu Odaku Kenkyu*, 14, 47.
- Oltmanns H.G., Rast R.H., Reineke W., 1988. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 28, 609-616.
- Ordoñez S., Sastre H., Díez F. V., 2002. Catalytic hydrodechlorination of chlorinated olefins over a Pd/Al₂O₃ catalyst: kinetics and inhibition phenomena. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 41, 505-511.
- Orive G., Hernandez R.M., Gascon A.R., Igartua M., Rojas A., Pedraz J.L., 2001. Microencapsulation of fan anti-VE-cadherin antibody secreting 1B5 hybridoma cells. *Biotechnology Bioengineering*, 76, 285-294.
- Otake Y., Jenkins R.G., 1993. Characterization of oxygen-containing surface complexes created on a microporous carbon by air and nitric acid treatment. *Carbon*, 31, 109-121.
- Otero M., Rozada F., Calvo L.F., García A.I. y Morán A., 2003. Elimination of organic water pollutants using adsorbents obtained from sewage sludge. *Dyes and Pigments*, 57, 55-65.
- Padilla B., Díez F., Ordóñez S., 2005. Tratamiento de efluentes acuosos contaminados con compuestos organoclorados. *Ingeniería del Agua*, 12, 361-376.
- Pambrun V., Paul E., Sperandio M., 2004. Treatment of nitrogen and phosphorous in highly concentrated effluent in SBR and SBBR processes. *Water Science and Technology*, 50 (6), 269-276.

- Papirer E., Li S., Donnet J.B., 1987. Contribution to the study of basic surface groups on carbon. *Carbon*, 25, 243-247.
- Park D., Lee D.S., Kim Y.M., Park J.M., 2008. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology*, 99, 2092-2096.
- Parker D.S., 1971. Characteristics of flocs in turbulent regimes. Ph.D. dissertation, University of California.
- Parra J.B., Pis J.J., de Sousa J.C., Pajares J.A., Bansal R.C., 1996. Effect of coal preoxidation on the development of microporosity in activated carbons. *Carbon*, 34, 783-787.
- Peng D.C., Bernet N., Delgenes J.P., Moletta R., 1999. Aerobic granular sludge-a case report. *Water Research*, 33, 890-893.
- Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M.A., Jiménez J., Esplugas S., 2004. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47, 219-256.
- Pérez-Moya M., Graells M., Del Valle L.J., Centelles E., Mansilla H.D., 2007. Fenton and photo-Fenton degradation of 2-chlorophenol: multivariate analysis and toxicity monitoring. *Catalysis Today*, 124, 163-171.
- Perron N., Welander U., 2003. Degradation of phenol and cresol at low temperatures using a suspended-carrier biofilm process. *Chemosphere*, 55, 45-50.
- Pinkart H.C., Wolfram J.W., Rogers R., White D.C., 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environmental Microbiology*, 62, 1129-1132.
- Piotrowski M.R., Doyle J.R., Cosgriff D., Parsons M.C., 1994. Bioremediation progress at the Libby, Montana, superfund site. In *Applied Biotechnology for Site Remediation* (Edited by Hinchee R.E., Anderson D.B., Metting Jr F.B. y Sayles G.D.), 240-255.
- Pokhrel D., Viraraghavan T., 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater-a review. *Science of the Total Environment*, 333, 37-58.
- Protzman R.S., Lee P.-H., Ong S.K., Moorman, T.B., 1999. Treatment of formulated atrazine rinsate by agrobacterium radiobacter strain J14a in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Research*, 33, 1399-1404.

- Puhakka J.A., Melin E.S., Jarvinen K.T.; Koro P.M.; Rintala J.A., Hartikainen P., Shieh W.K.; Ferguson J.F., 1995. Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and Technology*, 31 (1), 227-35.
- Puyol D., Mohedano A.F., Sanz J.L., Rodríguez J.J., 2009a. Comparison of UASB and EGSB performance on the anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol. *Chemosphere*, 76, 1192-1198.
- Puyol D., Mohedano A.F., Sanz J.L., Rodríguez J.J., 2009b. Anaerobic biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic granular sludge: role of co-substrates and methanogenic inhibition. *Water Science and Technology*, 59 (7), 1449-1456.
- Puziy A.M., Poddubnaya O.I., Martínez Alonso A., Suárez García F., Tascón J.M.D., 2002. Synthetic carbons activated with phosphoric acid II. Porous structure. *Carbon*, 40, 1507-1519.
- Qin J., Zhang Q., Chuang K. T., 2001. Catalytic wet oxidation of *p*-chlorophenol over supported noble metal catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 29, 115-123.
- Qin L. Liu Y., Tay J-H, 2004. Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 47-52.
- Quan X., Shi H., Wang J., Qian Y., 2003. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere*, 50, 1069-1074.
- Quan X., Shi H., Liu H., Wang J., Qian Y., 2004. Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochemistry*, 39, 1701-1707.
- Quan X., Yang Z., Shi H., Tang Q., Qian Y., 2005. The effect of a secondary chlorophenol presence on the removal of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) in activated sludge system bioaugmented with 2,4-DCP degrading special culture. *Process Biochemistry*, 40, 3462-3467.
- Quan X.C., Shi H.C., Zhang Y.M., Wang H.L., Qian Y., 2004. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter sp.* *Separation Purification Technology*, 34, 97-103.
- Quintanilla A., Casas J.A., Zazo J.A., Mohedano A.F., Rodríguez J.J., 2006. Wet air oxidation of phenol at mild conditions with a Fe/activated carbon catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 62, 115-120.

- Quintanilla A., Casas J.A., Rodriguez J.J., 2007. Catalytic wet air oxidation of phenol with modified activated carbons and Fe/activated carbon catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76, 135-145.
- Rahman R.A., Zahrim A.Y., Abu-Bakar A., 2007. Chloro-organics in papermill effluent: identification and removal by sequencing batch biofilm reactor. *Journal of Applied Sciences*, 7, 15, 2160-2163.
- Ramos J.L., Duque E., RodriguezHerva J.J., Godoy P., Haidour A., Reyes F., FernandezBarrero A., 1997. Mechanism for solvent tolerante in bacteria. *J. Biological Chemistry*, 272, 3887-3890.
- Ramos J.L., Gallegos M.T., Marques S., Ramos-Gonzalez M.I., Espinosa-Urgel M., Segura A., 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 166-171.
- Rao N.C., Mohan S.V., Muralikrishna P., Sarma P.N., 2005. Treatment of composite chemical wastewater by aerobic GAC-biofilm sequencing batch reactor (SBGR). *J. of Hazardous Materials*, B124, 59-67.
- Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los Títulos II y III de la Ley 29/1985 de Aguas. BOE 209, de 31/08/1988.
- Real Decreto 258/1989, de 10 de marzo, por el que se establece la normativa general de vertidos sobre sustancias peligrosas de la tierra al mar, BOE 16/03/89.
- Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público.
- Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas; BOE 30/12/1995.
- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, BOE 08/12/2007.
- Reardon K.F., Mosteller D.C., Bull Rogers J.D., 2000. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology Bioengineering*, 69, 385-400.

- Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers J.B., Du Teau N.M., Kim K-H., 2002. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 110, 1005-1011.
- Reineke W., Jenness D.J., Williams P.A., Knackmuss H.J., 1982. TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of the *meta* pathway. *J. Bacteriology*, 150, 195-201.
- Reineke W., Knackmuss H.J., 1984. Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 395-402.
- Reynolds S.L., Kalluri R., Schultz T.E., 1997. Down under. Submerged system provides better biological treatment. *Industrial Wastewater*, 5, 43-50.
- Rio S., Faur-Brasquet C., Le Coq L., Courcoux P., Le Cloirec P., 2005. Experimental design methodology for the preparation of carbonaceous sorbents from sewage sludge by chemical activation-application to air and water treatments. *Chemosphere*, 58, 423-437.
- Rittmann B.E., McCarty P.L., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw Hill, New York.
- Rodríguez-Reinoso F., Linares-Solano A., Martín-Martínez J.M., 1984. The controlled reaction of active carbons with air at 350°C - II. Evolution of microporosity. *Carbon*, 22, 123-130.
- Rodríguez-Reinoso F., 1997. Activated Carbon: structure, characterization, preparation and applications. *Introduction to Carbon Technologies*, 35-101.
- Rodríguez-Reinoso F., 1998. The role of carbon materials in heterogeneous catalysis. *Carbon*, 36, 159-175.
- Roeske I., Wobus A., Uhlmann D., 1993. Degradation of chlorinated monoaromatics by biofilms on semi-permeable membranes- Comparison between sequencing batch and continuous flow operation. 2nd International Specialized Conference on Biofilm Reactors, Paris, IAWQ.
- Ros A., Lillo-Ródenas M.A., Fuente E., Montes-Morán M.A., Martín M.J., Linares-Solano A., 2006. High surface area materials prepared from sewage sludge-based precursors. *Chemosphere*, 65, 132-140.

- Rozada F., Calvo L.F., García A.I., Martín-Villacorta J., Otero M., 2003. Dye adsorption by sewage sludge-based activated carbons in batch and fixed-bed systems. *Bioresource Technology*, 87, 221-230.
- Rozada F., Otero M., Morán A., García A.I., 2005. Activated carbons from sewage sludge and discarded tyres: Production and optimization. *J. of Hazardous Materials*, B124, 181-191.
- Rozada F., Otero M., García A.I., Morán A., 2007. Application in fixed-bed systems of adsorbents obtained from sewage sludge and discarded tyres. *Dyes and Pigments*, 72, 47-56.
- Rulkens W., 2008. Sewage sludge as a biomass resource for the production of energy: Overview and assessment of the various options. *Energy and Fuels*, 22, 9-15.
- Ruthven D.M., 1984. *Principles of adsorption and adsorption processes*, John Wiley & Sons, INC.
- Sáez P. B., Rittman B. E., 1991. Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol, an inhibitory co-metabolite. *Water Pollution*, 63, 838-847.
- Sáez, P.B., Rittmann B.E., 1993. Biodegradation kinetics of a mixture containing primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). *Biodegradation*, 4, 3-21.
- Safferman S.I., Siruvalure G.S., Foppe L.E., 1998. Deicing fluid treatment in batch-loaded aerobic fluidized bed reactor. *J. Environmental Engineering*, 124, 11-15.
- Sahinkaya E., Dilek F., 2002. Aerobic chlorophenol treatment using fed-batch and sequencing batch reactors. *Annual Technical Exhibition and Conference 75th*, 1692.
- Sahinkaya E., Dilek F., 2005. Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge-Evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research*, 99, 243-252.
- Sahinkaya E., Dilek F., 2006a. Effect of biogenic substrate concentration on the performance of sequencing bath reactor treating 4-CP and 2,4-DCP mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, B128, 258-264.
- Sahinkaya E., Dilek F. B., 2006b. Effect of biogenic substrate concentration on chlorophenol degradation kinetics. *J. of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1530-1539.

- Sahinkaya E., Dilek F., 2007. Effect of feeding time on the performance of a sequencing batch reactor treating a mixture of 4-CP and 2,4-DCP. *Journal of Environmental Management*, 83, 427-436.
- Sameer H.I., Shrikant S.K., Ashwin W.P., Melo J.S., D'souza S.F., 2002. Phenol degradation in rotating biological contactors. *Journal of Chemical and Biotechnology*, 77, 1050-1057.
- Santos A., Yustos P., Quintanilla A., Rodriguez S., Garcia-Ochoa F., 2002. Route of the catalytic oxidation of phenol in aqueous phase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 39, 97-113.
- Santos A., Yustos P., Quintanilla A., Garcia-Ochoa F., 2004. Lower toxicity route in catalytic wet oxidation of phenol at basic pH by using bicarbonate media. *Applied Catalysis B: Environmental*, 53, 181-194.
- Sarfraz S., Thomas S., Tewari U. K., Iyengar L., 2004. Anoxic treatment of phenolic wastewater in sequencing batch reactor. *Water Research*, 38, 965-971.
- Satuf M.L., Brandi R.J., Cassano A.E., Alfano O.M., 2008. Photocatalytic degradation of 4-chlorophenol: a kinetic study. *Applied Catalysis B: Environmental*, 82, 37-49.
- Savage P.E., Gopalan S., Li R., 1994. Oxidation of phenols in supercritical water. *Chemical Oxidation*, 3, 34.
- Schmidt E., 1987. Response of a chlorophenols degrading mixed culture to changing loads of phenol, chlorophenol and cresols. *Applied Microbiology Biotechnology*, 27, 94-99.
- Schmidt L.M., Delfino J.J., Preston J.F., St Laurent G., 1999. Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater. *Chemosphere*, 38, 2897-2912.
- Schraa G., Boone M.L., Jetten M.S.M., Van Neerven A.R.W., Colberg P.J., Zehnder A.J.B., 1986. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Applied Environmental Microbiology*, 52, 1374
- Schwarzenbeck N., Erley R., Wilderer P.A., 2004. Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Science and Technology*, 49 (11-12), 41-46.

- Seredych M., Bandosz T.J., 2007. Sewage sludge as a single precursor for development of composite adsorbents/catalysts. *Chemical Engineering*, 128, 59-67.
- Sezgin M., 1977. The effect of dissolved oxygen concentration on activated sludge process performance. Ph.D. dissertation, University of California.
- Sezgin M., Jenkins D., Parker D.S., 1978. A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *J. Water Pollution Control Fed.*, 50, 362.
- Shan Yi, Zhuang W-Q., Wu B., Tay S. T-L., Tay J-H., 2006. Biodegradation of p-nitrophenol by aerobic granules in a sequencing batch reactor. *Environmental Science and Technology*, 40 (7), 2396-2401.
- Shen D.S., He R., Liu X.W., Long Y., 2006. Effect of pentachlorophenol and chemical oxygen demand mass concentrations in influent on operational behaviours of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 136, 645-653.
- Shen W., Guo Q., Yang X., Liu Y., Song Y. y Cheng J., 2006. Adsorption of methylene blue in acoustic and magnetic fields by porous carbon derived from sewage sludge. *Adsorption Science and Technology*, 24, 433-437.
- Shin H.S., Yoo K.S, Park J.K., 1999. Removal of polychlorinated phenols in a sequential anaerobic-aerobic biofilm reactors packed with tire chips. *Water Environmental Research*, 71, 363.
- Shin H.S., Park H-S., 1991. Enhanced nutrient removal in porous biomass carrier sequencing batch reactor (PBCSBR). *Water Science and Technology*, 23, 719-728.
- Shinoda Y., Sakai Y., UÉ M., Hiraishi A., Kato N., 2000. Isolation and characterization of a new denitrifying *Spirillum* capable of anaerobic degradation of phenol. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1286-1291.
- Sirianuntapiboon S., Ohmomo S., Paneeta S., 2007a. Some properties of a granular activated carbon-sequencing batch reactor (GAC-SBR) system for treatment of textile wastewater containing direct dyes. *J. Environmental Management*, 85, 162-170.
- Sirianuntapiboon S., Ungkaprasatcha O., 2007b. Removal of Pb²⁺ and Ni²⁺ by bio-sludge in sequencing batch reactor (SBR) and granular activated carbon-SBR (GAC-SBR) systems. *Bioresource Technology*, 98, 2749-2757.

- Sirianuntapiboon S., Sansak J., 2008. Treatability studies with granular activated carbon (GAC) and sequencing batch reactor (SBR) system for textile wastewater containing direct dyes. *J. Hazardous Materials*, 159, 404-411.
- Skoog D., Leary J., 1994. *Análisis instrumental*. McGraw-Hill, Madrid.
- Smith K.M., Fowler G.D., Pullket S., Graham N.J.D., 2009. Sewage sludge-based adsorbents: A review of their production, properties and use in water treatment applications. *Water Research*, 43, 2569-2594.
- Soda S., Michihiko I., Fujita M., 1998. Effects of inoculation of a genetically engineered bacterium on performance and indigenous bacteria of a sequencing batch activated sludge process treating phenol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 90-96.
- Son T.T., Blaszczyk M., Mycielski R., 1998. Adaptation of a phenol-degrading bacteria to high concentration of phenol in the medium. *Acta Microbiologica Polonica*, 47, 297-304.
- Soon-An O., Eiichi T., Makoto H., Tadashi H., 2008. Granular activated carbon-biofilm configured sequencing batch reactor treatment of C.I. Acid Orange 7. *Dyes and Pigments*, 76, 142-146.
- Spain J.C., Van Veld P.A., 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 428-435.
- Spain J.C., Nishino S.F., 1987. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 1010-1019.
- Spain J.C., Gibson D.T., 1988. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Appl. Environmental Microbiology*, 54, 1399-1404.
- Sponza D.T., Ulukoy A.E., 2005. Treatment of 2,4-dichlorophenol (DCP) in a sequential anaerobic (upflow anaerobic sludge blanket) aerobic (completely stirred tank) reactor system. *Process Biochemistry*, 40, 3419-3428.
- Srivastava S.K., Tyagi R., 1995. Competitive adsorption of substituted phenols by activated carbon developed from the fertilizer waste slurry. *Water Research*, 29, 483-488.

- Srivastava S.K., Tyagi R., Pal N., Mohan D., 1997. Process development for removal of substituted phenol by carbonaceous adsorbent obtained from fertilizer waste. *Environmental Engineering*, 123, 842-851.
- Stephenson D., Stephenson T., 1992. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 10, 549-559.
- Stinson M.K., Skovronek H.S., Chresand T.J., 1991, EPA SITE demonstration of Biotrol aqueous treatment system, *J. Air Waste Management Association.*, 41, 228-233.
- Suarez A., Monsalvo V.M., Mohedano A.F., Casas J.A., Rodríguez J.J., 2006. Biological treatment of phenolic compounds in wastewater by sequencing batch reactors. *International Water Conference*, ISBN 972-8688-40-7, pp. 315-321.
- Suárez-Ojeda M.E., Carrera J., Metcalfe I.S., Font J., 2008. Wet air oxidation (WAO) as a precursor to biological treatment of substituted phenols: refractory nature of the WAO intermediates. *Chemical Engineering Journal*, 144, 205-212.
- Subramanian K., Greenfield P.F., Ho K-M., Johns M.R., Heller J., 1994. Efficient biological nutrient removal in high strength wastewater using combined anaerobic sequencing batch reactor treatment. *Water Science and Technology*, 30, 315-321.
- Sun Z., Takahashi F., Odaka Y., Fukushi K., Oshima Y., Yamamoto K., 2007. Effects of potassium alkalis and sodium alkalis in the dechlorination of *o*-chlorophenol in supercritical water. *Chemosphere*, 66, 151-157.
- Taeger K., Knackmuss H-J., Schmidt E., 1988. Biodegradability of mixtures of chloro- and methylsubstituted aromatics. Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate. *Applied Microbiology Biotechnology*, 28, 603-608.
- Takeuchi R., Suwa Y., Yamagishi T., Yonezawa Y., 2000. Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere*, 41, 1457-1462.
- Tanjore S., Viraraghavan T., 1997. Effect of oxygen on the adsorption of pentachlorophenol by peat from water. *Water, Air and Soil Pollution*, 100, 151-162.
- Tarighian A., Hill G., Headley J., Pedras S., 2003. Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 5, 61-65.

- Tartakovsky B., Manuel M.F., Beaumier D., Greer C.W., Guiot S.R., 2001. Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnology Bioengineering*, 73, 476-483.
- Tay J.H., Chen X.G., Jeyaseelan S., Graham N., 2001a. Optimising the preparation of activated carbon from digested sewage sludge and coconut husk. *Chemosphere*, 44, 45-51.
- Tay J.H., Chen X.G., Jeyaseelan S., Graham N., 2001b. A comparative study of anaerobically digested and undigested sewage sludges in preparation of activated carbons. *Chemosphere*, 44, 53-57.
- Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y., 2001c. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 227-233.
- Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y., 2001d. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J. Applied Microbiology*, 91, 168-175.
- Tay S., Moy B., Maszenan A., Tay J-H., 2005. Comparing activated sludge and aerobic granules as microbial inocula for phenol biodegradation. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 67, 708-713.
- Theis T.L., Ketchum L.H., Engelmann W.H., 1985. Biological catalysis of the oxidation of iron (II) in acid mine waters in a sequencing batch suspended film reactor. *Transactions*, 276, 1891-1899.
- Thomas S., Sarfaraz S., Mishra L.C., Iyengar L., 2002. Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 57-63.
- Tilche A., Bortone G., Malaspina F., Piccinini S., Stante L., 2001. Biological nutrient removal in a full-scale SBR treating piggery wastewater: results and modelling. *Water Science and Technology*, 43 (3), 363-371.
- Timmis K.N., 1997. Design of bacteria for environmental applications. *Proceedings of the International Symposium on Environmental Biotechnology (ISEB)*, 11-22.
- Timothy G.L., Suflita J.M., James M.T., 1989. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environmental Microbiology*, 55, 2773-2778.

- Tokuz R., 1991. Biotreatment of hazardous organic wastes using rotating biological contactors. *Environmental Progress*, 10, 198-204.
- Tomei M.C., Annesini M.C., Luberti R., Cento G., Senia A., 2003. Kinetics of 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 37, 3803-3814.
- Tomei M.C., Annesini M.C., Bussoletti S., 2004. 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor: kinetic study and effect of filling time. *Water Research*, 38, 375-384.
- Tong T.S., Mieczyslaw B., Magdalena P-J., Roman M., 1998. Phenol-degrading denitrifying bacteria in wastewater sediments. *Acta Microbiologica Polonica*, 47, 203-211.
- Topp E., Crawford R.L., Hanson R.S., 1988. Influence of readily metabolizable carbon on pentachlorophenol degrading *Flavobacterium sp.* *Applied Environmental Microbiology*, 54, 2452-2459.
- Topp E.M., Springael D., 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 1-8.
- Torrades F., Perez M., Mansilla H. D., Pera, J., 2003. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents. *Chemosphere*, 53, 1211-1220.
- Torres-Pérez J., Solache-Ríos M., Colín-Cruz A., 2008. Sorption and desorption of dye remazol Bellow onto a mexican surfactante-modified clinoptilolite-rich tuff and a carbonaceous material from pyrolysis of sewage sludge. *Water, Air and Soil Pollution*, 187, 303-313.
- Torrijos M., Moletta R., 1997. Winery wastewater depollution by sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 35 (1), 249-257.
- Trapido M., Hirvonen A., Veressinina Y., Hentunen J., Gunter R., 1997. Ozonation, ozone/UV and UV/H₂O₂ degradation of chlorophenols. *Ozone Science and Engineering*, 19, 75-96.
- Tripathi S., Allen D., 1999. Comparison of mesophilic and thermophilic aerobic biological treatment in sequencing batch reactors treating bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research*, 33, 836-846.

- Tschech A., Fuchs G., 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying *Pseudomonads*. *Archives of Microbiology*, 148, 213-217.
- Tseng R.L., Wu F.C., Juang R.S., 2003. Liquid-phase adsorption of dyes and phenols using pinewood and based activated carbons. *Carbon*, 41, 487-495.
- Tseng R.L., Tseng S.K., 2005. Pore structure and adsorption performance of KOH-activated carbons prepared from corncob. *Colloid and Interface Science*, 287, 428-437.
- Tsuda M., Tan H.M., Nishi A., Furukawa K., 1999. Mobile catabolic genes in bacteria. *J. Bioscience and Bioengineering*, 87, 401-410.
- Tsuneda S., Ogiwara M., Ejiri Y., Hirata A., 2006. High-rate nitrification using aerobic granular sludge. *Water Science and Technology*, 53 (3), 147-154.
- Urbain V., Block J.C., Manem J., 1993. Bioflocculation in Activated Sludge: an Analytical Approach. *Water Research*, 27, 829.
- Urbano F. J., Marinas J. M., 2001. Hydrogenolysis of organohalogen compounds over palladium supported catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 173, 329-345.
- USEPA, 1999, Wastewater technology fact sheet sequencing batch reactors.
- Vaidya P.D., Mahajani V.V., 2004. Studies in Hydrotreatment as a Unit Process to Destroy 4-Chlorophenol in Aqueous Stream Over Ru-Pd/TiO₂ Catalyst. *Appl. Catalysis. B*, 51, 21-31.
- Valentis G., Lesavre J., 1990. Wastewater treatment by attached-growth microorganisms on a geotextile support. *Water Science and Technology*, 22 (1-2), 43-51.
- Valo R.J., Häggblom M.M., Salkinoja-Salonen M.S., 1990, Bioremediation of chlorophenol containing simulated ground water by immobilized bacteria, *Water Research*, 24, 253-258.
- Van Limbergen H., Top E.M., Verstraete W., 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 50, 16-23.
- Van Loosdrecht M.C.M., Pot M.A., Heijnen J.J., 1997. Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science and Technology*, 35 (1), 41-47.

- Van Schie P.M., Young L.Y., 1998. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7), 2432-2438.
- Vandaele S., Bollen F., Thoeye C., November E., Verachtert H., Van Impe J.F., 2000. A comparison of SBR and SBBR for nitrogen removal out of ammonia rich sludge liquors and problems encountered. *Proceedings 2nd International Symposium on Sequencing Batch Reactor Technology*, 1, 67-74.
- Vargas A., Soto G., Moreno J., Buitrón G., 2000. Observed based time-optimal control of an aerobic SBR for Chemicals and petrochemical wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 42 (5-6), 163-170.
- Venkata Mohan V., Chandrasekhara R.N., Prasad K.K., Sarma P.N., 2005. Bioaugmentation of anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) from treating sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry*, 40, 2849-2857.
- Venkata Mohan S., Shailaja S., Ramakrishna M., Reddy K.B., Sarma P.N., 2006. Bioslurry phase degradation of DEP contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: influence of augmentation and substrate partition. *Process Biochemistry*, 41, 644-652.
- Venkata Mohan S., Mohanakrishna G., Veer Raghavulu S., Sarma P.N., 2007. Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by augmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia. *International J. Of Hydrogen Energy*, 32, 3284-3292.
- Venkata Mohan S., Falkentoft C., Venkata Nancharaiyah Y., McSwain B.S., Wattiau P., Wilderer P.A., Wuertz S., Hausner M., 2009. Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresource Technology*, 100, 1746-1753.
- Vinodgopal K., Kamat P.V., 1995. Electrochemically assisted photocatalysis using nanocrystalline semiconductor thin films. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 38, 401-410.
- Visvanathan C., Thu L.N., Jegatheesan V., Anotai J., 2005. Biodegradation of pentachlorophenol in a membrane bioreactor. *Desalination*, 183,455-464.

- Wang C.C., Lee C.M., Lu C.J., 1997. Effect of phenol on the biodegradation of 2,3,6-trichlorophenol by immobilized cells. *Xingda Gongcheng Xuebao*, 8, 1-8.
- Wang K.W., Baltzis B.C., Lewandowski G.A., 1996. Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose. *Biotechnology Bioengineering*, 51, 87-94.
- Wang S.G., Liu X.W., Gong W.X., Gao B.Y., Zhang D.H., Yu H.Q., 2007a. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 98, 2142-2147.
- Wang S.G., Liu X.W., Zhang H.Y., Gong W.X., Sun X.F., Gao B.Y., 2007b. Aerobic granulation for 2,4-dichlorophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Chemosphere*, 69, 769-775.
- Wang S.J., Loh K.C., 1999a. Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate. *Biodegradation*, 10, 261-269.
- Wang S.J., Loh K.C., 1999b. Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme and Microbiology Technology*, 25, 177-184.
- Wang S.J., Loh K.C., 2000a. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of a conventional carbon source. *Biotechnology Bioengineering*, 68, 437-447.
- Wang S.J., Loh K.C., 2000b. New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Research*, 34, 3786-3794.
- Wang S.J., Loh K.C., 2001. Biotransformation kinetics of *Pseudomonas putida* for cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of sodium glutamate. *Biodegradation*, 12, 189-199.
- Wang S.J., Loh K.C., Chua S.S., 2003. Prediction of critical cell growth behaviour of *Pseudomonas putida* to maximize the cometabolism of 4-chlorophenol with phenol and sodium glutamate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 422-430.
- Warhurst A.M., McConnachie G., Pollard S., 1997. Characterization and applications of activated carbon produced from *Moringa oleifera* seed husks by single-step steam pyrolysis. *Water Research*, 31, 759-766.

- Watanabe K., Hino S., Takahashi N., 1996. Effects of exogenous phenol-degrading bacteria on performance and ecosystem of activated sludge. *J. Fermentation Bioengineering*, 82, 291-298.
- Werther J., Ogada T., 1999. Sewage sludge combustion. *Prog. Energy Combustion Science*, 25, 55-116.
- Westmeier F., Rehm H.J., 1987. Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 36, 78-83.
- White D.M., Schnabel W., 1998. Treatment of cyanide waste in sequencing batch biofilm reactor. *Water Research*, 32, 254-257.
- WHO (World Health Organization), 1989. Environmental Health Criteria, 93, Chlorophenols other than pentachlorophenol, Ginebra, Suiza.
- Wiersma A., Van de Sandt E., Makkee M., Moulijn J. A., 2001. Deactivation of palladium on activated carbon in the selective hydrogenolysis of CCl_2F_2 (CFC-12) into CH_2F_2 (HFC-32). *Applied Catalysis A: Gen.*, 212, 223-238.
- Wieser M., Eberspacher J., Vogler B., Lingens F., 1994. Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the *meta* cleavage product of 4-chlorocatechol. *Fems Microbiology Letters*, 116, 73-78.
- Wiggins B.A., Jones S.H., Alexander M., 1987. Explanation for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 791-796.
- Wigmans T., 1989. Industrial aspects of production and use of activated carbons. *Carbon*, 27, 13-22.
- Wilderer P.A., Rubio M.A., Davids L., 1991. Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors. *Water Research*, 25, 1307-1313.
- Wilderer P.A., 1992. Sequencing batch biofilm reactor technology. *Harnessing Biotechnol. for the 21st century*. American Chemical Society, 475-479.
- Wilderer P.A., Röske I., Ueberschär A., Davids L., 1993. Continuous flow and sequenced batch operation of biofilm reactor: A comparative study of shock loading responses. *Biofouling*, 6, 295-304.

- Wilderer P.A., Arnz P., Arnold E., 2000. Application of biofilms and biofilm support materials as a temporary sink and source. *Water, Air and Solid Pollution*, 123, 147-158.
- Wilderer P.A., Irvine R.L., Goronszy M.C., 2001. Sequencing batch reactor technology. Scientific and Technical Report, 10, IWA publishing.
- Wilderer P.A., McSwain B.S., 2004. The SBR and its biofilm application potentials. *Water Science and Technology*, 50 (10), 1-10.
- Wobus A., Ulrich S., Roeske, I., 1995. Degradation of chlorophenols by biofilms on semi-permeable membranes in two types of fixed bed reactors. *Water Science and Technology*, 32 (8), 205-212.
- Woods S.L., Ferguson J.F., Benjamin M.M., 1989. Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environmental Science and Technology*, 23, 62-68.
- Woolard C.R., Irvine R.L., 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environmental Research*, 66, 230-235.
- Woolard C.R., 1997. The advantages of periodically operated biofilm reactors for the treatment of highly variable waste water. *Water Science and Technology*, 35, 199-206.
- Wu F.C., Tseng R.L., Juang R.S., 2001. Adsorption of dyes and phenols from water on the activated carbons prepared from corncob wastes. *Environmental Technology*, 22, 205-213.
- Wu F.C., Tseng R.L., Juang R.S., 2005. Comparisons of porous and adsorption properties of carbons activated by steam and KOH. *J. of Colloid and Interface Science*, 283, 49-56.
- Wu F.C., Tseng R.L., 2008. High adsorption capacity NaOH-activated carbon for dye removal from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 1256-1267.
- Wu W.M., Bhatnagar L., Zeikus J.G., 1993. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 389-397.
- Xia C., Xu J., Wu W., Luo Q., Chen J., Zhang Q., Liang X., 2003. Catalytic hydrodechlorination of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether under mild conditions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 45, 281.
- Yamamoto K., Win K.M., 1991. Tannery wastewater using a sequencing batch membrane reactor. *Water Science and Technology*, 23, 1639-1648.

- Yap L.F., Lee Y.K., Poh C.L., 1999. Mechanism of phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 51, 833-840.
- Ye F.X., Shen D.S., Feng X.S., 2004. Anaerobic granule development for removal of pentachlorophenol in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Process Biochemistry*, 39, 1249-1256.
- Ye F.X., Shen D.S., 2004. Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere*, 54, 1573-1580.
- Yi S., Zuang W-Q., Wu B., Tay S., Stephen T-L., Tay J-H., 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by aerobic granules in a sequencing batch reactor. *Environmental Science and Technology*, 40 (7), 2396-2401.
- Yu H.Q., Gu G.W., Song L.P., 1996. The effect of fill mode on the performance of sequencing-batch reactors treating various wastewaters. *Bioresource Technology*, 58, 49-55.
- Yu J., Ward O.P., 1994. Studies on factors influencing the biodegradation of pentachlorophenol by a mixed bacterial culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 33, 209-221.
- Yu Z., Mohn W.W., 2001. Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents. *Water Research*, 35, 883-890.
- Yuan G., Keane M., 2003. Liquid phase hydrodechlorination of chlorophenols at 273 K. *Catalysis Communications*, 4, 195-201.
- Yuan W., Bandosz T. J., 2007. Removal of hydrogen sulfide from biogas on sludge-derived adsorbents. *Fuel*, 86, 2736-2746.
- Yum K-J., Pierce J.J., 1998. Biodegradation kinetics of chlorophenols in immobilized-cell reactors using a white-rot fungus on wood chips. *Water Environmental Research*, 70, 205-213.
- Yurii I., Matatov-Meytal, Moshe Sheintuch, 1998. Catalytic Abatement of water Pollutants. *Industrial Engineering Chemistry*, 37, 309-326.

- Zazo J.A., Casas J.A.; Molina C.B., Quintanilla A., Rodriguez J.J., 2007. Evolution of ecotoxicity upon Fenton's oxidation of phenol in water. *Environmental Science and Technology*, 41 (20), 7164-7170.
- Zazo J.A., Casas J.A., Mohedano A.F., Rodriguez J.J., 2009. Semicontinuous Fenton oxidation of phenol in aqueous solution. A kinetic study. *Water Research*, 43, 4063-4069.
- Zhai Y.B., Wei X.X., Zeng G.M., Zhang D.J., Chu K.F., 2004. Study of adsorbent derived from sewage sludge for the removal of Cd^{2+} , Ni^{2+} in aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*, 38, 191-196.
- Zhang F-S., Nriagu J.O., Itoh H., 2005. Mercury removal from water using activated carbons derived from organic sewage sludge. *Water Research*, 39, 389-395.
- Zhou J.Z., Fries M.R., Chee-Sanford J.C., Tiedje J.M., 1995. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus totulyticus* sp. *International Journal Systematic Bacteriology*, 45, 500-506.
- Zilli M., Converti A., Lodi A., Del Borghi M., Ferraiolo G., 1993. Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 693-639.
- Zilouei H., Guieysse B., Mattiasson B., 2006. Biological degradation of chlorophenols in packed-bed bioreactors using mixed bacterial consortia. *Process Biochemistry*, 41, 1083-1089.
- Zima B.E., Díez L., Kowalczyk W., Delgado A., 2007. Sequencing batch reactor (SBR) as optimal method for production of granular activated sludge (GAS)-fluid dynamic investigations. *Water Science and Technology*, 55 (8-9), 151-158.
- Zouari H., Labat M., Sayadi S., 2002. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology*, 84, 145-150.
- Zwerger W., Beler Baykal B., Wilderer P.A., 2000. Application of granular zeolite as support material for biofilms and as temporary sink for ammonium. En *Proceedings of the 2nd International Symposium on Sequencing Batch Reactor Technology*, 1, 99-101.