

**Tesis
Doctoral**

**APLICABILIDAD DE LOS LECHOS INUNDADOS
EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
INDUSTRIALES CON ALTA CARGA EN
COMPUESTOS NITROGENADOS
Y FENOLICOS EN MEDIO SALINO**



Universidad de Granada
Dpto. de Ingeniería Civil
Dpto. de Microbiología
Instituto del Agua

**Ángel Fermín Ramos Ridao
Granada, 2003**



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL.
ÁREA DE TECNOLOGÍAS DEL MEDIO
AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DEL AGUA**

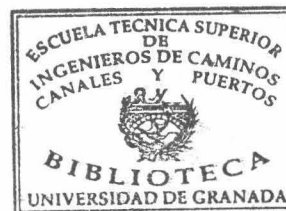


ÁNGEL FERMÍN RAMOS RIDAO

TESIS DOCTORAL

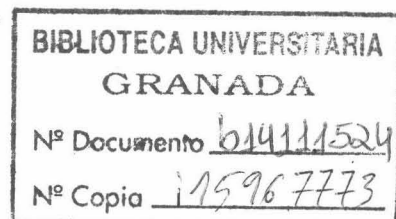
Para la obtención del

**GRADO DE DOCTOR DE LA
LICENCIATURA EN CIENCIAS
AMBIENTALES**



**Directores:
ERNESTO HONTORIA GARCÍA
JESÚS GONZÁLEZ LÓPEZ**

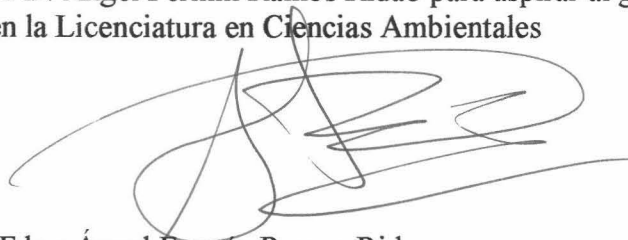
GRANADA, 2003



UNIVERSIDAD DE GRANADA

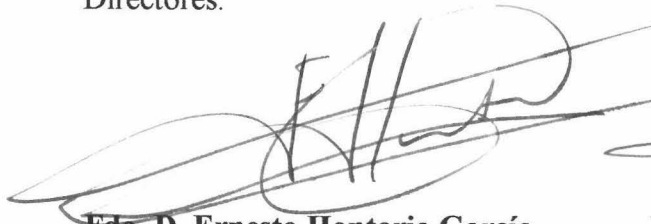
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL. ÁREA DE
TECNOLOGÍAS DEL MEDIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DEL AGUA**

Memoria presentada por D. Ángel Fermín Ramos Ridao para aspirar al grado de
Doctor en la Licenciatura en Ciencias Ambientales




Fdo.: Ángel Fermín Ramos Ridao

Directores.

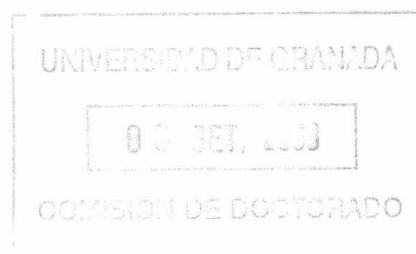


Fdo. D. Ernesto Hontoria García
Catedrático de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
E.T.S.I. Caminos, Canales y Puertos.
Universidad de Granada.



Fdo. D. Jesús González López
Catedrático de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada.

GRANADA, 2003



Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología (IFD97-0477), y realizado gracias a la Empresa DSM DERETIL S.A, al Instituto del Agua, Departamento de Ingeniería Civil y Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.

AGRADECIMIENTOS

Después de varios años de trabajo de laboratorio y redacción de toda la documentación obtenida, se llega a un momento donde debo reflejar en pocas palabras lo que posiblemente no se pueda; agradecer a las distintas personas que de una manera u otra han hecho posible que yo pudiera un día concluir con la lectura y defensa de esta Tesis.

Empiezo por los artífices primeros de la idea; mis Directores Ernesto Hontoria García y Jesús González López. Gracias a ellos, no solo he podido indagar en el mundo de la investigación, sino que además con sus conocimientos y trabajo esta tesis ha podido llegar a buen puerto.

A Miguel A. Gómez y Jorge I. Pérez por sus grandes consejos y recomendaciones aplicables a esta investigación y a la vida, no importando el lugar de encuentro o cita. Y por descontado, a sus mujeres, Lola y Chari, por atender y aguantarnos en nuestras discusiones científicas.

A mis compañeros y compañeras, Begoña Moreno, Montserrat Zamorano, las dos chicas del Área por su ánimo y empuje, Jesús Beas, Francisco Osorio, Fernando Calvo, Antonia Gálvez, José Manuel Poyatos, Javier Ordóñez, Antonio Menéndez, M^a Carmen Rubio, y como no, a Manolo Prados, y a otros muchos integrantes de la Escuela Técnica Superior de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad de Granada.

Al Instituto de Agua, en especial a Florentina Sáez, Juan Gálvez, Clementina Pozo, Belén Rodelas por su alto conocimiento y ayuda en la biología molecular, Beatriz Gómez, Mar Sánchez, Ramiro Vilchez, Belén Juárez, M^a Victoria Martínez, Mónica Ferrer, Luisa López, Concepción Calvo, Marisa Molina, Luis Rueda, Luis Atero, al resto de instituto con mención a Luis Cruz, Pepe Benavente, Elo, Kaltoum, Quique, Ada, Sergio, Deborahgh, que con su presencia y en otras ocasiones ayuda me han facilitado el camino hacia esta meta, y por supuesto, a Ana Quirante, por su ayuda inestimable y Almudena de la Rúa por su apoyo y cantes de mañana que siempre nos ha animado.

A José Luis, Bernardo, Luis Ángel y a última hora y no menos importante a Irene, por su gran amistad que nunca han mirado ni hora, día y mes para ofrecerme un momento de reflexión, y así mismo, a José Pérez Martos.

Mis últimas palabras de agradecimiento no pueden ser nada más que para mi familia. ¿Qué decirle a mi madre? No siempre a entendido los agostos trabajados en Granada, pero si ha tenido paciencia y buenos consejos. A mis hermanos, Ignacio, Paco, Ginés y Antonio, y a mis cuñadas y sobrinos, gracias por vuestra cercanía no física pero si emocional.

Es bastante fácil que me haya dejado a alguien, pues un especial agradecimiento para ellos y un sincero "perdonadme".

GRACIAS

*“La Ciencia será siempre una búsqueda,
jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, no una llegada.”*
(Kart Popper)

RESUMEN

El medio ambiente litoral europeo constituyen importantes recursos económicos y son áreas naturales de alto interés ecológico que en los últimos años han recibido altas concentraciones de diversos contaminantes procedentes de las distintas aguas residuales, principalmente industrial y urbana. Esta contaminación es causante de cambios en el ecosistema que ponen en peligro no solo los hábitats naturales sino también la salud pública. Para proteger este recurso, los distintos marcos jurídicos han establecido límites de vertido para numerosos contaminantes, entre ellos, amonio, nitrato y fenol, implicando de esta manera la necesidad de tratar los distintos efluentes que viertan a dicho medio. Entre los distintos tratamientos para estos contaminantes, los tratamientos biológicos se presentan como una alternativa viable tanto económica como técnicamente, destacando entre ellos, las tecnologías basadas en biopelícula fija y en especial los sistemas de Lechos Inundados por las múltiples ventajas que posee.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo la aplicación de la tecnología de los sistemas de lechos inundados en el tratamiento de eliminación de compuestos nitrogenados y fenólicos procedentes de un efluente salino industrial, mediante el esquema de proceso de pre-desnitrificación y utilizando como material de relleno o soporte de la biopelícula un residuo de ladrillo.

A partir de los resultados obtenidos se ha podido concluir que, la tecnología y el sistema se muestra viable desde el punto de vista biológico, con un material de relleno con capacidad de regular el pH del medio líquido en el que se encuentre inundado. Proceso, donde la carga hidráulica idónea, para la reducción de la DQO, fenol y nitrógeno, está comprendida entre $0.7-0.8 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$, y en donde se obtiene una nitrificación completa para un caudal de aireación de $13.58 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ hora}$.

A mi padre.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1.- Impacto ambiental de efluentes con alta carga en compuestos nitrogenados y fenólicos en ecosistemas costeros</i>	3
1.1.1.- Eutrofización	4
1.1.1.1.- Introducción	4
1.1.1.2.- Efectos de la eutrofización en el medio marino	5
1.1.2.-Compuestos fenólicos	7
1.1.2.1.- Introducción	7
1.1.2.2.- Efectos sobre la salud humana y medio marino	8
<i>1.2.- Problemática específica en la costa norte de Almería</i>	10
<i>1.3.- Marco normativo. Vertidos en zonas costeras</i>	11
1.3.1.- Legislación Europea	15
1.3.2.- Legislación Nacional	17
1.3.3.- Normativa de aplicación para la Comunidad Autónoma de Andalucía	18
2.- TECNOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES INDUSTRIALES CON ALTA CARGA EN COMPUESTOS NITROGENADOS Y FENÓLICOS	23
3.- TRATAMIENTO BIOLÓGICO DEL EFLUENTE INDUSTRIAL EN MEDIO SALINO	27
<i>3.1.- Depuración biológica en medio salino</i>	27
<i>3.2.- Ciclo del Nitrógeno</i>	29
3.2.1.- Nitrificación	32
3.2.1.1.- Fases de la nitrificación	33
3.2.1.2.- Factores que afectan a la nitrificación	37
3.2.2.- Desnitrificación	43
3.2.2.1.- Factores que afectan a la desnitrificación	46
<i>3.3. Degradación del fenol</i>	52
3.3.1.- Degradación del fenol en medio salino	55
3.3.2.- Rutas metabólicas de degradación de compuestos aromáticos	56
3.3.2.1.- Rutas aeróbicas	56

3.3.2.2.- Rutas anaeróbicas	59
3.4.-Consideraciones sobre el concepto de Biopelícula	59
3.4.1.- Concepto	59
3.4.2.- Características físico-químicas y microbiológicas	61
3.4.3.- Formación de la biopelícula	64
3.5.- Procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación	69
3.5.1.- Sistemas para aplicar los procesos de nitrificación-desnitrificación	69
3.6- Lechos Inundados. Fundamentos	73
4.- OBJETIVOS	87
4.1- <i>Objetivo principal</i>	87
4.2.- <i>Objetivos secundarios</i>	87
5.- VARIABLES Y PARÁMETROS	90
5.1.- <i>Variables previas</i>	90
5.2.- <i>Parámetros previos</i>	91
6.- MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS	94
6.1.- <i>Característica del efluente industrial</i>	94
6.2.- <i>Métodos físicos-químicos</i>	96
6.2.1.- Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O)	96
6.2.2.- Nitrógeno Total	99
6.2.3.- Nitratos	100
6.2.4.- Nitritos	103
6.2.5.- Amonio	104
6.2.6.- Fenol	106
6.2.7.- Cloruros	107
6.2.8.- pH	108
6.2.9.- Oxígeno disuelto	109
6.2.10.- Aireación	109
6.2.11.- Temperatura	110
6.2.12.- Turbidez	110
6.2.13.- Salinidad	111
6.3.- <i>Métodos microbiológicos</i>	112
6.3.1.- Microorganismos mesófilos totales	112

6.3.2. Determinación de la actividad de la biopelícula	113
6.4.- Estudio sobre la biopelícula	115
6.4.1.- Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	115
6.4.1.1.- Método de extracción con EDTA	115
6.4.1.2.-Método de extracción con etanol	116
6.4.1.3.- Método de extracción con formaldehído	117
6.4.2.- Determinación de la composición química del material extracelular	118
6.4.2.1.- Carbohidratos	118
6.4.2.2.- Proteínas	120
6.4.2.3.- Carbono orgánico total (TOC)	121
6.4.3.- Estudios de biodiversidad en la biopelícula	121
6.4.3.1.- Extracción del DNA de las columnas	124
6.4.3.2.- Amplificación de fragmentos de ADN codificantes del ARN ribosómico 16S (ADNr 16 S)	125
6.4.3.3.- Concentración del producto de la PCR anidada	130
6.4.3.4.- Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)	130
7.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE	133
7.1.- Plan de trabajo	133
7.2.- 1ª Fase de la Investigación a escala de laboratorio	135
7.2.1.- Metodología de la 1ª Fase	135
7.2.1.1.- Ensayos sobre la capacidad reguladora del material soporte frente al pH del medio líquido	135
7.2.1.1.1.- Descripción de la planta experimental utilizada en el ensayo de pH.	135
7.2.1.1.2.- Variables y parámetros utilizados en el ensayo	136
7.2.1.2.- Estudios de la capacidad de formación de la biopelícula con el propio influente	136
7.2.1.2.1.- Variables y parámetros utilizados en la formación de la biopelícula	137
7.2.1.3.- Estudios previos del funcionamiento del prototipo de planta de lechos inundados a escala de laboratorio	139
7.2.1.3.1.- Descripción del prototipo de planta de lechos inundados	139
7.2.1.3.2.- Variables y parámetros utilizados en el ensayo	143
7.2.2.- Resultados y Discusión	144
7.2.2.1- Capacidad reguladora del material soporte sobre el pH	

del medio líquido _____	144
7.2.2.2.- Capacidad de formación de la biopelícula con el propio influente _____	150
7.2.2.3.- Funcionamiento de la planta prototipo de lechos inundados _____	157
7.2.3.- Conclusiones _____	157
7.3.- 2ª Fase de la investigación a escala de laboratorio _____	158
7.3.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio _____	158
7.3.2.- Variables y parámetros _____	162
7.3.3.- Resultados y discusión _____	163
7.3.4.- Conclusiones _____	177
7.4.- 3ª Fase de la investigación a escala de laboratorio _____	178
7.4.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio _____	178
7.4.2.- Variables y parámetros _____	180
7.4.3.- Resultados y discusión _____	182
7.4.4.- Conclusiones _____	187
7.5.- 4ª Fase de la investigación a escala de laboratorio _____	188
7.5.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio _____	188
7.5.2.- Variables y parámetros _____	189
7.5.3.- Resultados y discusión _____	189
7.5.4.- Conclusiones _____	193
8.- INVESTIGACIÓN DE FONDO _____	195
8.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio definitiva _____	196
8.2.- Modificación de variables y parámetros _____	198
8.3.- Plan de Trabajo _____	200
8.4.- Resultados y discusión _____	203
8.4.1.- Eliminación de la DQO del sistema _____	203
8.4.2.- Eliminación del fenol del sistema _____	214
8.4.3.- Eliminación del nitrógeno del sistema _____	224
8.4.4.- Lavado del sistema _____	251
8.5.5.- Estudio de la biopelícula del proceso de nitrificación-desnitrificación _____	257
9.- CONCLUSIONES _____	270
10.- LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN _____	271
11.- BIBLIOGRAFÍA _____	273

Introducción

1.- INTRODUCCIÓN

El agua constituye una necesidad primordial para la salud y la supervivencia de la humanidad, por lo que no es exagerado considerarla como uno de los derechos humanos básicos (Pérez and Espigares, 1999) y su acceso una necesidad esencial del ser humano, por lo que debe ser protegida, defendida y tratada como tal (Jackson, 2001).

Desde sus orígenes, el hombre ha necesitado ubicarse cerca de corrientes de agua, pues en el cuerpo humano, el agua constituye aproximadamente el 70 % de su masa, y necesita alrededor de 10 litros de agua/Kg de tejido al año, lo que significa una enorme cantidad de agua potable (López, 2002).

Estas necesidades de abastecimiento se vieron multiplicadas al utilizar el agua para la agricultura, comenzando así los primeros asentamientos; pero es a partir de finales del siglo XVIII con la Revolución Industrial cuando tiene que desviarse parte de esta agua para el desarrollo de las distintas industrias, de ahí, que se pueda definir 3 grandes bloques como demandantes de agua: consumo humano, agricultura e industria, siendo la agricultura la que mayor cantidad precisa y la industria la que más problemas de contaminación genera.

La industria precisa de agua bien continental o marina para sus diferentes procesos o lavados. La cantidad y calidad disponible de la misma así como, por el transporte del producto y materias primas va a condicionar la localización de la industria, que se van a ubicar, por lo general, en zonas costeras. Hay que pensar que: los mares constituyen más del 97% de la totalidad del agua líquida de nuestro planeta, las sustancias químicas orgánicas e inorgánicas contenidas en el mar que teóricamente pueden ser extraídos de él son abundante y diferentes (López, 2002) y el espacio litoral presenta mayores posibilidades para la implantación de centros o intercambiadores multimodales (Barragán, 1994) que facilitan el transporte de mercancías o productos.

No es de extrañar que los mayores polígonos industriales andaluces se ubiquen en el espacio litoral; se ha de tener en cuenta además que ésta comunidad autónoma se encuentra en su mayoría bajo condiciones de baja pluviometría y por tanto con escasez de aguas continentales.

En este sentido, dentro del marco litoral y más concretamente el andaluz, la contaminación de origen industrial guarda directa relación con la ubicación de las grandes industrias, básicas o pesadas, de elevada carga contaminante, bien de forma aislada o formando complejos industriales. Son numerosas las áreas donde se han detectado vertidos industriales en el litoral almeriense (Vera, Carboneras, Almería Capital, El Ejido, Adra, etc.), las proximidades de los puertos de Motril y Málaga y, sobre todo, el entorno de los complejos industriales de Bahía de Algeciras, Bahía de Cádiz y Huelva. En los casos de Algeciras y Huelva se han dado periódicamente episodios graves de contaminación que han originado el cierre de playas de baño, mortandad masiva de peces y la prohibición temporal de pesca de moluscos y crustáceos (C.M.A., 1998).

Hasta no hace mucho, el mar se ha considerado como un vertedero natural, ya que, por su extensión y por su capacidad de autodepuración, podía utilizarse como un receptor ilimitado que podía asimilar cualquier material sólido o líquido que se quisiera tirar o depositar en él.

Los vertidos industriales, que a través de los ríos, cloacas y emisarios submarinos llegan al litoral, incluyen desde residuos inertes (chatarras, vidrios, etc.) a residuos tóxicos y peligrosos que contienen sustancias estables, tóxicas y bioacumulables (Spacie *et al.*, 1985), como metales pesados (mercurio, cadmio, plomo, etc.), organoclorados, compuestos fenólicos, que suponen un problema ambiental y de salud pública, pasando por las aguas residuales que contienen materia orgánica, nutrientes, sólidos en suspensión, microorganismos, que aparentemente pueden dar lugar a un efecto favorable para la comunidad biológica por la entrada de nutrientes orgánicos e inorgánicos pero, a la larga, o por las grandes cantidades de estos nutrientes se producen cambios en las cadenas tróficas y unas especies se sustituyen por otras con reducción de la biodiversidad (Lutz-Arend *et al.*, 2000). Además, pueden dar lugar (Matsuoka, 1999) al desarrollo de

algas planctónicas (mareas rojas) que si están formadas por dinoflagelados tóxicos, pueden ser catastróficas para los peces y moluscos, provocando episodios dramáticos para economías basadas en la pesca y turismo.

Así pues, la presencia de estas sustancias en el medio marino limita el uso de este recurso natural, de manera que su protección y en consecuencia de las aguas litorales constituyen una preocupación creciente en el ámbito científico y político, que incumbe resolver a todos los países, puesto que, en última instancia, las consecuencias pueden tener un alcance global.

En este ámbito, se han desarrollado distintas normativas europeas, nacionales y autonómicas para la protección del medio marino, avanzando así en el esfuerzo por disponer de los instrumentos adecuados que permitan poner freno al deterioro del espacio litoral mediante el control y corrección de los factores y los efectos que alteran o modifican la situación ambiental de este medio.

Estas normativas, han establecido la necesidad de evitar el vertido de sustancias que por su bioacumulación, toxicidad y persistencia pueden provocar en el medio litoral procesos degenerativos irreversibles, fijando para ello, límites máximos de vertido para una lista de parámetros, entre los que se encuentran compuestos nitrogenados (Nitrato, amonio) y fenólicos, obligando a las distintas industrias implicadas a tratar sus efluentes.

1.1.- IMPACTO AMBIENTAL DE EFLUENTES INDUSTRIALES CON ALTA CARGA EN COMPUESTOS NITROGENADOS Y FENÓLICOS EN ECOSISTEMAS COSTEROS

Existen industrias, principalmente del sector químico-farmacéuticas que en el supuesto de no tratar sus efluentes ricos en sustancias nitrógenadas y fenólicas, va a provocar una descarga masiva de nitrógeno y fenol en las aguas receptoras provocando su contaminación. En el caso del nitrógeno, su efecto más importante es la eutrofización del medio. El nitrógeno es generalmente un nutriente limitante en ecosistemas acuáticos, por lo tanto su presencia estimula la producción primaria (Wulff *et al.*, 1990; Caumette *et al.*,

1996). Con respecto al fenol, los efectos están más relacionados con su capacidad de causar deterioros fisiológicos sobre la vida salvaje (Lye, 2000) y humana (Kavlock *et al.*, 1996).

1.1.1.- Eutrofización

1.1.1.1. Introducción

La eutrofización ha sido considerada como una de las más amenazantes formas de contaminación acuática aunque en el entorno marino en general, por su gran poder de dilución, le pone freno a su desarrollo. Ya en los años 40 y 50, la eutrofización se consideraba como un problema ambiental, alcanzando su máxima inquietud en los años 60 y 70, convirtiéndose hoy por hoy en uno de los problemas más importantes en lagos, estuarios y aguas costeras (Harper, 1992).

Entre las muchas definiciones que existen, la eutrofización puede ser definida como:

✓ El aumento de nutrientes en agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta (Decreto 54/199, de 2 de marzo, 1999. BOJA)

✓ El proceso por el cual un incremento de nutrientes causa un cambio en el estatus nutricional de la vida existente en el agua (Richardson and Jorgensen, 1996).

En las aguas marinas, la eutrofización antrópica, semejante a la que hoy se ha generalizado en los lagos, embalses, etc., aparece cerca de las costas o en mares cerrados. Ocurre que en muchas áreas no es el fósforo, sino el nitrógeno el factor limitante siguiendo la Ley de los Mínimos, uno de los Principios de la Ecología (Odum, 1971) del

desarrollo del planctón. Según Margalef (1995), las cianobacterias fijadoras de nitrógeno son muy frecuentes en las aguas dulces; pero rarísimas en el mar. Quizá por esto el nitrógeno es con mucha más frecuencia factor limitante en el medio marino.

El Mar Mediterráneo constituye un caso especial entre los grandes mares del mundo por las determinadas características de gran recinto semicerrado, con zonas con especiales circunstancias de contaminación y de eutrofización. La primera publicación científica más o menos relacionada, en el Mar Mediterráneo, con el problema marino que ocupa, fue realizada por Heldt en 1927, quién publicó un trabajo descriptivo de un caso en Túnez, aunque no utilizó concretamente el termino eutrofización. El primero en referirse a la eutrofización antropogénica en el Mediterráneo fue Gilet en 1960, quién describió un caso extremo con anoxia, en el puerto de Marsella (López, 2002).

1.1.1.2. Efectos de la Eutrofización en el medio marino

Los efectos de la eutrofización son diversos. Con la disponibilidad de macronutrientes (nitrógeno, fósforo), la producción primaria de algas y macrofitas se ve estimulada. Las consecuencias más frecuentemente observadas cuando se alcanza un estado eutrófico se puede resumir en los siguientes fenómenos: biomasa más abundante, coloración de las aguas, reducción de la transparencia, déficit de oxígeno en las capas más profundas, pérdida de biodiversidad, olor producido por el ambiente reductor generado.

De forma más estructural se produce una serie de procesos que desencadena un conjunto de cambios y efectos, siendo entre los más relevantes o destacables los siguientes:

Cambio en la estructura y función del ecosistema.

La eutrofización origina un gran cambio en la composición de especies, estructura y función de las comunidades marinas sobre una amplia zona. La respuesta general de las comunidades fitoplanctónicas es un incremento de la biomasa y productividad (Vollenweider, 1992; Riegman, 1995). Una de las alteraciones más

comunes, muy bien observada (Oviatt *et al.*, 1989; Kimor, 1992a, b; Vollenweider, 1992; Hallengraef, 1995) es el cambio de diatomeas a dinoflagelados, incluso un cambio de tamaño del fitoplancton, variando hacia la dominancia de tamaños pequeños, nanoplanctónicos. Una respuesta similar se ha observado que ocurre con la comunidad zooplanctónica, copépodos herbívoros reemplazados por tamaños menores y zooplancton gelatinosos (Regner, 1991).

De igual manera, la eutrofización altera la diversidad, estructura trófica de la comunidad de peces (Riegman, 1995; Wu, 1982). Además, da lugar a periodos de hipoxia/anoxia causando la mayoría de la mortandad de peces y la destrucción de la comunidad marina (Diaz and Rosenberg, 1995), apareciendo especies oportunistas, cambiando por tanto la composición de especies. Este fenómeno es bien conocido en el sur del Mediterráneo (Caumette, *et al.*, 1996, 1980; Pugnetti, *et al.*, 1992)

“Blooms” de algas y sustancias tóxicas.

Ocurre que en ocasiones el mar se colorea de rojo, de ocre o de amarillo, y presenta connotaciones tóxicas, tiene lugar entonces lo que se conoce por marea roja: también se les llama, según localidades, marejada roja, aguaje, purgas de mar, ciguatera, hemotalasia, florecimiento o “bloom”, etc. Ciertas manifestaciones de esta naturaleza son estrictamente naturales y su detección es muy antigua, otras van precedidas de eutrofización antropogénicas (López, 2002).

El mayor impacto de la eutrofización es el crecimiento acelerado de algas y la producción de algas tóxicas (mareas rojas). Estas mareas ejercen consecuencias desastrosas para el turismo, la pesca y salud pública. Un ejemplo, en 1988, una marea de *Chrysochromunila polylepis*, alga tóxica flagelada, ocupó en Noruega una extensión de 75.000 km², provocando pérdidas muy significativas (GEASMP, 1990).

La producción por parte de algunas algas de biotoxinas supone uno de los mayores peligros para la salud humana. El riesgo viene asociado por el consumo de pescado y marisco contaminados por esas biotoxinas, por el contacto directo con estas algas tóxicas que puede incluso causar dermatitis y conjuntivitis. En la tabla 1.1 (Wu,

Introducción

1999), aparecen diversos tipos de toxinas asociada a las algas que las producen y los efectos sobre la salud pública. En Francia en 1983, cerca de 3.000 personas fueron afectadas por toxinas con efectos gastrointestinales después de consumir marisco expuesto a una marea de *Dinophysis* spp. (Lassus *et al.*, 1991).

Tabla 1.1.- Tipos más comunes de algas marinas que producen toxinas con riesgo para la salud humana.

Efectos sobre la salud humana	Especies	Toxinas
Parálisis	<i>Gonyaulax</i> spp., <i>Alexandrium</i> spp.	Saxitoxina, gonyautoxina
Neurotóxicos	<i>Gymnodinium breve</i>	Brevetoxina
Diarreas	<i>Dinophysis</i> sp. <i>Prorocentrum</i> spp. <i>Gyrodinium aureolum</i>	Ácido Okadiaco
Amnesia	<i>Nitzschia pungens</i>	Ácido Domóico

En la figura 1.1 se encuentra señalados puntos de la costa europea en donde suelen aparecer destacadamente la contaminación por eutrofización.

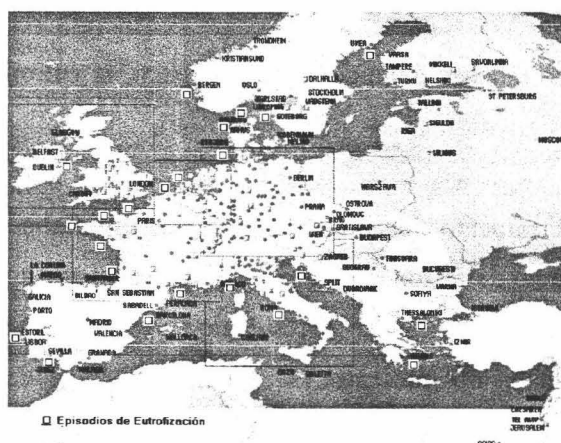


Figura 1.1.- Episodios de eutrofización marina en la costa europea (López, 2002).

1.1.2.- Compuestos fenólicos.

1.1.2.1. Introducción.

Los compuestos fenólicos son contaminantes presentes en los efluentes de multitud de industrias como refinerías, productoras del carbón, industrias textiles,

industrias del plástico, y farmacéuticas entre otras, pudiéndose alcanzar niveles de hasta más de 6.000 mg/l de fenol (Croos *et al.*, 1982).

Sus dobles enlaces entre los átomos de carbono, y en especial la presencia de anillos aromáticos, incrementa la toxicidad de estos compuestos (Demirer y Speece, 1998).

1.1.2.2. Efectos sobre la salud humana y medio marino.

En los últimos años, se han observado evidencias que indican que están ocurriendo cambios en la fecundidad y reproductividad de animales y humanos (Harrison *et al.*, 1997).

Estudios en laboratorios indican que detrás de estos cambios hay sustancias químicas producidas por el hombre que en el medio ambiente poseen un potencial disruptor sobre el sistema endocrino, actuando con propiedades estrogénicas. Un gran número de publicaciones sugiere que una amplia gama de problemas de salud humana y efectos sobre la vida animal pueden ser debidos a estos disruptores hormonales (Colborn and Clement, 1992; DEPA, 1995; IEH, 1995; German FEA, 1996; Kavlock *et al.*, 1996). Los efectos humanos que pueden aparecer por la exposición a estas sustancias, incluyen (Harrison *et al.*, 1997):

- ✓ Incremento en la incidencia de cáncer testicular, próstata y de mama.
- ✓ Reducción en la cantidad y calidad del esperma.
- ✓ Incremento en la incidencia de criptorchidismo (descenso testicular) y hipospadias (malformación en el pene).
- ✓ Incremento en la incidencia de quistes en los ovarios de las mujeres.
- ✓ Alteración física y mental en el desarrollo de niños, así como alteraciones en el desarrollo fetal.

Entre esas sustancias con propiedades estrogénicas se encuentran compuestos fenólicos como : Alkifenol, nonilfenol, Bisfenol-A, etc

Aunque es verdad que no hay evidencias en estudios sobre humanos que confirmen la causalidad entre exposición y efectos (Harrison, 1997), sí existen experiencias con animales (Sonnenschein, 1998) que los demuestran con cierta claridad.

Si está probada la toxicidad del fenol en bacterias, algas, crustáceos y peces en el medio marino (Kirk-Othmer, 1996; Schurmann *et al.*, 1997; Guerra, 2001). Es conocido que los compuestos fenólicos son extremadamente tóxicos en ecosistemas acuáticos en concentraciones de mg/l e incluso a concentraciones de $\mu\text{g/l}$, influyendo en las propiedades organoeléctricas de las aguas con vida piscícola o marisco (Buttino and Filippi, 1991).

Para el pentaclorofenol el valor del índice LC_{50} esta en un rango de 0.6 a 1.2 mg/l para la especie marina *Ophryotrocha diadema*, y de 0.04 a 0.13 mg/l para los salmones, descrito por Hooftman y Vink (1980). El efecto letal de los alkyilfenoles sobre *Crangon septemspinos* (0.15-2.7 mg/l) y *Salmo salar* (0.15-1 mg/l) fue estudiado por McLeseese *et al.* (1981).

El peligro a exposiciones seguidas para dosis subletales de fenol afectan al sistema nerviosos y circulatorio, con una reducción en el número y crecimiento de las células de sanguíneas (Guerra, 2001). Karnovic-Ozretic y Orzetic (1988) observaron una disminución significativa en el número de eritrocitos, proteínas totales y colesterol en el plasma de la sangre de *Mugilus auratus* tras una exposición de 8 días a concentraciones de fenol de 7.5 $\mu\text{g/l}$.

Es por todo ello, que se hace necesario sistemas de depuración capaces de eliminar estos compuestos, incluso en bajas concentraciones, evitando así su impacto en el entorno.

1.2.- PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA EN LA COSTA NORTE ALMERIENSE.

La industria DSM Deretil S.A, perteneciente al grupo Industrial DSM (investiga, desarrolla y fabrica productos químicos, farmacéuticos, alimenticios y otros bienes y equipos de alta calidad que vende a todo el mundo, en sectores tan diferentes como: el farmacéutico, alimentación, y otros), se dedica fundamentalmente a la producción y comercialización de antibióticos β lactámicos e intermedios quirales para la síntesis de dichos antibióticos. Actualmente es el mayor productor mundial de estos compuestos, exportando el 80 % de su producción. Más de la mitad de la síntesis mundial de amoxicilina se fabrica usando un compuesto (para-hidroxifenilglicerina) fabricado en la planta de Villaricos en Almería, cuya ubicación se refleja en el figura 1.2.

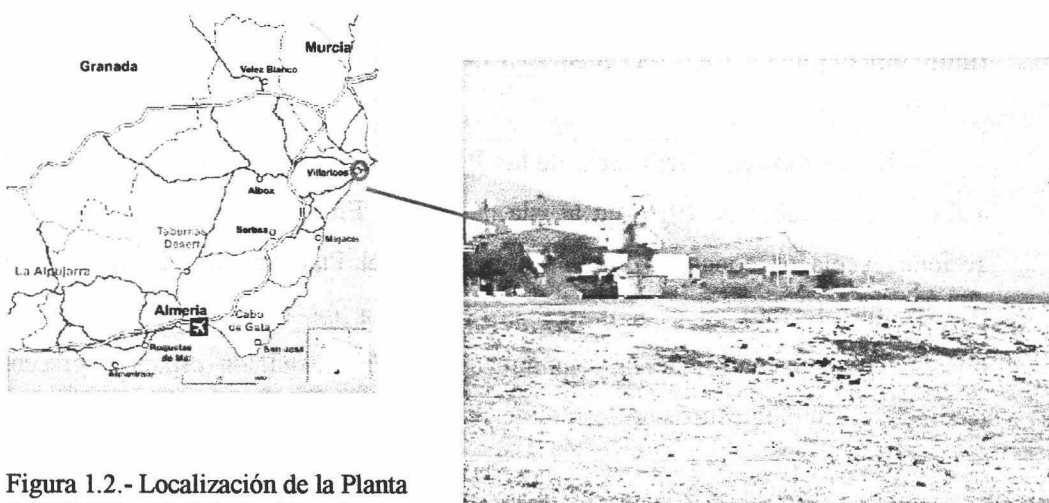


Figura 1.2.- Localización de la Planta de DSM Deretil S.A. en Almería.

Esta planta inició su actividad industrial en la zona en 1968, con la obtención de bromo y derivados (de ahí su ubicación en zona marítima), abandonada esta línea de fabricación en la actualidad. La planta actual cuenta con una plantilla directa que asciende a 278 personas, siendo la indirecta cercana a 500 personas, convirtiéndose de esta manera en un motor importante en la vida socioeconómica de la Comarca del bajo Almanzora, zona que vive principalmente de la agricultura y en la última década del turismo de playa.

Como se ha indicado anteriormente, DSM Deretil fabrica aminoácidos y derivados destinados a la industria farmacéutica generando de los distintos procesos de

producción una serie de aguas residuales de composición muy diversa, que se caracterizan por tener elevadas concentraciones en nitrógeno, materia reductora (fundamentalmente fenol) y otras sustancias, que se deben tratar por requerimiento normativo y medioambiental, y al que este trabajo de investigación ha dedicado todo su tiempo en pos de un sistema adecuado que permita su tratamiento y consecuentemente la protección del medio ambiente marino y humano.

A parte de la necesidad obvia de cumplir con la legislación, DSM Deretil tiene compromisos derivados de la firma del Compromiso de Progreso en el que se compromete a un crecimiento respetuoso con el medio ambiente.

1.3.- MARCO NORMATIVO. VERTIDOS EN ZONAS COSTERAS.

A continuación se hace un análisis de la normativa vigente que le es de aplicación en zonas costeras, con la finalidad de poder contrastar posteriormente los límites que dicha normas imponen con los resultados que se obtienen en este trabajo de investigación.

La legislación es muy diversa, europea, española, así como la propia de la Comunidad andaluza por ubicación de la planta industrial de DSM Deretil S.A, y todo ello en entorno de frecuentes encuentros de los distintos países preocupados en la adopción de medidas para la protección del medio ambiente marino que se ha ido ratificando en múltiples convenios o tratados internacionales.

Haciendo un poco de historia, se comienza cuando la Asamblea General de Naciones Unidas emplaza una Conferencia sobre el Medio Ambiente Humano, que se celebró en Estocolmo, en junio de 1972. Fruto de la misma fue la convocatoria por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), de una **reunión intergubernamental** sobre la protección del Mediterráneo, que tuvo lugar en Barcelona del 28 de enero al 4 de febrero de 1975, y a la que asistieron dieciséis Estados ribereños del Mediterráneo y la Comunidad Económica Europea.

En dicha reunión se aprobó un **Plan de Acción del Mediterráneo (PAM)**, coordinado desde su creación por el PNUMA, y también se acordó preparar los proyectos de un *Convenio de Barcelona para la protección del mar Mediterráneo contra la contaminación* y de dos Protocolos conexos: uno sobre cooperación en caso de accidente marítimo (Protocolo sobre cooperación para combatir en situaciones de emergencia la contaminación del Mar Mediterráneo causada por hidrocarburos y otras sustancias perjudiciales) y otro sobre vertido desde buques (Protocolo para la prevención y eliminación de la contaminación por vertido desde buques y aeronaves).

Un año después, el PNUMA convocó una **Conferencia de Plenipotenciarios de los Estados ribereños**, que se volvió a celebrar en Barcelona del 2 al 16 de febrero de 1976, y que aprobó los textos de los tres instrumentos jurídicos mencionados, que fueron firmados en Barcelona por catorce Estados y la CEE, y que entraron en vigor el 12 de febrero de 1978.

El Convenio designó al PNUMA para que desempeñe las funciones de Secretaría del Convenio y de sus Protocolos, siendo el Gobierno de España el depositario de ambos instrumentos. En España, el texto del Convenio originario fue publicado en el B.O.E. de 21 de febrero de 1978.

Más recientemente, la **Conferencia de Plenipotenciarios sobre el Convenio**, celebrada también en Barcelona los días 9 y 10 de junio de 1995, tomó los siguientes acuerdos: Adopción de enmiendas al Convenio, incorporando al mismo la Agenda 21 y los Principios de la Reunión de Río Janeiro (desarrollo sostenible y necesidad de proteger la flora y la fauna).

- Adopción de enmiendas al Protocolo sobre prevención por vertidos desde buques y aeronaves.
- Aprobación del nuevo Protocolo sobre zonas especialmente protegidas y la diversidad biológica en el Mediterráneo.
- Adopción de la **Resolución de Barcelona** sobre el medio ambiente y el desarrollo sostenible en la cuenca mediterránea, con sus dos Anexos: *Plan de*

Acción para la Protección del Medio Marino y el Desarrollo Sostenible de las Zonas Costeras del Mediterráneo (PAM-Fase II), y Sectores de actividades prioritarias relacionadas con el medio ambiente y el desarrollo en la cuenca mediterránea - 1996-2005.

Como consecuencia de estas modificaciones, el convenio se rebautizó bajo la denominación *Convenio de Barcelona para la protección del medio marino y la zona costera del Mediterráneo*. Por otra parte, como consecuencia del citado Protocolo sobre zonas especialmente protegidas y la diversidad biológica en el Mediterráneo, ratificado por España en noviembre de 1998 y publicado el instrumento de ratificación en el B.O.E. de 18.12.1999, nació una nueva figura de protección internacional para las áreas costeras y marinas mediterráneas: las llamadas **Zonas Especialmente Protegidas de Importancia para el Mediterráneo (ZEPIM)**.

La **XI Reunión Ordinaria de las Partes Contratantes del Convenio** tuvo lugar a finales de octubre de 1999, en la isla de **Malta**. En la misma se plantearon diversas acciones y plazos concretos para la aplicación del Plan de Acción del Mediterráneo (PAM), instrumento en gran parte constituido por los diferentes Protocolos para la prevención y el control de la contaminación, y la delegación española presentó una recomendación para el turismo sostenible en la cuenca mediterránea.

En noviembre de 2001, se celebró en **Mónaco** la **XII Reunión Ordinaria**. En ella fueron aprobadas las siete ZEPIM propuestas por España, todas ellas dentro de aguas jurisdiccionales españolas, que en su momento podrían integrarse en la Red Natura 2000. Con esta inclusión, España es el país que cuenta con mayor número de ZEPIM, que, a saber, son las siguientes:

- ✓ Isla de Alborán.
- ✓ **Fondos marinos del Levante de Almería.**
- ✓ Cabo de Gata-Níjar (Almería).
- ✓ Islas Medas (Girona).
- ✓ Cabo de Creus (Girona).

- ✓ Islas Columbretes (Castellón).
- ✓ Mar Menor y costa oriental mediterránea de la Región de Murcia.

En el marco de la **Unión Europea** hay que tener en cuenta tres Decisiones del Consejo, de fecha 22 de octubre de 1999 (D.O.C.E. Serie L 322, de 14.12.99). por las que se toman las siguientes medidas en relación con este Convenio:

• Aprobación en nombre de la Comunidad del **Protocolo** sobre las zonas especialmente protegidas y la *diversidad biológica en el Mediterráneo*, así como sus anexos (Decisión 1999/800/CE). Este Protocolo ya había sido ratificado por España el 23 de diciembre de 1998 (B.O.E. 18.12.1999).

- ✓ Aceptación de las enmiendas al **Protocolo** revisado sobre **protección del Mediterráneo contra la contaminación de origen terrestre** (Decisión 1999/801/CE).
- ✓ Aceptación de las enmiendas al Convenio de Barcelona y a su Protocolo sobre la prevención de la contaminación causada por vertidos desde buques y aeronaves (Decisión 1999/802/CE).

En España, el **Ministerio de Asuntos Exteriores** ha comenzado los procedimientos de ratificación, por parte de nuestro país, de los dos **Protocolos** aún pendientes, a saber: el Protocolo sobre la exploración y explotación de la plataforma continental, fondo y subsuelo, y el Protocolo sobre los movimientos transfronterizos residuos peligrosos.

Actuando según las directrices fijadas por las reuniones de las partes del Convenio, en 1995 se creó, también en Barcelona, la **Comisión Mediterránea de Desarrollo Sostenible (CMDSD)**, cuyos objetivos, en términos generales, son: Identificar, evaluar y examinar los grandes problemas económicos, ecológicos y sociales, enmarcados en el Programa de Acción MED 21, formular propuestas en las reuniones de las Partes y evaluar la aplicación de sus decisiones.

En la actualidad, la CMDS está elaborando la **Estrategia Mediterránea de Desarrollo Sostenible**, prevista para el año 2003, que persigue la aplicación en el Mediterráneo de las propuestas de acción de los principales convenios internacionales, proponiendo la realización de evaluaciones periódicas del estado del medio ambiente marino y del litoral mediterráneo mediante observatorios nacionales.

En este ámbito de reuniones y ratificando los convenios fueron apareciendo las distintas normativas que a continuación se describen.

1.3.1.- Legislación europea

En el ámbito de la Unión Europea, la primera disposición dictada en esta materia es la **Directiva 76/464/CEE** del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad. Se pretende poner las bases para la protección del medio acuático frente a la contaminación, y en particular la causada por determinadas sustancias persistentes, tóxicas y bioacumulables.

En dicha directiva se recogen en su anexo (Tabla 1.2) dos listas de sustancias peligrosas separadas en categorías y grupos, y de forma particular, en la lista II, el amoníaco y nitritos como sustancias que influyen desfavorablemente en el balance de oxígeno, para las cuales los estados miembros deberán de adoptar las medidas apropiadas para eliminar esta contaminación de las aguas indicadas en su artículo 1: Aguas interiores superficiales, aguas marítimas territoriales, aguas interiores del litoral y aguas subterráneas.

Introducción

Tabla 1.2.- Lista I y II del Anexo perteneciente a la Directiva 76/484/CEE, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas al mar.

ANEXO

Lista I de categorías y grupos de sustancias

1. Compuestos organohalogenados y sustancias que pueden dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático.
2. Compuestos organofosfóricos.
3. Compuestos organoestánicos
4. Sustancias en las que esté demostrado su poder cancerígeno en el medio acuático o transmitido por medio de éste (1).
5. Mercurio y compuestos de mercurio.
6. Cadmio y compuestos de cadmio.
7. Aceites minerales persistentes e hidrocarburos de origen petrolífero persistentes y, en lo relativo a la aplicación de los artículos 2, 8, 9, y 14 de la presente Directiva.
8. Materias sintéticas persistentes que puedan flotar, permanecer en suspensión o hundirse y causar perjuicio a cualquier utilización de las aguas.

Lista II de categorías y grupos de sustancias

1. Los metaloides y los metales siguientes y sus compuestos:

1. Zinc	2. Cobre
3. Níquel	4. Cromo
5. Plomo	6. Selenio
7. Arsénico	8. Antimonio
9. Molibdeno	10. Titanio
11. Estaño	12. Bario
13. Berilio	14. Boro
15. Uranio	16. Vanadio
17. Cobalto	18. Talio
19. Teluro	20. Plata
2. Biocidas y sus derivados que no figuren en la lista I.
3. Sustancias que tengan efectos perjudiciales para el sabor y/o el olor de los productos de consumo humano obtenidos del medio acuático, así como los compuestos que puedan dar origen a sustancias de esta clase en las aguas.
4. Compuestos organosilícicos tóxicos o persistentes y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en las aguas, excluidos los biológicamente inofensivos o que dentro del agua se transforman rápidamente en sustancias inofensivas.
5. Compuestos inorgánicos de fósforo y fósforo elemental.
6. Aceites minerales no persistentes e hidrocarburos de origen petrolífero no persistentes.
7. Cianuros, fluoruros.
8. Sustancias que influyan desfavorablemente en el balance de oxígeno, en particular las siguientes: amoníaco, nitritos.

En este mismo sentido, y para completar el dictado de la anterior directiva se emite la **Directiva 86/280/CEE** del Consejo de 12 de junio de 1986, en la que se fija con arreglo al apartado 1 del Art. 6 de la Directiva 76/464/CEE, los valores límites de las normas de emisión de las sustancias peligrosas comprendidas en la lista I del Anexo de la citada directiva.

1.3.2.- Legislación nacional

La necesidad de depurar los vertidos previamente a su evacuación final al medio surge ya del reconocimiento unánime (Art. 45.1 de la *Constitución Española, CE*) de que “*todos tienen el derecho de disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, así como el deber de conservarlo* “. En este sentido “*los poderes públicos velarán por la utilización racional de todos los recursos naturales, con el fin de proteger y mejorar la calidad de vida y defender y restaurar el medio ambiente, apoyándose en la indispensable solidaridad colectiva*” (Art. 45.2 C.E.), pero como se indica el Art. 45.3 C.E. “*en términos que la ley fije* “.

Por otro lado, la misma Constitución Española establece en su artículo 132.1 que la ley ha de regular el régimen jurídico del dominio público. En este contexto, es evidente la relevancia del Dominio Público marítimo-terrestre.

Para superar tales situaciones, la **Ley 22/1988**, de 23 de julio, **de Costas**, así como los reglamentos que la desarrollan, son los pilares fundamentales de la legislación española en cuanto se refiere a aguas litorales. En ella se contempla los mecanismos jurídico-administrativos necesarios para garantizar la protección de la calidad de las aguas. Además esta ley recoge, tanto los criterios contenidos en la Recomendación 29/1973, del Consejo de Europa, sobre protección de las zonas costeras, como en la Carta del Litoral de 1981 de la Comunidad Económica Europea.

Es de destacar que entre sus objetivos se encuentra el conseguir y mantener un adecuado nivel de calidad de las aguas y de la ribera del mar, indicándose para ello en el Capítulo IV, Sección II, Art. 57.2 la necesidad de evitar el vertido de sustancias

peligrosas a las aguas interiores y al mar, y en su Art 57.3 que *“en función de los objetivos de calidad fijados para el medio receptor de contaminación, los vertidos se limitarán en la medida que lo permita el estado de la técnica, las materias primas y, especialmente, en virtud de la capacidad de absorción de la carga contaminante, sin que se produzca una alteración significativa de dicho medio”*.

Por otra parte, la entrada de España a la Unión Europea hace precisa la incorporación al ordenamiento jurídico español de aquellas disposiciones comunitarias relativas a la Contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.

En este sentido y materia, el **Real Decreto 258/1989** de 10 de marzo de 1989, sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra a mar, se dicta con objeto de incorporar las Directivas del Consejo 76/464/CEE y 86/280/CEE comentadas en el apartado anterior.

En este Real Decreto, se establece la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar, y dispone que habrán de dictarse normas de emisión, objetivos de calidad, métodos de medida de referencia y procedimientos de control, en relación con el vertido al mar desde tierra de aquellas sustancias que por sus especiales características se incluyen en las listas I y II del anexo II del citado Real Decreto. Para ello se dictan las **Ordenes 31/10/1989 y 28/10/1992**.

1.3.3.- Normativa de aplicación para la Comunidad Autónoma de Andalucía

Andalucía no ha estado al margen de esta mayor sensibilidad general hacia las cuestiones ambientales. Así, en el Estatuto de Autonomía (1981) se señala como objetivo básico, en el art. 12.5, *“...el fomento de la calidad de vida del pueblo andaluz, mediante la protección de la naturaleza y del Medio Ambiente...”*.

El litoral es una de las piezas principales del territorio andaluz que más problemas y oportunidades genera en la actualidad, no solo para su desarrollo económico sino también por el estado del medio ambiente. Sol, playa y contacto con la naturaleza son los valores que la Comunidad Autónoma Andaluza exhibe como atractivo de lo que, sin ninguna duda, es el primer sector económico de Andalucía.

De conformidad con los artículos 148.1.9 y 149.1.23 de la C.E., la distribución de competencias en materia de medio ambiente entre las Comunidades Autónomas y el Estado serían las siguientes: primero corresponde al Estado la elaboración de la Legislación básica en materia de medio ambiente además de la ejecución de las competencias que se reserve en dicha Legislación; segundo, correspondería a las comunidades Autónomas el desarrollo de la Legislación Básica del Estado y su ejecución, así como el dictado de normas adicionales de protección.

En el cumplimiento de estas competencias, la Comunidad Andaluza dicta su Ley en materia de medio ambiente, la **Ley 7/94** de 18 de mayo, de **Protección Ambiental**.

La mejora, pues, del espacio litoral es para la Comunidad Andaluza un objetivo primordial de interés económico y ambiental, constituyendo, por tanto, la mejora de la calidad de las aguas litorales un elemento esencial de la Ley.

En desarrollo de la Ley y con el objetivo principal de incrementar los controles preventivos y la vigilancia ambiental en el dominio público marítimo-terrestre, se aprobó el **Decreto 334/1994** por el que se regula el procedimiento para la tramitación de autorizaciones de vertido al dominio público marítimo-terrestre y de uso en zona de servidumbre de protección.

Igualmente, en desarrollo de la Ley, se aprobó el **Decreto 14/96**, de 16 de enero de 1996, **Reglamento de Calidad de las Aguas Litorales**, que pretende recoger y en muchos aspectos profundizar y ampliar lo establecido en la Legislación vigente en materia de vertidos desde tierra a mar y de control de la calidad del agua, entre las que cabe citar:

- ✓ Ley 22/1988, de Costas y su Reglamento.
- ✓ Real Decreto 258/1989, por el que se establece la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar.
- ✓ Ordenes 31/10/89, 9/5/91 y 28/10/92 que incorporan a la legislación de aguas marítimas, las normas de emisión, objetivos de calidad y condiciones de control de los vertidos que contengan las 17 sustancias de la lista I de la Directiva 76/464/CEE (relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad).
- ✓ Orden 13/7/93 por el que se aprueba la instrucción para el proyecto de conducciones de vertidos desde tierra al mar.

El ámbito de aplicación del Reglamento abarca los vertidos cualesquiera que sea su naturaleza y estado físico, y que de forma directa o indirecta se realicen desde tierra a cualquier bien del dominio público marítimo-terrestre. Entre los aspectos más interesantes para el trabajo de investigación cabe citar:

Una clasificación de las aguas litorales andaluzas al objeto de establecer los objetivos de calidad, diferenciando sus condiciones específicas en:

Aguas especiales: aquellas caracterizadas por sus singulares condiciones ambientales, bien en su vertiente de aguas, valor estético o zonas litorales con destacado valor ecológico o paisajístico y aquellas aguas donde se reconozcan la importancia de su conservación, como es el caso de las reservas naturales.

Aguas limitadas: aguas de estuarios, bahías o aquellas en donde debido a condiciones de escasa renovación y/o a la cantidad de sustancias contaminantes y/o nutrientes que reciben, se puedan dar fenómenos de eutrofización, acumulación de sustancias tóxicas o cualquier otro fenómeno que incida negativamente en las condiciones naturales del medio y reduzcan sus posibilidades de uso.

Introducción

Aguas normales: Aguas litorales distintas de los estuarios, bahías abiertas o aquellas en donde debido a sus condiciones de renovación y/o a la cantidad de sustancias contaminantes que reciben, puedan verse menos afectadas por los fenómenos antes mencionados, no previéndose efectos negativos sobre las mismas y sus usos.

Aguas menos limitadas: aguas del mar territorial o aquellas con un intercambio bueno o en la que se considere que es altamente improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos que afecten a las mismas y sus usos.

Entre los aspectos más interesantes para el trabajo de investigación cabe citar su anexo I, donde se recogen (Tablas 1.3 y 1.4) los límites máximos de vertido, que no puede sobrepasarse salvo circunstancias especiales. Límites que se van a utilizar para contrastar los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

Tabla 1.3.- Tabla de límites para vertidos en aguas litorales (*). Parámetros generales.

PARÁMETRO	Media Mensual	Media diaria	Valor Puntual
pH		5.5-9.5	
Color (1)		1:40	
Temperatura °C (2)		Incremento $\pm 3^{\circ}\text{C}$	
Sólidos en Suspensión mg/l	300	400	500
Materia Sedimentable ml/l	2	3	4
Sólidos Gruesos		Ausentes	
Sólidos Flotantes		Ausentes	
DBO ₅ mg O ₂ /l	300	400	500
DQO mgO₂/l	450	600	750
COT mg/l	150	200	250
Aluminio mg/l	3	6	10
Sulfuros mg/l	1	2	4
Sulfitos mg/l	1	2	4
Nitratos mg/l	75	100	150
Fenoles mg/l	3	15	15
Detergentes mg/l	5	20	50

Introducción

(1): No perceptible sobre un espesor de 10 cm, con la dilución indicada en más del 10 % del valor de referencia en unidades de Co-Pt.

(2): A 100 metros del punto de vertido y 1 metro de profundidad.

(*): Para las aguas residuales urbanas será de aplicación la Directiva 91/271/CEE, del Consejo de 21 de mayo de 1991, sobre tratamiento de Aguas residuales urbanas.

Tabla 1.4.- Tabla de límites para vertidos en aguas litorales (*). Sustancias peligrosas.

PARÁMETRO	Media Mensual	Media Diaria	Valor Puntual
Cadmio mg/l	0.2	0.4	1
Mercurio mg/l	0.05	0.2(1) y 0.1 (2)	0.2(1) y 0.1 (2)
DDT mg/l	0.2	0.4	0.8
Pentaclorofenol mg/l (1)	2	3	
Hexaclorobenceno mg/l	1(3) y 1.9(4)	2(3) y 3.8(4)	4(3) y 7.6(4)
Hexaclorobutadieno mg/l	1.5	3	6
Cinc mg/l	3	6	10
Cobre mg/l	0.5	2.5	4
Níquel mg/l	3	6	10
Cromo Total mg/l	0.5	2	4
Cromo VI mg/l	0.2	0.4	0.5
Plomo mg/l	0.5	1	2
Selenio mg/l	0.05	0.1	0.2
Arsénico mg/l	1	3	5
Estaño mg/l	10	15	20
Titanio mg/l	1	3	5
Fósforo Total mg/l	40	50	60
Cianuros mg/l	0.5	1	2
Fluoruros mg/l	10	15	20
Amoniaco mg/l	60	80	100

(1): Sector de electrólisis de los cloruros que utiliza células de cátodos de mercurio.

(2): Sectores diferentes del de electrólisis de los cloruros alcalinos.

(3): Producción y transformación de hexaclorobenceno.

(4): Producción de percloroetileno y de tetracloruro de carbono por precolación.

Hay que indicar que el Decreto 54/1999, de 2 de marzo, por la que se declara las zonas sensibles, normales y menos sensibles en las aguas del litoral, recoge como zona sensible la desembocadura del río Aguas y río Antas, muy próximas a las instalaciones de DSM Deretil S.A.

2.- TECNOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES INDUSTRIALES CON ALTA CARGA EN COMPUESTOS NITROGENADOS Y FENÓLICOS.

Para la realización del presente trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica actualizada con el fin de conocer el estado tecnológico y científico en esta materia y permitiera el desarrollo de la investigación. Los principales servicios de documentación que se utilizaron fueron de la Biblioteca de: Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Área de tecnologías del Medio Ambiente del Departamento de Ingeniería Civil, Instituto del Agua, Biblioteca General de la Universidad de Granada, Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, todas ellas de la Universidad de Granada. Destacar los servicios de documentación del Colegio de Caminos, Canales y Puertos.

Entre las Bases de Datos a las que se ha tenido acceso a través de las instituciones, principalmente de la Universidad de Granada, se puede enumerar: Environmental Management Technical Reports Database, Science Journal Citation Reports y Elsevier Science Journals, ésta última cuenta con revistas tales como “Water Science & Technology”, “Water Research”, “Advances in Water Resources”, “Journal and Hazardous Materials”, “Journal Biotechnology” entre otras.

El número de artículos, referencias y demás información recopilada, fue ingente. A continuación, se ofrece los diferentes aspectos más relevantes obtenidos del proceso de la investigación bibliográfica, también utilizada para el capítulo de introducción.

Los efectos producidos por la contaminación de las aguas incluyen la destrucción de los recursos hídricos, disminución de su calidad y minimización del poder autodepurador; necesitándose un tratamiento adecuado, en función del nivel de eliminación de contaminantes, antes de verter las aguas depuradas al medio.

La eliminación de solutos de un medio acuoso puede llevarse a cabo por una diversidad de procesos de naturaleza tanto físico, químico como biológico. Para el caso de compuestos nitrogenados que ocupa esta investigación, principalmente en forma de amonio, pueden considerarse como tratamientos factibles los siguientes:

Precipitación química.

La adición de magnesio y fosfatos que reaccionan con el amonio formando una sal de fosfato magnesio amonio que precipita, en una relación estequiométrica de 1:1:1. Fue utilizado para eliminación de amonio en concentraciones próximas a 5000 mg/l por Li y Zhao (2001), y de 400 mg/l por Martinen *et al.* (2002), ambos para un agua residual procedente de una granja (purines). El pH es fundamental en el proceso debiéndose mantener en un rango entre 8.5-9.0.

Arrastre de amoniaco con aire o “stripping”.

Se eleva el pH del efluente mediante adición de cal, con el fin de desplazar los iones NH_4^+ a NH_3 en forma gaseosa y eliminar el amoniaco por <<stripping>> con aire, en torres de contacto (Degrémont, 1979). El pH debe encontrarse en un rango entre 10.5-11.5 que se consigue con la misma cal aportada al sistema (Metcalf and Eddy, 1995).

Intercambio iónico.

Consiste en desplazar el ión en cuestión en solución por otro que se halla sobre un material de intercambio o resina. Dos son las formas con que se puede emplear el sistema: sistema de cambio aniónico o catiónico. En un sistema catiónico, el amonio es retirado directamente. Un excelente intercambiador natural empleado en este sistema es la zeolita y la arcillas (Rozic *et al.*, 2000). Si el sistema es aniónico, el amonio debe ser transformado previamente a nitrato. Leakovic *et al.*, (1999) utilizó una resina sintética, LEWATIT S 4428, que retenía de forma conjunta iones amonio y nitrato para un agua

residual de una planta de fertilizantes con unas concentraciones de amonio sobre 325 mg/l y de nitrato 200 mg/l. El inconveniente de estos sistemas es que requieren la regeneración de las resinas (Sheng and Chang, 1996).

Adsorción.

Es un fenómeno físico de interacción de las moléculas del contaminante con la superficie del adsorbente. Carbón activo (Blanco, 1999) y sepiolita (Balci and Dincel, 2002) se han utilizado como adsorbentes, para concentraciones de amonio inferiores a 100 mg/l. y como ocurría en el apartado anterior, el material adsorbente requiere de una regeneración.

Tecnología de membranas.

La eliminación de los elementos contaminantes se produce al realizarse un paso selectivo de determinados componentes a través de unas membranas artificiales, haciendo posible la depuración del efluente. Bohdziewicz, *et al.*, (1999) emplearon la osmosis inversa al igual que Koyuncu *et al.*, (2001) y Maettinen *et al.*, (2002) nanofiltración, para la eliminación de amonio, no obstante, uno de los principales inconvenientes de estos procesos es su elevado coste y la dificultad de aplicabilidad a todo tipo de efluentes, precisando diversos y costosos pretratamientos.

Estas son algunas de las tecnologías aplicables para aplicar amonio, sin embargo no todas son viables a nivel económico hoy por hoy, planteando algunas de ellas inconvenientes cuya solución es más problemática que el caso de contaminación solucionado.

El tratamiento biológico en el ámbito de inversión exclusivamente del proceso de eliminación de compuestos nitrogenados requiere menor capital que los anteriores y desde el punto de vista de la explotación, el tratamiento biológico requiere en principio menos recursos tanto energéticos como de reactivos. Los procesos de biodegradación pueden ser una alternativa a estos procesos fisico-químicos.

En cuanto los tratamientos físico-químicos descritos para la degradación o eliminación de fenol se pueden destacar como más aplicables descritos en bibliografía:

- Tratamiento consistente en dos etapas, una coagulación seguido de una adsorción por resinas (Lin and Wang, 2002). Utilizan cloruros metálicos para la coagulación y una resina macroporosa para la adsorción. La concentración inicial de fenol en dicho trabajo fue de aproximadamente de 10.000 mg/l.
- Ozbelge *et al.*, (2002) estudia la eliminación de compuestos fenólicos procedentes de agua residual de una industria textil mediante la utilización de cuatro diferentes tipos de coagulante con y sin adición de hidróxido de calcio, consiguiendo el óptimo de eliminación, 94 %, usando FeCl_3 y con adición de hidróxido de calcio a 23 °C.
- Field and John, (2001) eliminan compuestos fenólicos mediante tratamientos de membranas, concretamente por osmosis inversa, membranas densas no porosas donde el transporte selectivo es debido a la afinidad de los diferentes componentes por la membrana, que determina su disolución en la misma y la difusión a su través.
- Oxidación fotoquímica con TiO_2 (Spacek *et al.*, 1995). Se produce una mineralización de los componentes químicos mediante la utilización de la luz solar, en un proceso fotocatalítico con TiO_2 que tiene lugar a temperatura ambiente.
- Awad y Abuzaid (1997, 2000) indican que por métodos electroquímicos, usando electrodos de grafito para oxidar el fenol y convertirlo en sustratos como ácido málico, menos tóxico y mas biodegradable.
- La adsorción ha sido aplicada en el tratamiento de efluentes líquidos contaminados con fenoles. En este contexto, el carbón activo es constituido como un material sorbente (Abdo *et al.*, 1997; Jung, *et al.*, 2001; Polaert *et al.*, 2002);

sin embargo debido a los altos costos involucrados, principalmente en la etapa de regeneración, limita su utilización a gran escala (Abdo *et al.*, 1997).

- Otros como descomposición con ultrasonidos y H₂O₂ (Lin *et al.*, 1996), ozonización, ultravioleta y peróxido de hidrógeno (Mokrini *et al.*, 1997).

Todos ellos dan una solución bastante precisa al problema de la eliminación del fenol, pero suponen un elevado grado de tecnología, altos costes de instalación y mantenimiento, y presencia de personal altamente cualificado. Además estos tratamientos implican solamente la eliminación de compuestos fenólicos dando una solución parcial para la eliminación de efluentes con una mayor diversidad de contaminantes, como ocurre en esta investigación. En cambio, los procesos biológicos, se presentan en la actualidad como una alternativa a los procesos físico-químicos para el tratamiento de contaminantes en efluentes complejos.

3.-TRATAMIENTO BIOLÓGICO DEL EFLUENTE INDUSTRIAL EN MEDIO SALINO

3.1.- DEPURACIÓN BIOLÓGICA EN MEDIO SALINO.

Las altas concentraciones de sales y azúcares han sido utilizadas desde antiguo en la conservación de los alimentos, y la observación de que su uso inhibía el deterioro microbiano estimuló originariamente el interés por el efecto de las altas concentraciones de solutos sobre la actividad y crecimientos microbianos.

En aguas residuales complejas, y en particular con presencia de cloruros es muy difícil conseguir buenos rendimientos en la eliminación de una sustancia determinada mediante procesos biológicos (Duchon and Bills, 1996).

La mayoría de las bacterias en su medio natural no precisan regular su osmolaridad interna con precisión porque están protegidas por una pared celular capaz de

resistir una considerable presión osmótica interna. Las bacterias mantienen siempre su osmolaridad muy por encima de la del medio. Si la presión osmótica interna desciende por debajo de la externa, el agua sale de la célula y el volumen del citoplasma disminuye, dañándose la membrana. En las bacterias Gram-positivas se dice que la célula se ha *plasmolizado*, mientras que en las Gram-negativas no experimentan una plasmolisis, dado que la pared celular se retrae junto con la membrana (Stainer *et al.*, 1998).

Los microorganismos se pueden dividir en cuatro amplias categorías con respecto a su tolerancia a la sal: *no halófilos*, *organismos marinos*, *halófilos moderados* y *halófilos extremos* (Stainer *et al.*, 1988; Ventosa and Nieto, 1995) con las siguientes características que a continuación se describen, recogiendo algunas especies en la Tabla 3.1:

- ❖ Aquellos que son *no halófilos* crecen mejor cuando la concentración en sal se encuentra por debajo del 1%.
- ❖ Los *organismos marinos* crecen mejor allí donde las concentraciones de sal están entre el 1-3%. Algunos son capaces de coexistir con bacterias halófilas en medios hipersalinos (Márquez *et al.*, 1987).
- ❖ Los *organismos halófilos moderados* se sitúan en ecosistemas con concentraciones entre un 3% y un 15 %.
- ❖ Y por último, los *organismos halófilos extremos* crecen mejor bajo concentraciones salinas entre el 15% y 30%.

Tabla 3.1.- Tolerancia osmótica de algunas bacterias (Ventosa and Nieto, 1995)

Tipo Fisiológico	Organismos representativos	Concentración salina % de Cl Na
No Halófilos	<i>Aquaspirillum serpens</i>	0.1-1.0
	<i>Escherichia coli</i>	0.1-0.4
Bacterias marinas	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	0.2-5.0
	<i>Pseudomonas marina</i>	0.1-5.0
Halófilos moderados	<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	2.3-20.5
	<i>Vibrio costicola</i>	2.3-20.5
	<i>Pediococcus halophilus</i>	0.1-20.0
Halófilos extremos	<i>Halobacterium salinarium</i>	12.0-36.0
	<i>Halococcus morrhuae</i>	5.0-36.0

Las bacterias que se adaptan a la salinidad tienen un bajo nivel de carbohidratos y proteínas y un aumento del ARN y de los lípidos celulares (Kargi and Dincer, 1997). Las bacterias halófilas están adaptadas al estrés de alta salinidad debido a que posee una actividad que les permiten acumular potasio, glycerol u otros solutos compatibles dentro del citoplasma (Woorland and Irvine 1995), permitiéndoles así incrementar su potencia iónica en el interior de la célula.

Los tratamientos anaeróbicos generan bastantes problemas técnicos por el efecto inhibitorio de ciertas sustancias (Henze, 1983), como es el caso del sulfato y el sodio. Este proceso es moderadamente inhibido cuando las concentraciones de sodio y sulfato son respectivamente 5.5 g/l y 1.0 g/l . Para concentraciones de sodio superiores a 10 g/l se produce una inhibición del proceso.

Mientras la salinidad sea elevada las constantes cinéticas de eliminación de materia orgánica y de nitrógeno pueden permanecer bajas (Vredenburg *et al.*, 1997). Según Smythe *et al.*, (1997) dependiendo del sistema de tratamiento, se puede tratar los influentes con rendimientos aceptables a partir de unos niveles de concentración de sales. Así, un sistema convencional puede llegar a unas concentraciones inferiores al 5 %; en sistemas anaeróbicos a menos de 1.5 % y en sistemas especiales de lecho fluidificado, filtros sumergidos, etc. hasta un 10 %.

3.2.- CICLO DEL NITRÓGENO

Aunque el nitrógeno molecular (N_2) es abundante en la biosfera, constituyendo alrededor del 80% de la atmósfera de la Tierra, es químicamente inerte y por tanto no es una fuente de este elemento aprovechable por la mayoría de las formas vivientes (Stainer, 1988). Este elemento constituye entre el 8 y un 10 % de la materia viva, formando parte de los compuestos orgánicos imprescindibles para la vida como son: ácidos nucleicos, proteínas (donde destacan las enzimas) o lipoproteínas (Martínez -Toledo, 1992).

Este elemento, en la biosfera sufre lo que en esencia es una traslación cíclica de ocho electrones, entre su forma más oxidada, de valencia +5 (NO_3^-), y la más reducida, de valencia -3 (NH_4^+), representándose esa traslación en la figura 3.1.

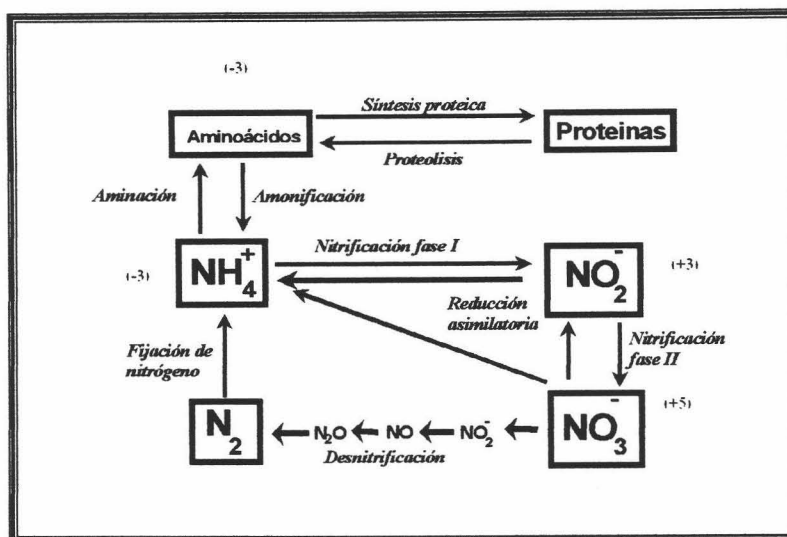


Figura 3.1.- Ciclo del Nitrógeno (Adaptado de Gómez *et al.*, 2000).

La mayoría del nitrógeno en la biomasa se encuentra en el estado más reducido, y cuando estos *compuestos orgánicos nitrogenados* son catabolizados, se libera sin variar la valencia, en forma de NH_4^+ . A este proceso se conoce como **Amonificación**, constituyendo el centro del fenómeno de mineralización. En este estado, es fácilmente asimilable por los *vegetales* y por la mayoría de los *microorganismos*, incorporándose de nuevo a los *compuestos orgánicos* (**Aminación**).

En presencia de O_2 , las bacterias nitrificantes obtienen energía oxidando el NH_4^+ a través de varios intermediarios. Se puede dar en cualquier ambiente óxico terrestre o acuático, proceso conocido como **Nitrificación**, evitando la acumulación de NH_4^+ en el medio y permitiendo la formación de NO_3^- , la forma más soluble. El NO_3^- también es asimilado fácilmente por las plantas, reduciendo el N de nuevo al estado de valencia -3, más apropiado para hacer frente a las necesidades del tejido, por un proceso denominado **Reducción Asimilativa**.

En condiciones anóxicas se aprecia una secuela indirecta posterior de la nitrificación, consiste en que el NO_3^- y NO_2^- pueden actuar como aceptores de electrones sustituyendo al oxígeno, por un proceso respiratorio denominado **Reducción Desasimilatoria**. Algunas de las formas más reducidas de N producidas así son gaseosas (N_2O , N_2), con la pérdida consiguiente de nitrógeno del sistema, conociéndose el proceso como **Desnitrificación**. En otras palabras, el NO_3^- o NO_2^- es el aceptor de electrones utilizado en la generación de energía.

El oxígeno puede inhibir el proceso de desnitrificación, aunque se han descrito casos de desnitrificación en aerobiosis (Patureau *et al*, 1994). De igual manera tanto el pH como la temperatura son factores que influyen en el proceso (Thomas *et al*, 1994), entre otros.

La desnitrificación podría constituir un escape importante de nitrógeno en los sistemas acuáticos y terrestres, si no fuera por la asimilación aproximadamente equivalente y opuesta del N_2 por parte de algunos procariotas, que lo integran en su biomasa mediante un proceso conocido como **Fijación Biológica de Dinitrógeno** (Grant and Long, 1989). Puesto que a un proceso de nitrificación le sucede otro de desnitrificación, se infiere que la fijación de nitrógeno es vital para el mantenimiento continuo de un ciclo equilibrado de este elemento.

La capacidad de fijar nitrógeno parece restringida a algunos organismos procariotas denominados Diazotrofos (Sprenst *et al.*, 1987), no siendo descrita hasta hoy en ningún organismo eucariota. Actualmente estas bacterias se agrupan en géneros muy heterogéneos y alejados entre si filogenéticamente, aunque los genes responsables de la fijación de nitrógeno están conservados lo cual indica un origen común.

Casi todas las bacterias fotoautótrofas están capacitadas para fijar el nitrógeno molecular, contrariamente al escaso número de especies heterótrofas dotadas de este poder (Wetzel, 1975).

En biotecnología medioambiental, se aplica la desnitrificación cuando se requiere la total eliminación de N (Rittmann and McCarty, 2001). Para que se produzca la desnitrificación el nitrógeno debe estar en una de sus formas oxidadas, NO_3^- y NO_2^- . Debido a que muchas aguas residuales contienen nitrógeno reducido, la desnitrificación se empareja frecuentemente a la nitrificación que es necesaria para oxidar el nitrógeno reducido.

De esta manera, conociendo el ciclo del nitrógeno y haciéndolo útil para el interés de esta investigación, partiendo de un efluente rico en nitrógeno amoniacal y orgánico, y de un tratamiento de biodesnitrificación, se hace necesario aprovechar la teoría que se esgrime en los procesos de nitrificación y desnitrificación para conseguir la transformación de las distintas formas de nitrógeno disueltas en el agua residual en forma de N_2 , gas inerte y muy abundante en la atmósfera.

3.2.1.- Nitrificación

A lo largo de todas las transformaciones que sufre el nitrógeno desde el momento de su asimilación reductora por las plantas hasta su liberación como amoniacal, el átomo de nitrógeno permanece en la forma reducida. La nitrificación se puede definir como el proceso biológico mediante el cual el NH_4^+ pasa a NO_2^- y a NO_3^- previa oxidación (Grant and Long, 1989).

Este proceso ha sido descrito en todo tipo de suelos y aguas siendo realizado fundamentalmente por bacterias autótrofas, quimiolitótrofas y aerobias estrictas (Rittmann and McCarty, 2001). Aunque bacterias heterótrofas como *Alcaligenes faecalis* (Papen et al, 1989) han sido descritas con capacidad nitrificante, incluso hay que indicar, que este proceso no es exclusivo de bacterias ya que también han sido descritos en hongos como *Aspergillus* (Eylor and Schmidt, 1959; Verstraete and Alexander, 1972) y *Actinomicetes* (Remocle, 1977).

La naturaleza biológica de este proceso fue conocida por primera vez hace 100 años, cuando se demostró que la aparición de nitratos en los suelos y en el alcantarillado

se podía inhibir con antisépticos. Poco después, se estableció que estaban implicados dos grupos distintos y separados de bacterias aerobias obligadas, ambas capaces de obtener energía a expensas de distintos compuestos de nitrógeno.

Hasta ahora se sabe relativamente poco de los procesos de nitrificación en el mar, aunque es cierto que hace unos decenios se aislaron bacterias nitrificantes del Mar del Norte y Báltico, pero procedían principalmente de los sedimentos. Más tarde se comprobó también la nitrificación en el agua de varias costas. En cambio, en los océanos resultó infructuosa la búsqueda de estas bacterias durante mucho tiempo, aunque se sospechaba que la oxidación microbiana del amoníaco tenía lugar también en el mar (Rheinheimer, 1987).

Watson (1965) logró aislar la nitrobacteria quimioautótrofa *Nitrosococcus oceanus* y más tarde encontraron a dos nitrobacterias marinas *Nitrospina gracilis* y *Nitrococcus mobilis*.

Ward (1982) contó 1.000 a 10.000 células/l de las bacterias oxidantes del amoníaco *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosomonas marina* en alta mar y 100.000 a 10.000.000 en las aguas costeras.

La importancia de la nitrificación reside en la producción de una forma oxidada de nitrógeno que puede participar en la desnitrificación, permitiendo de esta manera una liberación potencial de nitrógeno a la atmósfera.

3.2.1.1.- Fases de la nitrificación

La nitrificación la conforma, principalmente, bacterias Gram-negativas con invaginaciones de membrana denominadas citomembranas o lamelas destinadas a aumentar la superficie para la fosforilación oxidativa (proceso que lleva en la respiración a la obtención de energía por oxidación de sustratos orgánicos o inorgánicos). Ninguna especie puede realizar todo el proceso de nitrificación por sí misma, sino que dicha nitrificación se debe a la acción sucesiva de dos subgrupos de bacterias (Iañez, 1995):

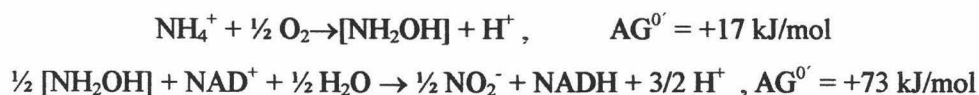
- ❖ Nitrosas que oxidan el amoníaco (NH_4^+) hasta nitrito (NO_2^-), se produce en una fase conocida con **Nitrificación Fase 1**.
- ❖ Nítricas que oxidan el nitrito a nitrato (NO_3^-), se desarrolla en una fase denominada **Nitrificación Fase 2**.

Nitrificación Fase 1

Lo constituye los géneros, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*, (Herbert, 1999).

Según Herbert (1999), en ecosistemas costeros marinos, y a partir de recientes análisis de la filogenética con cultivos puros, basados en secuencias del gen 16S y RNA, se ha demostrado que las bacterias oxidadoras de amonio se pueden dividir en dos grupos distintos. El primero contiene a *Nitrosococcus oceanus* formando un rama profunda y clara dentro de las γ -proteobacterias (Woese *et al.*, 1984). El segundo grupo estaría formado por un cluster mas pequeño dentro de las β -proteobacterias, pudiendo subdividirse en dos clases correspondiendo a *Nitrosomonas* spp. y a *Nitrospira* spp (Woese *et al.*, 1985). Anteriormente se clasificaban las últimas en *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosolobus* sp., y *Nitrospira* sp., pero al tener un alto nivel de homologación en sus secuencias del gen 16S y RNA se ha establecido por la singularidad genuina agruparlas con el nombre de *Nitrospira* sp.

En esta primera fase, la bacteria realiza una sucesión de transformaciones por etapas catalizadas enzimáticamente (Wood, 1986):



El primer paso, oxidación de amonio a hidroxilamina se cataliza por la enzima amonio-monooxigenasa y el segundo paso, la oxidación de hidroxilamina a nitrito se cataliza por la hidroxilamina oxidoreductasa. El grupo de bacterias oxidadoras de amonio

autótrofas, quimiolitotrofas, oxidan amonio a nitrito y fijan CO₂ para satisfacer sus necesidades de energía y carbono. Tienen escasas diferencias entre géneros y especies, principalmente debidas a adaptaciones específicas a los distintos hábitats. Las investigaciones bioquímicas defienden un mecanismo para la generación de un gradiente de protones basado en una deshidrogenasa productora de protones extracitoplasmática unida a una oxidasa terminal citoplasmática que utilice protones (Dispirito *et al.*, 1985). Según Otte *et al.*, (1999), se generan 4 electrones en la oxidación de la hidroxilamina, que pueden entrar en la cadena transportadora de electrones.

Según Grant y Long (1989), globalmente el proceso produce un intercambio de energía libre que se estima según la ecuación siguiente:



Nitrificación Fase 2

En esta fase, los grupos de bacterias, principalmente, están formadas por los géneros *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira* (Bock *et al.*, 1992).

Según el análisis filogenético a partir de recientes análisis con cultivos puros, basados en secuencias del gen 16S y RNA, para las especies oxidadoras de nitrito, estas se pueden agrupar dentro de la α -subdivisión.

La reacción de oxidación de nitrito se ajusta a la siguiente ecuación (Hollocher, 1984).



El sistema oxidador de nitrito está unido a la membrana (O'Kelly *et al.*, 1970). Se denomina nitrito oxidoreductasa, las bacterias que lo poseen tienen un color pardo característico.

La reacción global, quedaría resumida en la siguiente:



La velocidad de la reacción de formación de nitritos por *Nitrosomonas* es sensiblemente inferior a la formación de nitratos por parte de *Nitrobacter*. Por ello, la velocidad de reacción global está determinada por la primera, con lo que el nitrógeno amoniacal en el sustrato es limitante y no suele detectarse presencia de nitritos significativa (Larrea, 1998).

El rendimiento energético de las fosforilaciones oxidativas de estos compuestos reducidos de nitrógeno es bastante bajo, por lo que el crecimiento de estas bacterias quimioautótrofas es bastante lento.

Stephen *et al.*, (1996) consideran que en ecosistemas costeros marinos *Nitrosomonas* spp. y *Nitrobacter* spp. son los principales organismos responsables de las dos etapas del proceso, respectivamente, aunque se tiene primeras evidencias de la existencia de *Nitrospiras* spp. marinas.

De la reacción global se deduce las siguientes características cruciales del proceso de nitrificación:

- ❖ La oxidación de 1 gramo de nitrógeno amoniacal produce 1 gramo de nitrógeno como nitrato y consume 4.57 gramos de oxígeno.
- ❖ Resulta que 1 mg de nitrógeno amoniacal oxidado consume 7.14 mg/l de alcalinidad, como CaCO_3 .

Importante es tener en cuenta la liberalización al medio de hidrogeniones en el primer paso, en la oxidación del amonio, responsable de la acidificación del medio, pudiendo ser un problema en sistemas cerrados, y responsable de la propia inhibición de la actividad nitrificación (Gray, 1990; Ruiz *et al.*, 2003).

3.2.1.2.- Factores que afectan a la Nitrificación

Cabe destacar entre los factores que influyen en la nitrificación el oxígeno disuelto, salinidad, temperatura, pH, compuestos tóxicos o inhibidores, la radiación solar.

1.- Oxígeno Disuelto.- Los microorganismos nitrificantes son aerobios estrictos, por lo que se considera que el oxígeno es el principal factor limitante para la nitrificación, pues sin este no puede realizarse la oxidación. Para autores como Larrea (1998), concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 2 mg/l, la tasa de crecimiento se reduce significativamente.

Los resultados de modelos y de la experiencia en nitrificación de biopelícula fija (Rittmann and Mccarty, 2001) indican que las bacterias nitrificantes tienden acumularse más cerca de la superficie de adherencia, mientras que los heterótrofos predominan cerca de la capa superior de la película fija. Esta <<estratificación>> es una consecuencia natural de la mayor tasa de crecimiento de los heterótrofos, que permite que existan establemente en la región de la biopelícula fija que sufre las mayores tasas de predación y desprendimientos.

En contrapartida, el hecho de que los nitrificantes estén en la profundidad de la película fija disminuye la pérdida por predación y desprendimiento a los de lento crecimiento, aumenta la susceptibilidad a la limitación de oxígeno disuelto, dado que el oxígeno disuelto debe difundirse por la capa heterótrofa antes de alcanzar a los nitrificantes. Al juntarse con la relativamente alta sensibilidad al oxígeno de los nitrificantes (Campos *et al.*, 1999), bajas concentraciones del oxígeno disuelto en el interior de la biopelículas pueden invalidar las ventajas de protección, si la concentración de oxígeno disuelto del líquido a tratar no se mantiene suficientemente alta. Furumai y Rittman (1994) describieron disminuciones en las poblaciones de nitrificantes y aumentos en las concentraciones en el efluente de N-NH_4^+ y N-NO_2^- una vez que la concentración de oxígeno disuelto caía por debajo de aproximadamente de 3 mg/l.

Se sabe que *Nitrobacter* puede crecer aeróbicamente con nitrito, piruvato, acetato o glicerol como fuentes de energía. Cuando crece heterotróficamente el sistema oxidador de nitrito se reprime. *Nitrobacter* también es capaz de crecer en anaerobiosis, reduciendo el nitrato a nitrito con piruvato, acetato o glicerol como donadores de electrones. Por lo tanto el proceso de oxidación de nitrito llevado a cabo por *Nitrobacter* es reversible (Sundermeyer-Klinger *et al.*, 1984).

En tratamientos biológicos como los sistemas de biodiscos o biocilindros, la difusión del oxígeno fue el sustrato limitante para que la nitrificación fuese completa, bajo condiciones reales de aguas residuales (Gonec and Harremoës, 1985). Esto implica que los sistemas de difusión de oxígeno puede seleccionar los sistemas de tratamientos destinados a la nitrificación.

2.- Salinidad.- En los procesos de nitrificación, tanto los géneros *Nitrosomonas* como *Nitrobacter* se ven afectadas por la presencia del cloruro sódico (Nowak *et al.*, 1994), reduciendo la nitrificación del influente, siendo las primeras las más afectadas (Vredendregt *et al.*, 1997), aunque en 1995 los autores Schenk y Hergemann encontraron que la oxidación de nitritos es más sensible a alta concentración salina que la oxidación del amonio.

Esta influencia en el proceso biológico obliga a una adaptación de la microbiota a la concentración salina, para evitar un descenso en su actividad (Glass and Silvertsein, 1999). Los procesos de nitrificación se ven menos afectados por la salinidad que los procesos de desnitrificación (Andreadakis *et al.*, 1997). Igualmente Pansward y Anan (1999), encontraron que la nitrificación es un proceso sensible a alta concentración salina con una inhibición del 55 % con 30 g NaCl/l inicialmente en el proceso, pero recuperando la actividad nitrificante en unos pocos días. Estos mismos autores usando organismos adaptados a alta salinidad para utilizarlos en sistemas anaeróbico/anóxico/aeróbico, obtuvieron muy buenos resultados en la eliminación de materia orgánica y nitrógeno.

Los efectos de la salinidad en la inhibición de la nitrificación han sido también investigados usando como tratamiento fangos activos, observándose que la actividad

nitrificante específica se ve afectada por la salinidad (Dincer and Kargi, 2001; Campos *et al.*, 2002) y que la nitrificación descendía aproximadamente un 20 % con un 5 % en sal comparado si la nitrificación se llevará a cabo en aguas libres de sal (Dincer and Kargi, 2001).

Rosa *et al.*, (1998) investigaron el desarrollo de biopelícula y los parámetros de proceso de la nitrificación de un agua sintética con una concentración en NaCl del 50% mediante filtros sumergidos aireados. Consiguieron que a los 10 días de la puesta en marcha del sistema se forme una biopelícula con una actividad estable, y con un tiempo de retención de 15 horas, la eliminación de amonio en un 94%.

3.- Temperatura.- Como proceso biológico que es, la temperatura afecta al proceso de nitrificación, limitando la velocidad de crecimiento. Así pues, a menores temperaturas, menor velocidad de crecimiento de las bacterias (Knoop and Krunst, 1998).

La velocidad de crecimiento de las nitrobacterias, incluso en condiciones óptimas, es lenta si se compara con bacterias heterótrofas. Según el Manual Bergey (1984), el crecimiento quimiolitotrofo es máximo a 28-30°C, a pH 7.5- 8.0, concentración 2-10mM de amonio (nitrificantes fase 1) y 2-30mM de nitrato (nitrificantes fase 2), oscuridad y presión parcial de oxígeno. Para Bitton (1994) este proceso tiene un óptimo de temperatura en torno a los 30°C.

Hay muchos resultados en la literatura que refleja el efecto de la temperatura sobre la actividad nitrificante. Hutton y LaRocca (1975) publicaron que para aguas residuales con un contenido de nitrógeno de amonio de 700 mg/l se dobla la actividad nitrificante para aumentos de 10 °C en el rango entre 10 y 35 °C. Bruce *et al.*, (1999) observaron que la eliminación de amonio en lodos de depuradora es mayor en los meses de verano (15-18 °C) con un 60-80 % de rendimiento que en los meses de invierno (5-10°C) con un solo 20-40 % de eliminación. En una planta piloto para el tratamiento de aguas residuales industriales (Randall and Buth, 1984), obtuvieron que la nitrificación conseguía su óptimo cuando la temperatura del tanque del licor mezcla alcanzaba entre 24-26 °C.

4.- *pH*.- Es otro de los factores importantes al crecimiento y actividad de los microorganismos (Nowak *et al.*, 1994), teniendo para diferentes autores (Jones and Paskins, 1982; Painter and Loveless, 1983; etc) su óptimo de pH en el rango comprendido entre 7.0 y 8.0.

Para Larrea (1998), las bacterias nitrificantes son muy sensibles a pH inferiores a 7, ya que la nitrificación como se ha dicho, conlleva un elevado consumo de alcalinidad, si no se tiene una alcalinidad suficiente se puede producir una reducción del pH con la consiguiente reducción de la velocidad de nitrificación.

Para un cultivo enriquecido para nitrificantes, Jones y Paskins (1982) reflejan en su estudio una tasa de actividad máxima a un pH de 7.8 con un 50% de actividad a un pH de 7.4. Wickens (1983) observó para un tratamiento biológico mediante filtros en agua de mar, que la nitrificación se inhibía a un pH por debajo de 6.3 cuando la concentración de carbono inorgánico era baja.

Estos rangos óptimos están determinados por tres efectos que el pH puede ejercer sobre las bacterias nitrificantes, a saber (Villaverde *et al.*, 1996):

- Activación-desactivación de las bacterias nitrificantes; es debido al equilibrio de los iones H^+ o OH^- en los débiles grupos ácido-base de las enzimas, bloqueando los centros reversibles de actividad.
- Efecto nutricional, vinculado con la alcalinidad; esta enlazado con el aprovechamiento del carbono mineral el cual es fuente de carbono para los microorganismos nitrificantes autótrofos. Este aprovechamiento esta controlado por el equilibrio químico ($CO_3^{2-} \rightarrow HCO_3^- \rightarrow CO_2$) que esta a su vez controlado fuertemente por el pH.
- Inhibición por amonio libre y ácido nitroso libre, y por metales pesados; sus concentraciones son función de la temperatura, pH e incluso concentración de amonio y nitrato. La concentración de amonio libre se

incrementa a pH básicos, mientras que la concentración de ácido nitroso se incrementa a pH ácidos.

La oxidación de amonio a nitrato por bacterias nitrificantes provoca una depresión en el pH con la consiguiente disminución en la actividad nitrificante. Para resolver el problema de disminución del pH en distintos tratamientos, se han utilizado compuestos naturales con capacidad tamponante: tiza, kaolinita y otras rocas de carbonato cálcico (Green *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2002).

5.- Compuestos Tóxicos o Inhibidores.- Son sustancias que actúan disminuyendo o inhibiendo el crecimiento y/o la actividad de las bacterias en los sistemas de tratamiento.

Las propias sustancias que se generan en el proceso de nitrificación (amonio, nitrito, nitrato, etc) pueden llegar a ser tóxicos dependiendo de la concentración que se consiga. Nowark (1994) defiende que los procesos de nitrificación son capaces de adaptarse a estas sustancias, el problema se origina cuando existen grandes incrementos de estos compuestos en un corto periodo de tiempo.

Songming y Shulin (2001) han estudiado el efecto del carbono orgánico sobre la desnitrificación, llegando a la conclusión que relaciones de C/N iguales a 1 o 2 provocan aproximadamente una reducción del 70% en la eliminación de nitrógeno amoniacal en comparación a concentraciones similares de nitrógeno pero sin carbono. En cambio, para Painter,(1986) la materia orgánica *per se* no es tóxica, sugiriendo que un factor asociado a la degradación de la materia orgánica como es el oxígeno disuelto es más limitante en el proceso de nitrificación.

Entre otros compuestos inhibidores del proceso de nitrificación, se pueden destacar, el fenol (Nguyen and Shieh, 1995), metales pesados (Orhon *et al.*, 2000) y otras sustancias más específicas.

Para Painter (1986) existen cuatro grupos de compuesto que particularmente inhiben la oxidación de amonio a nitrito, a saber, S-C-N (isotiocianato pero no tiocianato), aminas, compuestos fenólicos y cíclicos del nitrógeno.

Lo anteriormente mencionado es solo un ejemplo de sustancias inhibitoras, pues la literatura científica es abundante en sustancias inhibitoras que ocuparían paginas y paginas, no siendo este el objetivo de este trabajo.

6.- La radiación Solar.- La luz ultravioleta debido a su baja longitud de onda es letal para los organismos nitrificantes, siendo *Nitrobacter* mas sensible que *Nitrosomonas* (Olson, 1981). Se ha demostrado un aumento en el proceso de nitrificación en oscuridad (Guerrero and Jones, 1996).

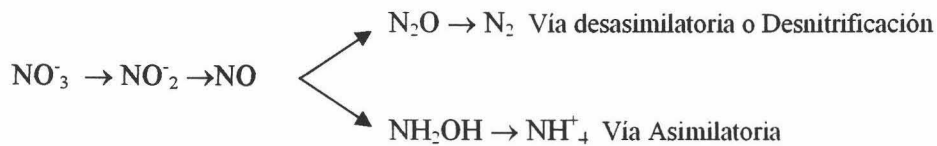
Según investigaciones realizadas en el medio ambiente marino, la carencia de actividad nitrificante en la zona fótica en este medio se atribuye al hecho de que las nitrificantes se inhiben por la radiación solar (Bock, 1965; Müller-Nuglück and Engel, 1961). La inhibición es causada por longitudes de onda próximos a 480 nm y el mecanismo de inhibición parece estar relacionado con la fotooxidacion del citocromo *c* (Bock, 1965).

Resumiendo, las bacterias nitrificantes son autótrofas, quimiolitótrofas y aerobias obligadas. Cada factor es crucial para comprender si los nitrificantes pueden ser seleccionados y acumulados en un proceso biológico. Al ser autótrofas, los nitrificantes deben fijar y reducir carbono inorgánico. Esto es un proceso costoso en energía, que es primariamente responsable de que los nitrificantes tengan valores mucho menores en tasas de crecimiento y acumulación de biomasa que los heterótrofos aerobios. Su naturaleza quimiolitotrófica hacen de igual manera que sus tasas de crecimiento y acumulación de biomasa sean menores, ya que sus donantes de electrones de nitrógeno liberan menos energía por equivalente de electrón que los donantes de electrones orgánicos. Todo ello, implica o se traduce por consiguiente en que los nitrificantes crecen lentamente. Al ser aerobios obligados usan O₂ para respirar y como reactante directo de la monooxigenación inicial de NH₄⁺ a NH₂OH (hidroxilamina). Este uso puede ser la razón

de que los nitrificantes sean relativamente intolerantes a concentraciones bajas de oxígeno disuelto; el catabolismo nitrificador se retrasa por limitaciones de oxígeno a concentraciones que no tienen efecto en muchos heterótrofos.

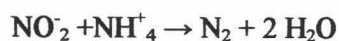
3.2.2.- Desnitrificación

Muchos microorganismos tienen la capacidad de reducir los óxidos de Nitrógeno (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O) en condiciones anóxicas, cuando dichos compuestos substituyen al oxígeno como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria. Si la reducción continúa hasta la generación de gases de N_2 y N_2O , que se pierden a la atmósfera, el proceso es conocido como **desnitrificación**. Según Payne (1981) consiste en la reducción desasimilatoria de NO_3^- y NO_2^- a los gases N_2 y N_2O



Autores como Margalis y Lovelock (1974), postularon que fueron las bacterias desnitrificantes, las que comenzaron este proceso desde los orígenes de la biosfera, las que generaron mediante este proceso el N_2 presente en la atmósfera y que hoy en día lo mantienen en equilibrio. El proceso de la desnitrificación se hace público de la mano de Smith (1867), al afirmar éste, que el nitrato desaparecía de los suelos con alto contenido en materia orgánica.

Ahora bien en los últimos años se ha demostrado y como caso poco común que bajo condiciones anóxicas, el nitrito puede ser convertido en nitrógeno gas con el amonio como donador de electrones, proceso denominado como proceso de **Oxidación Anaeróbica del Amonio** (van Dongen *et al.*, 2000). Este proceso es corroborado por Fernández-Polanco *et al.* (2000) en un estudio para la eliminación simultánea de nitrógeno y azufre, siendo la reacción bioquímica la siguiente.



Schmidt *et al.* (2002) recogen en su publicación una propuesta de modelo para la oxidación anaeróbica del amonio (Figura 3.2) e incluso microorganismos con esta característica como *Candidatus brocadia anammoxidans*.

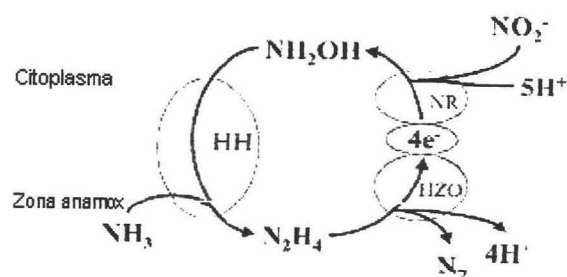


Figura.3.2.- Propuesta de modelo para la oxidación anaeróbica del amonio.

Los microorganismos desnitrificantes, a diferencia de los nitrificantes, pertenecen a diversos grupos bioquímicos y taxonómicos. De entre todos ellos se puede destacar los géneros: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Spirillum*. Son procariotas aerobios o anaerobios, quimiotrofos (o heterótrofos), incluyendo arqueobacterias y eubacterias caracterizados por la habilidad de usar NO_3^- y NO_2^- como aceptores de electrones produciendo principalmente N_2 (Prescott *et al.*, 1999; Atlas and Bartha, 1998).

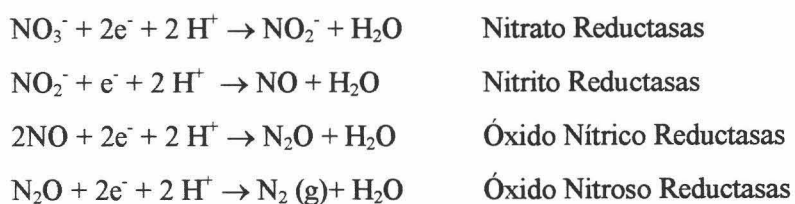
La mayoría son aerobios con capacidad de alternar la respiración con NO_3^- y NO_2^- cuando el oxígeno está limitado. Solo cuando falta este elemento gaseoso se transforma el sistema enzimático para activar la respiración anóxica. La transformación anóxica a aerobia se produce enseguida, de ahí que la primera de estas respiraciones tenga apariencia de una solución de urgencia que se activa cuando falta oxígeno. Pero la obtención de energía viene a ser un 10% menor que en el caso de disponerse de oxígeno como aceptor de electrones (Rheinheimer, 1987).

A pesar de todo, en muchas aguas se observan procesos de desnitrificación, aunque quede oxígeno; a este respecto se trata siempre de medios acuosos con un contenido relativamente elevado de material detrítico, lo que significa que la microbiota crece en éstos creando microzonas carentes de oxígeno y en las cuales son posibles los procesos de desnitrificación (Jannasch, 1960).

Según Rheinheimer (1987), la desnitrificación es posible en presencia de oxígeno cuando hay disponibles y en abundancia compuestos de carbono de fácil asimilación.

En las zonas anaerobias del mar es también frecuente la desnitrificación activa. Heitzer y Ottow (1976) hallaron varios millones de microorganismos desnitrificantes por gramo en muestras de la capa superior del sedimento del Mar Rojo. Se llegó con dicha investigación a un estudio taxonómico, de la cual resultó que la mayor parte de las bacterias pertenecían al género *Pseudomonas*.

La desnitrificación procede en forma de pasos en los que los nitratos (NO_3^-) se reducen secuencialmente a nitritos (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno gas (N_2). Cada semirreacción y la encima que la cataliza se muestran a continuación:



Como consecuencia de estas reacciones la desnitrificación produce bases fuertes (Rittman and McCarty, 2001). Esa producción se ilustra en la siguiente reacción en la que el acetato (Yamagishi *et al.*, 2001) es el donante de electrones en desnitrificantes heterótrofos:



La alcalinidad del agua se aumenta en 8/5 equivalentes de base fuerte producidos cuando se reduce 8/5 de N-NO_3^- . En cuanto a materia, esto supone un aumento de alcalinidad de 3.57 g como CaCO_3/g de N-NO_3 consumido. En aguas de baja alcalinidad, el control de pH puede resultar un problema.

3.2.2.1.- Factores que afectan a la desnitrificación

Al igual que en el caso de la nitrificación, la desnitrificación también se ve afectada por diferentes factores, pero si además este proceso biológico va a ser utilizado para aplicarse en un tratamiento industrial habrá de tenerse en cuenta dichos factores, para poder controlarlo.

1.- Donador de Electrones.- Dependerá de que se trate de un microorganismo autótrofo o heterótrofo. Ahora bien, son estos últimos los más abundantes en el medio y los que más fácilmente proliferan, siendo de esa manera necesaria una fuente de carbono para que tenga lugar la desnitrificación.

La capacidad desnitrificante está fuertemente influenciada no sólo por el contenido en carbono sino por la calidad de este donador de electrones. Es muy amplia la gama de fuentes de carbono, pero son las moléculas fácilmente metabolizables como carbohidratos, alcoholes o ácidos orgánicos (Akunna *et al.*, 1993; Sison *et al.*, 1996), más concretamente sacarosa y etanol (Gómez *et al.*, 2000a), metanol (Pujol *et al.*, 1994), acetato (Yamagishi *et al.*, 2001) las preferidas y así aconsejables para su utilización.

Gómez *et al.* (2000a) observaron en su estudio, que dependiendo de la fuente de carbono los efectos negativos del oxígeno disuelto sobre la desnitrificación son diferentes, es decir, que los efectos del oxígeno disuelto depende de la fuente de carbono que se utilice. En este estudio se demostró que con el etanol y metanol esos efectos eran menores que con la sacarosa.

Dado que el metanol es relativamente barato, su utilización se difundió mucho, dando origen a una base de datos muy grande de dicho producto. Al ser un producto de

un solo carbono, el metanol tiene algunas características poco frecuentes como donante de electrones orgánico. Cuando es el donante exógeno, no puede ser directamente aplicada en situaciones en las que el donante es otra molécula orgánica interna (Rittman and McCarty, 2001).

El tipo de fuente de carbono y la concentración de ésta influirán en la mayor o menor reducción desasimilatoria de nitrato. Hay autores que defienden que para sistemas donde se necesita baja concentración de DQO, la relación DQO/N_{total} debe ser superior a 3.4 para que se elimine nitrato (Fang and Zhou, 1999) o incluso superior a 8 como afirman Brond y Sund (1994). Tseng *et al.*, (1998) indican que para producirse una desnitrificación completa la relación de DQO/Nitrógeno total Kjeldahl del influente debe ser superior a 5.3, acumulándose nitratos y nitritos en el sistema cuando la relación está por debajo de 5.1.

Concentraciones muy bajas de donantes de electrones o concentraciones muy altas de oxígeno disuelto pueden conducir a acumulación de intermedios de desnitrificación: NO_2^- , NO_2 y N_2O . Una concentración baja de donante limita el suministro de electrones para conducir las semirreacciones reductoras. Una concentración elevada de O_2 tiende a reprimir las reductasas de óxidos nítrico y nitroso antes de que se reprima la reductasa de nitrato (Payne, 1981).

2.- **Oxígeno.**- Principalmente puede afectar al proceso por medio de tres efectos diferentes:

- ❖ Efecto competitivo: desciende la reducción desasimilatoria de óxidos de nitrógeno, al aportar más energía a la bacteria el empleo del oxígeno como último aceptor de electrones (Thauer *et al.*, 1977).
- ❖ Efecto inhibitor a nivel enzimático, descendiendo la actividad de ciertas enzimas (Davies, 1989).

- ❖ Efecto inhibitor a nivel genético al no permitir la síntesis de ciertas enzimas en función de su concentración (Braun and Zumft, 1992).

Para Rittman y McCarty (2001), el oxígeno puede controlar de dos maneras la desnitrificación. La primera es la represión de los diversos genes reductasa de nitrógeno. La investigación con *Pseudomonas stutzeri* revelan que estos genes se reprimen por concentraciones oxígeno disuelto mayor de 2.5 a 5 mg O₂/l (Korner and Zumft, 1989). El segundo mecanismo de control es la inhibición de la actividad de la reductasa por concentraciones de unas pocas decenas de mg O₂/l (Rittman and Langeland, 1985). El hecho de que las concentraciones de oxígeno disuelto que inhiben la actividad de las reductasas son muy superiores a las concentraciones que las que reprimen los genes de reductasas significa que la desnitrificación puede producirse cuando las concentraciones en oxígeno disuelto está muy por encima de 0.0 (De Silva, 1997). Esta situación se mejora cuando las bacterias desnitrificantes se sitúan dentro de flóculos o películas fijas, donde la concentración de oxígeno es más baja que en el líquido a tratar (Rittman and Langeland, 1985).

Punzava *et al.*, (2001) señalan que la desnitrificación se lleva a cabo en la mayor parte de la biopelícula cuando la concentración de oxígeno disuelto del influente se encuentra por debajo de 3 mg/l pues según demuestran estos mismos autores la penetración de oxígeno disuelto en la biopelícula con los valores indicados no es significativa como para afectar a la microbiota responsable de la desnitrificación que compone la biopelícula. Varios investigadores (Hontoria *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2000a) consiguieron detectar actividad desnitrificante en el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con nitratos con valores de oxígeno disuelto de hasta 4.5 mgO₂/l.

Según Rittman y McCarty (2001) los desnitrificantes heterótrofos tienen características cinéticas similares a los heterótrofos aerobios, por lo que los procesos de desnitrificación deberían funcionar de forma parecida a los procesos aerobios utilizados para eliminar DBO.

Aunque como ya se ha visto, los efectos son desiguales según las cepas bacterianas y según las condiciones en la que se encuentre el medio donde se esta produciendo la desnitrificación, aunque por regla general, la capacidad de eliminación de nitrato desciende de modo proporcional a la concentración de oxígeno, sobre todo cuando la bacteria posee los dos mecanismos respiratorios.

3.- Aceptores de Electrones.- el proceso de desnitrificación no tendrá lugar sin la presencia de los óxidos de nitrógeno que deben actuar como aceptores de electrones. Estos a su vez son los responsables de la síntesis de las enzimas desnitrificantes (Cutruzzolà, 1999).

Ahora bien, hay que tener en cuenta que estos mismos óxidos de nitrógeno pueden afectar a los rendimientos en la eliminación de nitrógeno, sobre todo en los procesos en los que la concentración de nitratos es elevada (Thomsen *et al.*, 1994)

Una característica importante de las bacterias desnitrificantes es que utilizan a menudo nitrato o nitritos como fuente de N en la síntesis celular. El coste adicional en electrones para reducir la fuente de N al estado de oxidación -3 reduce el rendimiento real (Rittman and McCarty 2001).

4.- Microorganismos Desnitrificantes.- son los responsables que la desnitrificación biológica se lleve a cabo en el sistema elegido. Muchos de los microorganismos reconocidos como desnitrificantes son quimiotrofos y heterótrofos. Son muchos los grupos y especies los que tienen la capacidad desnitrificante pero es el genero *Pseudomonas* los que más especies desnitrificantes cuenta, más que cualquier otro género (Payne, 1981).

Estos son los cuatro componentes, donantes de electrones, oxígeno disuelto, aceptores de electrones y microorganismos desnitrificantes, esenciales para conocer y controlar la desnitrificación biológica si se quiere aplicar como tratamiento para la eliminación de nitrógeno en aguas (Payne, 1981).

A continuación se describen otros factores que pueden implicar o afectar a la desnitrificación:

5.- **Salinidad del Medio.**- de igual forma que en la nitrificación, la salinidad afecta a los procesos anaerobios de desnitrificación (Soto, 1993), viéndose más afectados que la nitrificación (Andreadakis *et al.*, 1997), y siendo necesaria también la adaptación de la microbiota a la concentración salina. En la investigación llevada a cabo por Park *et al.* (2001) se observó que la eficiencia desnitrificante se veía afectada por la salinidad pero que dicha actividad era recuperada después de 10 días de operar bajo las condiciones de salinidad.

Lawson (1981) observó que el proceso de desnitrificación cesaba para una relación Na^+/MLSSV superior a 1.9. Por lo contrario autores como De Vries y Hapstaken (1984) o Kristensen y Jepsen (1991) observaron como el proceso podría darse a valores superiores de hasta 30 g/l de Cl^- .

Se ha demostrado que bajo las condiciones de pH 9.0 y con una concentración del 12.5 % en Cl Na , *Halomonaas campisalis* una bacteria halófila moderada desnitrificante es capaz de reducir el nitrato y eliminarlo, con unas tasas específica de desnitrificación similar a bacterias que desnitrifican con concentraciones menores del 1% en NaCl (Peyton *et al.*, 2001).

6.- **pH.**- el pH óptimo para la desnitrificación está próximo a la neutralidad, ligeramente alcalinos (7.0-8.5) aunque el valor varía con la especie (Thomas *et al.*, 1994). Tanto un incremento como un decremento del pH provocan una acumulación de intermedios o un descenso en la actividad desnitrificante, llegando a pasar de un 100% de actividad a pH 7.0-8.0 hasta un 30% a pH inferiores a 6.0 o superiores a 9.0 (Beaubien *et al.*, 1995). De todos modos, este proceso se ha llegado a describir a pH entre 3.0 y 11.0, dependiendo en muchas ocasiones de la especie bacteriana, sin embargo, para valores que se salen de la neutralidad se detecta un importante descenso en la reducción de nitrato. Estos efectos se deben básicamente a un efecto inhibitorio a nivel enzimático, semejante al que se aprecia

por efecto del O₂. Para otros autores el pH oscila entre 7.5 y 8.5 inhibiéndose a pH 6.0 (Bitton, 1994).

Aunque los desnitrificantes no son especialmente sensibles al pH, los valores de pH fuera del intervalo óptimo, según caso, entre 7-8 pueden conducir a la acumulación de intermedios. Como se ha podido ver la desnitrificación produce bases fuertes que puede afectar al pH del medio en donde se produzca dicha actividad. Son diversos los autores que han utilizado diferentes sustancias: limonita (Liu and Koenig, 2002) o cápsulas artificiales cuyo contenido en el interior era KH₂PO₄ sensible al pH (Rust *et al.*, 2002), para regular el pH en procesos de desnitrificación en sistemas de depuración de aguas residuales.

7.- Temperatura.- como proceso biológico que es la desnitrificación es dependiente de la temperatura. Se puede considerar que la desnitrificación depende exponencialmente de este parámetro. Debido a esta influencia es de considerar una variación estacional del proceso, siendo más activo en verano y menos en invierno.

Bitton (1994) considera que en el agua no existe desnitrificación con temperaturas por debajo de 5 °C. Mc Kenney *et al.*, (1984) indican que el límite superior vendrá marcado por la desnaturalización de las proteínas, aceptando como máximo en 50°C .

De igual manera que en el caso del pH se ha detectado también cierta influencia a nivel enzimático de la temperatura que pueden dar lugar a incrementos en la producción de N₂O, sobre todo con el descenso de ésta.

8.- Presencia de Sustancias Tóxicas.- sustancias como metales pesados (Orhon *et al.*, 2000), pesticidas, sustancias fenólicas (Nguyen and Shieh, 1995) etc., que pueden aparecer en hábitat normales de desnitrificantes, pueden inhibir los procesos enzimáticos y afectar negativamente al desarrollo de los procesos metabólicos. Esta influencia afectará tanto al número de microorganismos como a su metabolismo.

La presencia de una mínima cantidad de mercurio (5µg/l) en los sedimentos marinos de una colonia británica aparentemente suprimieron más el crecimiento que la actividad desnitrificante (Koike and Hattori, 1975).

3.3.- DEGRADACIÓN DEL FENOL

El fenol como se ha visto, es un compuesto orgánico con alta toxicidad incluso en bajas concentraciones y su presencia en medios acuosos está severamente limitado por la legislación.

La eficacia de los tratamientos para aguas residuales con alto contenido en fenol pueden ser conducidos por técnicas físico-químicas, pero sin embargo son tratamientos muy complejos y costosos (González *et al.*, 2001). En este sentido, la aplicación de procesos de biodegradación puede ser una alternativa a estos procesos convencionales (Buitrón and López-Marín, 1998; Kapoor *et al.*, 1998; Hannaford and Kuek, 1999). La eliminación de fenol por vía biológica dependerá de muchos factores además de propia concentración, como por ejemplo la relación C/N (Fanng and Zhou, 1999), la estructura del compuesto, temperatura, salinidad, pH, existencia de nutrientes inorgánicos y del oxígeno (Berrjee, 1997; Demianov *et al.*, 1995).

Álvaro *et al.* (2000) indican que aguas residuales con contenido en fenol en el rango de 5-500 mg/l pueden ser consideradas apropiadas para tratarlas mediante procesos biológicos. Además, apuntan que la biodegradación de estos compuestos orgánicos usando cultivos puros de microorganismos pueden producir sustancias intermedias tóxicas igual o más que las originarias, pero que este problema puede ser superado si se utilizan cultivos mixtos que tienen un amplio espectro de propiedades metabólicas.

Muchas de las bacterias aeróbicas son capaces de usar compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía (Yang and Humphrey, 1975), y en este sentido, se han descrito diversos y muy eficaces métodos aeróbicos para la degradación del fenol (Brenner *et al.*, 1992), pero para Jianmin *et al.*, (1993), existen también procesos donde se ha degradado fenol por vía anaerobia usándose como única fuente de carbono, en

concentraciones de hasta 1260 mg/l, con la ventaja de que el efecto tóxico del fenol no es acumulativo ni permanente en procesos de degradación anaerobia (Fang and Chan, 1997), estos mismos autores llegan a lograr degradaciones de fenol de hasta un 98 % en influentes de 900 mg/l a 37 °C.

Mordocco *et al.*, (1999), señalan la existencia de una concentración umbral en la degradación del fenol a partir de la cual los sistemas biológicos pueden empezar a ser ineficaces o incluso provocar la muerte completa del sistema, siendo este umbral dependiente de las condiciones del medio y del tipo de bacteria o bacterias implicadas en el sistema, por lo que en algunos casos será preciso proceder a la dilución del influente.

Profundizando aún más en la biodegradación del fenol, se hace necesario evaluar la relación entre la tasa de crecimiento específica del cultivo a utilizar, μ , y la concentración de fenol, S . Esta biodegradación ha sido generalmente conocida por ser el fenol inhibidor de crecimiento bacteriano. La ecuación 1 (Haldane *et al.*, 1965) ha sido utilizada precisamente para describir esta degradación en cultivos tanto puros como mixtos.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + (S^2 / K_i)} \quad \text{Ecuación [1]}$$

En donde: μ_m es la tasa de crecimiento máximo específica.
 K_s coeficiente medio de saturación.
 K_i es el coeficiente de inhibición

Se da por sentado que la tasa de crecimiento específico depende de los valores instantáneos de la concentración de fenol, temperatura, pH y de la edad del inóculo. La degradación puede ser inhibida por compuestos como cianuros o sulfuros (Kumaran and Parachuri, 1997).

Con respecto al pH óptimo para la degradación del fenol van a depender del tipo de bacterias. De esta manera, autores como Álvaro *et al.* (2000) degradan fenol con *Pseudomona putida* a pH óptimo entre 6-6.8, mientras otros como Kanekar *et al.*, (1999) lo hacen con pH cercanos a 10.0.

Parece que las bacterias que mejor degradan el fenol son del género *Pseudomonas*, encontrando especies como *Ps. stutzeri* y *Ps. putida* (Banerjee, 1997; Sá and Boaventura, 2001; González *et al.*, 2001; Bertin *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001), *Ps. pictorum* (Chitra *et al.*, 1995) o *Ps. diminuta* (Kowalska *et al.*, 1998). Se han descrito especies de este género capaces de crecer en un amplio rango de compuestos fenólicos no clorados como única fuente de carbono y energía, jugando un papel importante en los ciclos del carbono de algunas bacterias del suelo y agua (Andreoni and Bestetti, 1988).

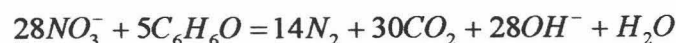
Según Buitrón *et al.*, (1998) los microorganismos que utilizan o intervienen en la degradación del fenol pueden proceder de los fangos de depuradora, que a partir de un inóculo los microorganismos van a ir creciendo paulatinamente adaptándose al nuevo medio. Algunos autores proponen que esa adaptación podría realizarse añadiendo una fuente de carbono junto con el fenol, como glucosa (Satsangee and Ghosh, 1996), e ir retirándosela hasta que el fenol sea la única fuente de carbono.

El trabajo de investigación realizado por Juárez (2002) con alpechines ricos en compuestos fenólicos concluye, que los alpechines pueden ser degradados por su propia microbiota, observándose que se puede degradar hasta un 75 % del contenido fenólico procedente del alpechín de centrifuga, un 80% de los fenoles procedente de alpechineras, y alrededor de un 50% de los compuestos fenólicos de los alpechines de balsa.

Los recientes trabajos realizados por Evans *et al.* (2001) correlaciona la simultánea reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} y la degradación de derivados fenólicos por microorganismos. Dichos trabajos se realizaron con aguas residuales industriales tratadas mediante lechos inundados, en unas condiciones de operación de carga de 5-21 mg de Cr (VI) / l. día y 840-3350 mg de fenol/ l. día, inoculando el reactor con *Pseudomona putida* y *E. coli* ATCC 33456.

La degradación de los compuestos aromáticos en condiciones de desnitrificación ha sido estudiada sobre todo con respecto a la biorremediación de la contaminación por gasolina, que se revisó en un artículo (Wilson y Bouwer, 1997). Por otra parte, los desnitrificantes degradadores de fenol han sido ya aislados (Aders et al., 1995; van Schie y Young, 1998), y estudiados en mayor profundidad. Esta es una prueba directa del potencial de los compuestos aromáticos para servir como donantes de electrones en la desnitrificación, como así a ocurrido en esta investigación.

El fenol se utilizó como fuente de carbono para la eliminación de nitrógeno por vía biológica desasimilativa Yamagishi *et al.*, (2001), para un agua preparada en laboratorio, obteniendo la siguiente ecuación:



3.3.1.- Degradación del fenol en medio salino.

La dificultad a la hora de degradar fenol aumenta si ésta se debe realizar en medio salino, de manera que si era difícil encontrar bacterias capaces de degradar fenol, la búsqueda se restringe si estas deben soportar además las condiciones que establece un medio salino.

Ahora bien, hay autores que afirman que hay microorganismos metanogénicos capaces de degradar fenol en condiciones salinas, en aguas residuales procedentes de petroleras con niveles de hasta 178 mg/l de fenol (Charest *et al.*, 1999). Otros como Kanekar *et al.* (1999), han encontrado especies halófilas moderadas como *Halomonas*, capaces de degradar fenol en concentraciones de 100 mg/l en agua residual con concentraciones de sal como valor óptimo cercanas a 30 g Cl⁻/l.

El uso de microorganismos halófilos para degradar sustratos como hidrocarburos aromáticos (Bertrand *et al.*, 1990), formaldehídos (Azachi *et al.*, 1995), y fenantreno (McMeekin *et al.*, 1993) ha sido bien documentado. El fenol tiene generalmente un efecto bactericida, pero muchos microorganismos han desarrollado

mecanismos para protegerse y poder usarlo como fuente de carbono y energía (van Schie and Young, 2000; Muñoz *et al.*, 2001). Numerosos estudios en la degradación del fenol han sido desarrollados con especies no halófilas, siendo la información de especies halófilas que degradan el fenol escasa y dispersa (Peyton *et al.*, 2002). Muñoz *et al.* (2001) aíslan e identifican a *Deleya venusta*, bacteria halófila moderada que crece en agua de mar pudiendo usar como fuente de carbono el fenol.

Woorland e Irvine (1995), consiguen la degradación del fenol hasta 99.5% con una concentración del 15 % de NaCl usando tratamientos de biopelícula. Hinteeregger y Streichsbier (1997) consiguen la eliminación casi por completo del fenol con concentración de NaCl del 14 %. Ambos resultados demuestran el potencial en la utilización de bacterias halófilas para el tratamiento para la eliminación del fenol con alto contenido salino en efluentes industriales (Peyton *et al.*, 2002).

Hay que destacar que los estudios e investigaciones llevadas a cabo para la eliminación de compuesto fenólicos bien sea en condiciones salinas o no (Woorland and Irvine, 1995; Evans *et al.*, Karim and Gupta, 2001; 2001; González *et al.*, 2001; Sá and Bonaventura, 2001; Alemzadeh *et al.*, 2002; Aszczyk *et al.*, 2002; Polaert *et al.*, 2002; Li and Wang, 2002; Peyton *et al.*, 2002, etc), se han realizado bajo efluentes sintéticos, es decir, las concentraciones de los distintos componentes del efluentes han sido preparadas en laboratorio, no procedían de efluentes reales.

3.3.2.- Rutas metabólicas de degradación de compuestos aromáticos.

3.3.2.1.- Rutas Aeróbicas

La dificultad principal para la degradación de compuestos aromáticos como los fenólicos reside en la rotura del anillo aromático, que presenta una elevada estabilidad termodinámica. La incorporación de radicales hidroxilo constituye el paso previo a la rotura del anillo bencénico; una vez producida la hidroxilación doble (si no existe ya), las moléculas quedan en condiciones para poder ser degradadas por diferentes rutas metabólicas (Gibson and Subrawahian, 1984).

Según las investigaciones clásicas de estas rutas metabólicas revelan que la mayoría de los sustratos aromáticos son degradados a través de dos intermediarios: los difenoles catecol y ácido protocatéquico, compuestos claves a partir de los cuales se inician posteriores procesos degradativos (Ribbons, 1966).

Los intermediarios catecol y ácido protocatéquico son transformados en compuestos alifáticos mediante fisión oxidativa del anillo aromático. En bacterias se han demostrado dos tipos distintos de fisión oxidativa (Dagley *et al.*, 1960):

- ❖ *Metafisión*: fisión del anillo aromático en un enlace C-C adyacente a un grupo hidroxilo.
- ❖ *Ortofisión (o ruta del β -ceto adipato)*: fisión oxidativa entre dos grupos hidroxilo adyacentes.

A su vez, cada uno de los dos tipos de fisión sigue una ruta de degradación distinta según el compuesto de partida sea el catecol o el ácido protocatéquico:

En el caso de la metafisión, las rutas a partir de catecol o ácido protocatéquico están totalmente separadas. Los productos finales de la vía son diferentes según el intermediario sea catecol (ácido fórmico, piruvato y acetaldehído) o ácido protocatéquico (ácido fórmico y 2 moléculas de piruvato).

En el caso de la ortofisión, las dos rutas a través de catecol o ácido protocatéquico son paralelas y convergentes, llegando a tres intermediarios comunes al final de la vía. Los productos finales de la vía son siempre succinato y el acetil CoA, intermediarios del ciclo de Krebs, fácilmente biodegradables.

Es de destacar que todos los compuestos finales obtenidos pueden integrarse eficientemente en las rutas metabólicas generales del microorganismo, sumándose a las transformaciones encaminadas a la obtención de energía en forma de ATP.

Las reacciones de fisión oxidativa están mediadas por oxigenasas, de manera que en esta clase particular de procesos metabólicos el oxígeno molecular no actúa solamente como aceptor terminal de electrones, sino que es a su vez un sustrato específico de las enzimas de la ruta. Por tanto, se trata de rutas aeróbicas en el sentido más estricto. Es decir, incluso en organismos capaces de utilizar otros compuestos distintos de oxígeno como aceptor final de electrones, las rutas de degradación por oxigenasas no funcionarían en ausencia de O₂ (Widdel and Rabus, 2001).

Según se acaba de ver, se puede decir que los compuestos aromáticos son degradados por las bacterias por 4 rutas diferentes:

- ✓ Metafisión con catecol como intermediario.
- ✓ Metafisión con ácido protocatéquico como intermediario.
- ✓ Ortofisión con catecol como intermediario.
- ✓ Ortofisión con ácido protocatéquico como intermediario.

Pero no todas las bacterias poseen las 4 rutas degradativas ni son capaces de degradar todos los compuestos aromáticos, sino que cada género o especie puede efectuar la degradación de un determinado grupo de estos compuestos y posee unas rutas metabólicas concretas para ello.

Se ha determinado que todos aquellos compuestos aromáticos cuya oxidación genera catecol como intermediario siguen la degradación por la vía de metafisión, mientras que los compuestos aromáticos que se oxidan generando ácido protocatéquico como intermediario siguen posteriormente la ruta de degradación del β-cetoadipato. No obstante, un estudio demuestra que el patrón de expresión de las enzimas de orto y metafisión puede variar en algunas cepas (Chen *et al.*, 1993).

3.3.2.2- Rutas anaeróbicas

Según autores como Heider *et al.*, (1999) y Widdel (2001), desde hace tiempo, desde los 80, se conocen nuevos organismos que son capaces de utilizar hidrocarburos saturados y aromáticos como sustratos de crecimiento bajo condiciones estrictas de anoxia. Estos microorganismos usan nitrato, hierro o sulfato como aceptores de electrones para realizar respiración anaeróbica (Figura 3.3).

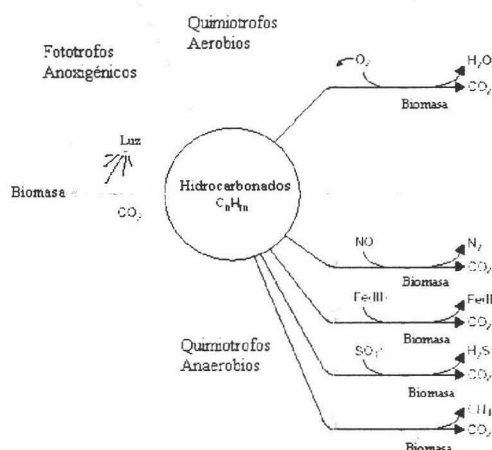


Figura 3.3.- Posibilidades en la utilización de hidrocarburos por parte de los microorganismos.

Ahora bien, siguiendo estos mismo autores (Heider *et al.*, 1999; Widdel, 2001), no hay agente bioquímico que bajo condiciones anóxicas tenga las mismas propiedades que el oxígeno en la activación en condiciones aeróbicas en la degradación de hidrocarburos. Los mecanismos de degradación de estos compuestos en condiciones anóxicas no están aun completas, es decir, que las reacciones de activación en condiciones anaerobias de hidrocarburos son mecanismos sin precedentes en bioquímica.

En general, las reacciones anaerobias son bastante lentas comparada con sus contrapartidas aerobias, pero se producen y tienen importancia en el caso de los hidrocarburos aromáticos (Rittman and McCarty, 2001).

3.4.- Consideraciones sobre el concepto Biopelícula.

3.4.1.- Concepto

Las biopelículas son conjuntos de microorganismos que están dispuestos en forma de capas en los que sus polímeros extracelulares hacen de unión (Characklis and

Wilderer, 1989). Hay procesos biológicos donde los microorganismos se fijan en la superficie de un material o medio de soporte, y estos crean una capa con alto contenido en agua y una gran concentración de biomasa que recubren el soporte y que se denomina película biológica fija o “Biopelícula fija”. Más técnicamente, se puede considerar como agrupaciones de células simples o microcolonias embebidas en una matriz polimérica de origen microbiano (EPS, Substancias Poliméricas Extracelulares), formada sobre un sustrato (Zhang and Bishop, 1994), las cuales les permiten realizar sus funciones vitales (Figura 3.4) de forma más selectiva y permitiéndoles a la vez captar una mayor concentración de nutrientes.

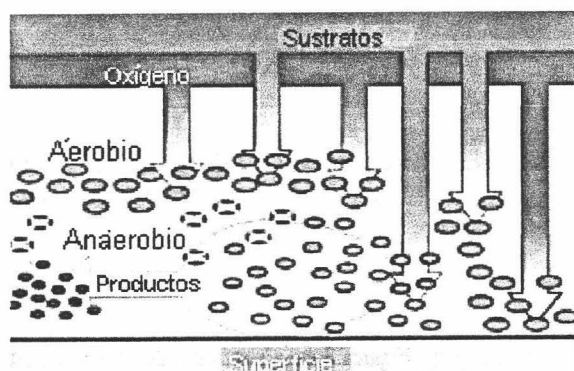


Figura 3.4.- Esquema de las funciones vitales de una biopelícula fija a una superficie

Dependiendo del lugar de formación y composición, estas biopelículas pueden desde provocar problemas de corrosión (Fang *et al.*, 2002) y contaminación microbiana hasta ser sistemas beneficiosos de tratamiento de aguas residuales (Lazarova *et al.*, 1999) o aguas subterráneas contaminadas (González-López *et al.*, 1998).

Como característica principal de esta asociación biológica consiste en que estos microorganismos están unidos a la superficie de un sólido que actúa de soporte, lo que implica que el donador de electrones, el aceptor de electrones y todos los demás nutrientes deban ser transportados a los microorganismos dentro de la película por difusión o cualquier otro proceso de transporte.

Las películas biológicas, que son células inmovilizadas naturales, se presentan en la naturaleza con gran profusión y tienen un interés cada vez más importante en ingeniería de procesos utilizados en control de la contaminación, tales como filtros percoladores, lechos inundados, lechos fluidificados, contactores biológicos rotativos, etc. Los procesos de biopelícula son simples, fiables y estables debido a que esa

inmovilización natural permite una retención y acumulación de biomasa excelente, sin necesidad de otros sistemas de separación de sólidos (Rittmann and McCarty, 2001).

3.4.2.- Características físico-químicas y microbiológicas

Son varias las hipótesis que tratan de explicar la estructura física de las biopelículas que se pueden resumir en las siguientes:

- 1.- Para autores como Bishop (1996), se considera como sistemas estratificados que crecen de forma perpendicular al soporte y en donde habría una transferencia de masas desde la capa superficial a la capa interna.
- 2.- Lewandowski *et al.* (1995), las consideran sistemas tridimensionales donde hay estructuras heterogéneas muy canalizadas, canales que están llenos de agua y por donde circulan los nutrientes (Figura 3.5).

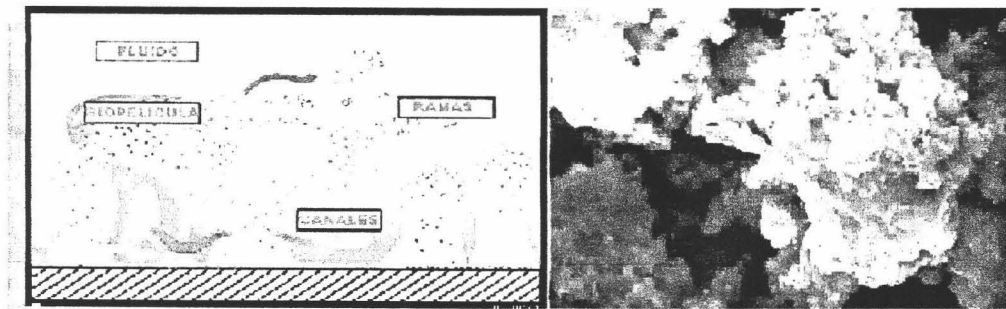


Figura 3.5.- Esquema de una biopelícula y ésta vista mediante microscopía electrónica de barrido de superficie.

- 3.- Wimpennng y Calasauti (1997), indican que además de los anteriores modelos existe otro, que es las de biopelículas densas. Dependiendo de la concentración de nutrientes la estructura de la biopelícula será más o menos densa o canalizada.

Según Characklis (1989), la densidad de las biopelículas varía desde valores tan bajos como 10 Kg/m^3 hasta valores de 105 Kg/m^3 . En cuanto a espesores la biopelícula puede también variar tremendamente, pudiéndose encontrar desde espesores

prácticamente del tamaño de las células (1-10 μm) hasta 100 μm en procesos aerobios. Estos espesores van a estar en función de la concentración de nutrientes y flujo del agua, tipo de sustrato, pH, tipos de microorganismos, temperatura, resistencia de la biopelícula, rugosidad del soporte y edad de la biopelícula.

El crecimiento de toda la biopelícula será el resultado de la transferencia de masas y su posterior transformación por parte de los componentes de la biopelícula. Los nutrientes circularán a través de ella de dos modos, uno sobre los canales o las capas superficiales mediante difusión o convección y en las capas interiores o celulares mediante fenómenos de transporte de masas (Beer and Stoodley, 1995)

Lo primero que hay que resaltar con respecto a la composición química de una biopelícula es que son sistemas altamente hidratados, facilitando así la transferencia de nutrientes. La biopelícula está compuesta por microorganismos, EPS, cationes multivalentes, partículas orgánicas, inorgánicas bien en estado coloidal o disueltas. Es el EPS el responsable principal de la integridad funcional y estructural de la biopelícula, considerado como el componente llave que determina las propiedades físico-químicas de la misma. El EPS está constituido por biopolímeros, polisacáridos y proteínas y de otras macromoléculas como DNA, lípidos y sustancias húmicas (Nielsen *et al.*, 1997). Hay que puntualizar que los polisacáridos no están necesariamente como componente principal en un EPS. En muchos casos, biopelículas de muestras naturales son las proteínas las que prevalecen y sustancias húmicas (Wingender *et al.*, 1999). Mencionar que los polisacáridos están unidos principalmente a la función estructural y funcional del biofilm, mientras que las proteínas están más consideradas en términos de la actividad enzimática de la biopelícula (Flemming *et al.*, 2000). En la Figura.3.6, se recogen las posibles interacciones dominantes intermoleculares que contribuyen a la estabilidad mecánica en una biopelícula. Solo unos pocos autores especulan que las proteínas extracelulares tienen una función estructural (Dignac *et al.*, 1998), sin embargo se debe asumir que no todas las proteínas extracelulares pueden ser enzimas.

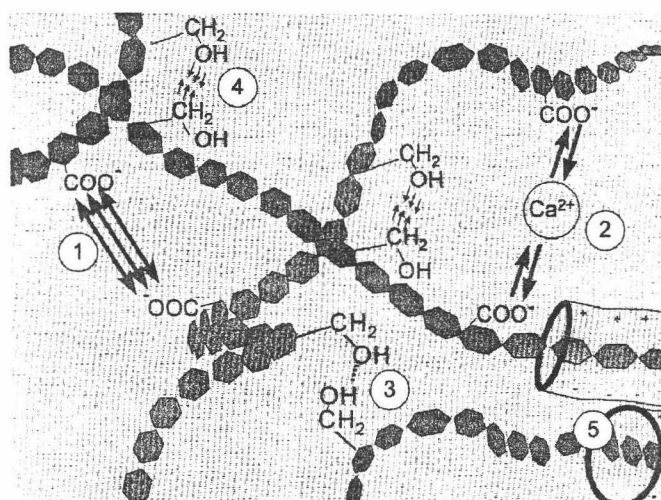


Figura.3.6.- Propuesta de modelo para las interacciones dominantes intermoleculares que contribuyen a la estabilidad mecánica en una biopelícula. Están considerados cinco fenómenos: 1= Repulsiones electrostáticas entre iones residuales: 2= fuerzas electrostáticas atractivas, típicas en presencia de cationes divalentes; 3= enlaces de hidrógenos: 4 = otras interacciones electrostáticas como pueden ser entre dipolos: 5= interacciones de dispersión.

Es también de destacar que la concentración de proteínas dependerá entre otros, del tipo de microorganismos que componga la biopelícula, concentración de materia orgánica o del oxígeno disponible, cuya limitación descende la concentración en proteínas (Jahn *et al.*, 1996), y otros compuestos procedentes bien de la lisis celular (ADN) o de la excreción de los microorganismos como ácido uránico o ácidos húmicos entre otros (Gómez, 1998).

La composición de los EPS determina muchas de las propiedades más importantes de la biopelícula, como densidad, porosidad, difusividad, resistencia a la fricción, conductividad térmica y actividad metabólica (Zhang *et al.*, 1999). El EPS parece proporcionar además muchos beneficios a las biopelículas incluyendo (Steven *et al.*, 2000):

1. Fuerzas de cohesión entre la biopelícula.
2. Absorción de nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos.
3. Absorción de productos del metabolismo microbiano.
4. Protección de la microbiota inmovilizada frente a cambios bruscos en el medio que les rodea.
5. Absorción de metales pesados presentes en el entorno.

6. Absorción de partículas.
7. Vía de transmisión de comunicación intercelular.
8. Aumenta la transferencia intercelular de material genético.

En cuanto a la composición bacteriana, va a responder a la capacidad de los diferentes grupos bacterianos a adaptarse a las condiciones del medio donde se desarrollan las biopelículas. Independientemente, la biopelícula no solo va a estar compuesta por bacterias, sino que microorganismos como protozoos, hongos, rotíferos, nematodos, anélidos e insectos, pueden formar parte de ésta (Bitton, 1994)

3.4.3.- Formación de la biopelícula

Se pueden diferenciar los siguientes pasos o etapas (Figura 3.7) en el proceso de colonización y formación de una biopelícula (Characklis, 1990; Allison *et al.*, 2000; Steven *et al.*, 2000; Stephens, 2002):

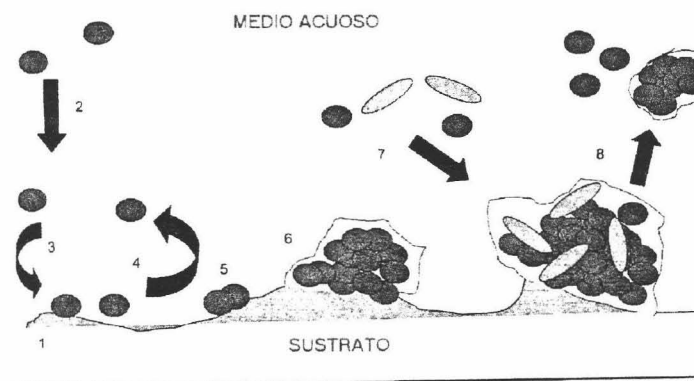


Figura 3.7.- Etapas en la formación de una biopelícula.

1. 1.- Acondicionamiento del medio soporte al adsorberse moléculas orgánicas sobre su superficie.
2. 2. Las células microbianas pasan desde el seno del líquido o fluido hasta el medio soporte acondicionado, principalmente controlada por interacciones electrostáticas. Parte de las células que llegan al soporte se adsorben a él.

3. La adsorción puede ser reversible
4. Se puede producir un desprendimiento o deserción.
5. Si el tiempo de adsorción es suficiente esta puede ser irreversible.
6. De manera que las células producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) formando una matriz polisacarídica que se extiende desde la superficie de las bacterias “anclando” a estas en la superficie soporte. Las células adsorbidas irreversiblemente crecen a expensas del sustrato y del agua incrementando el número de células en la biopelícula. A su vez, éstas pueden también producir o formar cantidades significativas de productos excretando algunos de ellos constituyendo parte de la biopelícula.
7. De esta forma, se produce la adhesión de las células microbianas y otros organismos, así como material particulado a la biopelícula.
8. En el transcurso de la formación y estabilización parte o porciones de la biopelícula se separan y vuelven al agua. Esta separación puede ser debida al esfuerzo cortante producido por el movimiento del fluido (Figura 3.8), a la acción mecánica de otras partículas que chocan contra la biopelícula y al desprendimiento de las capas debido a la pérdida de cohesión o de adherencia de la biopelícula (Tejero, 1998) y al aumento en espesor por el crecimiento de la biopelícula.

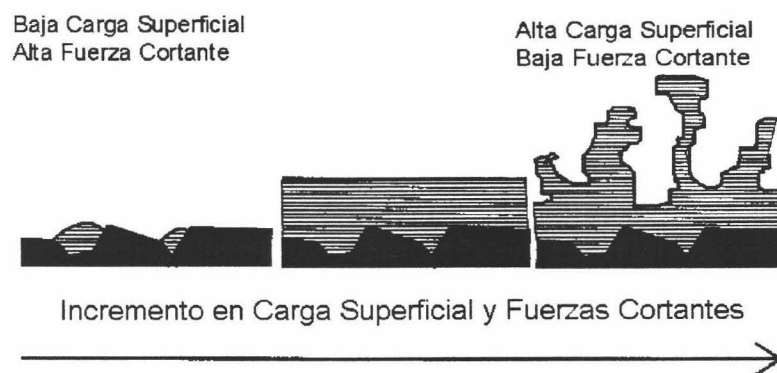


Figura 3.8.- Diferentes estructuras de biopelícula en función de la carga superficial y fuerzas cortantes.

En el crecimiento de la biopelícula se crea una estratificación en los grupos fisiológicos, debido fundamentalmente a la limitación de la transferencia de oxígeno. En el tiempo y en función del transporte de oxígeno a través de la biopelícula, la dinámica de esta va regenerándose. Conforme crece la biopelícula el oxígeno desaparece del interior produciéndose fenómenos anaerobios. Se forma gases en su interior (CH_4 , SH_2 , y otros gases) de manera que la salida de estos gases provocan desprendimientos masivos de biopelícula, principalmente aquella que esta muerta e inactiva y así va regenerándose.

Entrando en factores que influyen en la fijación de los microorganismos sobre un material soporte y así en su formación, las propiedades del fluido van a intervenir en la fijación de la microbiota de manera importante, y en la que se destacan como más importantes (Cohen, 2001):

pH.

Marcipar *et al.* (1978) estudiaron la adsorción de microorganismos en un material soporte cerámico inorgánico en función de los pH 4.0 y 6.0. Encontraron que la velocidad de adsorción era bastante específica para cada cepa microbiana, pero en el pH más bajo el porcentaje de microorganismos adsorbidos era mayor.

Una posible explicación para esta mayor adhesión de microorganismos a pH más bajos surge de la influencia del pH sobre la carga superficial microbiana. Muchos microbios poseen un carácter dipolar, el cual puede actuar como catión o anión dependiendo del pH de la solución (Cohen, 2001). Por ejemplo, una elevación del pH de 3 a 7.5 resultó en un incremento de la carga celular de -10 a -30 Mv, y la tendencia opuesta, una disminución en la carga celular, se consiguió mediante una disminución del pH (Kolot, 1988).

Es razonable que a valores bajos de pH la carga negativa de la superficie microbiana se reduce, lo que conduce a una reducción en la repulsión electrostática entre los microorganismos y el material soporte, cargado negativamente. Esta reducción en la repulsión electrostática podría ser la causa de la mayor adhesión microbiana a valores bajos de pH.

Contenido en sales.

Meadows (1971) anunció que era capaz de separar células microbianas de la arena mediante un lavado con agua destilada, pero cuando había sal en el agua, el lavado microbiano disminuyó considerablemente. La explicación para esta mayor adhesión de los microorganismos en presencia de sales se encuentra también en la influencia de estas sales sobre la carga superficial microbiana. Kolot (1988) demostró que un incremento en la concentración de iones Ca de 0.01% a 1% dividió por 8 la carga en la superficie de las células microbianas. Puestas en agua destilada, la carga negativa de la superficie de las células microbianas se multiplicó por 5 (de -7.9 a -39 mV). En algunos casos donde los microorganismos y el material soporte estaban negativamente cargados, los iones divalentes cargados positivamente reducían la repulsión electrostática entre los microorganismos y el material soporte e incluso podían actuar como puentes entre esas dos superficies cargadas negativamente (Tampion and Tampion, 1987).

Según DiCosmo *et al.*, (1994), en células de *C. roseus* el máximo nivel de adhesión ocurría en presencia de AlCl_3 0.1 M. La adhesión disminuía, sin embargo, cuando la concentración era mayor o menor que 0.1M. Para Cohen (2001), la explicación para esta adhesión máxima con un contenido específico de sal de 0.1M de AlCl_3 se encuentra probablemente en conseguir una carga superficial óptima para la adhesión. En una solución de AlCl_3 0.1 M, la movilidad electroforética de las células microbianas era cercana a 0. En ese punto la repulsión electrostática entre las células microbianas y el material soporte era relativamente baja, lo que resultaba en un incremento de la adhesión. Con concentraciones superiores de AlCl_3 por encima de 0.1M la adsorción disminuyó porque la adsorción de los iones al los microorganismos y el material soporte resultó en una inversión de la carga del signo negativo al positivo. Esta inversión de la carga probablemente desembocó en una repulsión electrostática entre los microorganismos cargados positivamente y el material soporte positivo. Se asume que para cada especie microbiana y tipo de material soporte, existe un contenido óptimo de sales del fluido tratado, que puede potenciar la adhesión microbiana (Cohen, 2001).

De igual manera, las características del material soporte también va a influir en la adhesión de los microorganismos, de manera que la selección del material dependerá de

muchos factores tales como: la resistencia a la degradación microbiana, características físico-químicas y de superficie, coste del material, etc. Más detalladamente se describe a continuación algunas características de los materiales soportes:

Material soporte de origen orgánico.

Es ampliamente aceptado que los materiales orgánicos tienen una mayor adsorbancia que los materiales inorgánicos, la adsorción microbiana es de 248 y 2 mg/g sobre astillas de madera y material silíceo, respectivamente (Gemeiner *et al.*, 1994). Según Cohen (2001) la razón de la mayor adsorción de los materiales orgánicos en comparación con los materiales inorgánicos radica en la cantidad y variedad de grupos reactivos, tales como carboxil, amino, hidroxil, etc., localizados en la superficie del material orgánico. Además que el material orgánico usualmente contiene nutrientes, los cuales ayudan a la fijación y crecimiento de los microorganismos. Su contrapartida es que es un material más biodegradable, lo que implicaría la necesidad de ser reemplazado con más frecuencia que otros materiales no biodegradables.

Material soporte de origen inorgánico:

El material soporte inorgánico es considerado usualmente que debe ser más resistente al ataque microbiano, exhibir propiedades superiores de termoestabilidad y tener mejores propiedades al paso de flujos líquidos (Gemeiner *et al.*, 1994).

Normalmente el material inorgánico consta de una variedad de óxidos metálicos. Esto hace que la fijación de los microorganismos ocurra en condiciones acuosas, de manera que se forman hidróxidos de metal sobre la superficie del material inorgánico en lugar de óxidos de metal (Kolot, 1988). Como resultado se forma enlaces covalentes parciales entre los microorganismos y esos hidróxidos.

Muchos de los materiales inorgánicos, tales como pétreos o cerámicos, están cargados negativamente. La alta acumulación de cargas negativas en la biomasa de los microorganismos y las cargas negativas del material inorgánico sugieren la existencia de fuerzas que vencen la repulsión electrostática entre ambos. Una explicación según Cohen (2001), indica que debe ser la formación de enlaces covalentes parciales formados entre

los hidróxidos metálicos en la superficie del material y la superficie microbiana lo que posibilita la fijación entre ambos. Rouxhet y Mozes (1990) sugieren que la fijación de los microorganismos a materiales cargados negativamente se puede facilitar a través de tratamientos previos del material soporte modificando las propiedades superficiales del mismo, bien haciendo disminuir la repulsión o bien incrementando su atracción.

Kolot (1988) indica que existe una propiedad en los materiales inorgánicos que incrementa la capacidad de retención microbiana en dichos materiales que es la incorporación específica metálica interna del material inorgánico. La existencia de Fe^{3+} en el material soporte inorgánico incrementa la fijación entre células en al menos un 50% (Kolot, 1988).

Porosidad del material soporte.

El rango de porosidad del material soporte es un factor importante en la fijación microbiana al mismo. En conformidad a Tampion y Tampion (1987), la acumulación máxima de biomasa en el material soporte ocurre cuando el tamaño del poro es de una a cinco veces el tamaño bacteriano.

En materiales soporte sintéticos el rango de porosidad puede, hasta ciertos límites, ser controlado. Geminer *et al.*, (1994) consiguieron artificialmente para materiales cristalinos diámetros de poro en un rango de 20-2000 Å.

3.5.- PROCESOS BIOLÓGICOS DE NITRIFICACIÓN- DESNITRIFICACIÓN.

3.5.1.-Sistemas para aplicar el proceso de nitrificación- desnitrificación.

Comprendida la problemática del vertido de compuestos nitrogenados y fenólicos sobre el medio ambiente y la salud humana, y llegado a este punto, se ha de comenzar a examinar los sistemas biológicos de tratamiento para su descontaminación.

Para conseguir la eliminación de nitrógeno amoniacal u otras formas reducidas, se requiere la generación en el proceso biológico de microorganismos específicos dando

lugar a los procesos de Nitrificación (Larrea, 1998), los cuales transforman las anteriores formas nitrogenadas en nitratos; de manera que en orden a la eliminación de éstos surgieron los procesos de Desnitrificación, que combinados con la nitrificación dieron lugar a los procesos de Nitrificación-Desnitrificación.

Según Azevedo *et al.*, (1995), los tratamientos biológicos de nitrificación y desnitrificación son uno de los más factibles, efectivos y económicos para la eliminación del nitrógeno de aguas residuales tanto urbanas como industriales.

Como resumen, en la tabla 3.2 se muestran los consumos tanto de oxígeno como de alcalinidad en los procesos de nitrificación, desnitrificación y la combinación de ambas, nitrificación-desnitrificación (Henze *et al.*, 2002).

Tabla.3.2.- Consumo de oxígeno y alcalinidad por la nitrificación, desnitrificación y nitrificación-desnitrificación.

Proceso	Consumo de oxígeno			Consumo Alcalinidad	
	molO ₂ /molN	g O ₂ /g N	g O ₂ /g N*	Eqv. Alk/mol N	Eqv. Alk/mol N*
Nitrificación	2.0	4.57	4.3	2.0	1.9
Desnitrificación	-1.25	-2.86	-.24	-1.0	-.08
Nitrificación+desnitrificación	0.75	1.71	1.9	1.0	1.1

* Valores obtenidos en práctica en procesos de fangos activos. .

En este caso será el sistema a utilizar, y en relación con los compuestos fenólicos, se tratará de utilizarlos en la fase de desnitrificación como fuente de carbono, es decir, como donador de electrones (Peyton *et al.*, 2002), de manera que a la vez que se desnitrifica se consume y elimina estos compuestos. Son diversas las investigaciones (Holub *et al.*, 1999; Karim and Grupta, 2001; Aszczyk *et al.*, 2002) que estudian la degradación del fenol bajo condiciones de desnitrificación.

En función de cómo se dispongan los crecimientos de los microorganismos, la aplicación del proceso biológico de Nitrificación-Desnitrificación, se puede llevar a cabo

mediante sistemas con **cultivos en suspensión** o bien mediante **cultivos inmovilizados** o **biopelícula fija**.

Los primeros, supone poner en contacto los compuestos nitrogenados y fenólicos con los microorganismos responsables de su eliminación en un medio líquido, manteniendo a éstos en suspensión. Son los denominados fangos activos, donde para mantener las condiciones óptimas de eliminación de los compuestos contaminantes se hace necesario aportar microorganismos procedentes del clarificador o decantador secundario.

En estos sistemas, según *Andreadakis et al.*, (1997) la salinidad no inhibe el proceso de nitrificación cuando las concentraciones de cloruros son menores de 4 g/l. En cuanto al fenol, en sistemas con nitrificación-desnitrificación, a concentraciones de 20 mg/l (*Hunter et al.*, 1999) pueden inhibir las bacterias del genero *Nitrosomonas* (*Neufeld et al.*, 1980), aunque es posible una eliminación del fenol (*Blaszczyk et al.*, 1997)

Los segundos, se basan en una asociación biológica formada en una superficie o material soporte (figura 3.9), de manera que el agua que se quiere tratar se hace pasar a través de este material soporte que contiene la biopelícula, así los microorganismos van retirando del agua los contaminantes. A diferencia de los anteriores, estos sistemas no necesitan de un continuo aporte de microorganismos.

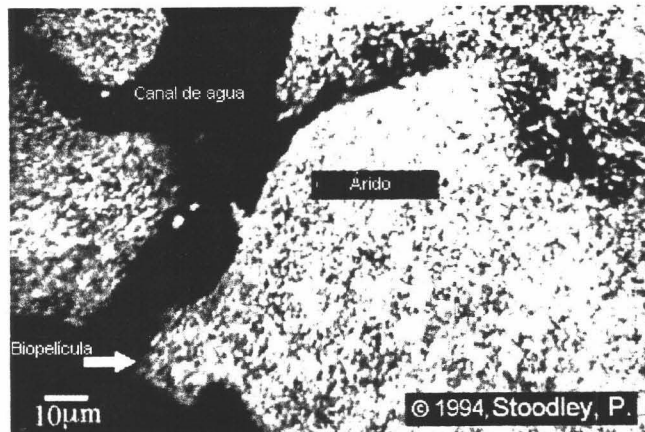


Figura 3.9.- Sistemas de canales de agua a través del árido y biopelícula fija al árido soporte.

Bettenworth et al., (1995) aplicaron el proceso de Nitrificación-Desnitrificación para eliminar nitrógeno de un efluente con alta concentración salina, mediante un sistema

de biopelícula fija donde la biopelícula se formó a partir de las cepas nitrificantes-desnitrificantes, presentes en el propio influente a tratar.

Ambos sistemas presentan una gran cantidad de variantes y como es lógico pensar, cada uno de ellos presentará una serie de ventajas e inconvenientes. Autores como Gras y Álvarez (1991) encontraron en los procesos de biopelícula fija numerosas ventajas con respecto a los sistemas en suspensión:

- ❖ Disminución en la producción de ruido.
- ❖ Reducción de olores.
- ❖ Menor superficie necesaria.
- ❖ Adaptación a la eliminación de sustancias biodegradables, presentes en bajas concentraciones.
- ❖ Reducción del tiempo de retención del agua en planta.
- ❖ Explotación fácil y segura.
- ❖ Mayor resistencia frente agentes tóxicos.
- ❖ Se pueden emplear residuos procedentes de la construcción, los cuales pueden actuar como soporte para el cultivo inmovilizado o biopelícula, contribuyendo de esta forma al reciclado de residuos.

Otras ventajas que se pueden destacar son:

- ❖ Son menos susceptibles a cargas variables o intermitentes.
- ❖ Menos sensibles a bajas temperaturas (Welander *et al.*, 1997).
- ❖ Permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento específico bajo (metanogénicas, nitrificantes).

De los procesos existentes de biopelícula fija, se puede destacar los procesos de filtros sumergidos, lechos fluidificados, lechos bacterianos, y biodiscos o biocilindros, pudiendo ser éstos una alternativa a los procesos fisicoquímicos dado su menor coste. Hay también que tener en cuenta, que estos sistemas de biopelícula, descienden el efecto tóxico que algunos componentes, presentes en el influente, pueden llegar a tener frente a

los microorganismos depuradores. Tienen mayor inercia, por lo que presentan mayores ventajas a los efectos de los inhibidores. Estas ventajas permiten aplicar los procesos de biopelícula a la depuración de efluentes industriales con alta salinidad.

Los procesos de lecho fluidificado son capaces de nitrificar y desnitrificar de forma estable en un medio en el que la concentración de cloruros sea de 20 g/l (Vredenburg *et al.*, 1997).

El uso de filtros sumergidos en efluentes salinos, puede incrementar las velocidades de crecimiento de los microorganismos, con respecto a los sistemas convencionales (Sheng *et al.*, 1998).

De todos estos sistemas (filtros sumergidos, lechos bacterianos, lecho fluidificados y biodiscos o biocilindros), los que mejores resultados han ofrecido en la eliminación de nutrientes son los filtros sumergidos además de ser los mas versátiles (Lacamp *et al.*, 1993) para este tipo de tratamiento; parecen tener un gran potencial para la eliminación de nitrógeno en un espacio limitado (Grady Jr. *et al.*, 1999).

3.6.- LECHOS INUNDADOS. FUNDAMENTOS.

La ciencia y arte de la ingeniería de las aguas residuales se extiende sólo ligeramente hasta hace poco más de 100 años. Durante este período, la tecnología aplicada ha conseguido grandes avances en promover el control de enfermedades y la protección medioambiental. Los tratamientos con biopelícula fija juegan incuestionablemente un papel importante en esta historia. Comenzando con opciones como los filtros percoladores, filtros intermitentes, filtros fluidificados y lechos de contacto; los sistemas de biopelículas dominaron la tecnología del tratamiento de las aguas residuales durante varias décadas. Y aunque este estatus ha sido asumido posteriormente por los procesos de biomasa en suspensión, existe en las últimas décadas un resurgimiento incuestionable del interés por las aplicaciones de la biomasa fija.

Dada la relativa importancia histórica, y la proyección de futuro de los sistemas de biopelícula fija, una revisión cronológica de los progresivos desarrollos asociados debe ser interesante e informativa a la vez. Alleman (2000) realiza una revisión histórica de la evolución de los sistemas de biopelícula fija y que a continuación se destaca los aspectos más relevantes de dicho trabajo.

Como se describe en el clásico cuento de Dickens en 1859, “era el mejor de los tiempos, era el peor de los tiempos...” Esta imagen literaria retrata de manera conmovedora la era de mediados del siglo diecinueve, dotada de las bendiciones de la Revolución Industrial, pero virtualmente desprotegida frente a enfermedades epidémicas desenfundadas.

La demostración del Dr. Alexander Mueller en 1865 de que el agua residual podía ser purificada por organismos vivos en una columna de filtración resultó una gran revelación (Pearse, 1938). El Dr. Mueller, un importante químico de Berlín, patentó posteriormente su proceso biológico algunos años después. De vanguardia incuestionable, aunque ni la patente ni el concepto fundamental atrajeron mucha atención.

En 1868, uno de los miembros de la Comisión Real Británica encargados en el estudio de problemas relativos a la disposición y tratamiento de las aguas residuales, Sir Edward Frankland, comenzó un estudio épico del funcionamiento de la filtración de agua residual bruta de Londres en columnas de laboratorio rellenas con medios que variaban desde grava gruesa hasta lechos de turba. Usando un patrón de dosificación de dos veces al día, Sir Frankland mantuvo con éxito el funcionamiento de la filtración durante 4 meses (Buswell, 1928). Aunque la capacidad de tratamiento del filtro estaba únicamente demostrada en términos físico-químicos, el establecimiento del concepto de filtración intermitente había introducido la necesidad de descansos o períodos de aireación entre aplicaciones a las aguas residuales.

Hasta este momento, Europa había dominado los desarrollos en la tecnología del tratamiento de las aguas residuales. En los Estados Unidos, sin embargo, la

concienciación sobre el control de la contaminación llevó al establecimiento de la Estación Experimental Lawrence por el Consejo Estatal de Salud de Massachussets (Metcalf and Eddy, 1916). Su organización estaba controlada por Hiram F. Mills, un distinguido hidrólogo, y los profesores Sedwick y Drown del Instituto de Tecnología de Massachussets. Bajo la dirección de Allen Hazen, el grupo Lawrence comenzó una serie de experimentos de filtración en 1887 comparables a los ensayos previos realizados por Frankland sobre dosificación intermitente. Sus descubrimientos demostraron de verdad que los microorganismos que estaban en el medio filtrante podían degradar el agua residual en un ambiente aeróbico facilitado por la dosificación intermitente.

En Europa, sin embargo, los ingenieros sanitarios aún dudaban aceptar el concepto de filtración intermitente. En 1893, Stoddart (1911) anunció el uso de un filtro con medio grueso que recibía por percolación un flujo continuo. Stoddart insistió en que su trabajo surgió de los principios de Frankland y que sus unidades percoladoras eran las primeras de esa clase. En cualquier caso, el filtro percolador había sido concebido.

Otra clásica opción europea desarrollada casi al mismo tiempo fueron los lechos de contacto. Actuando según la línea de los experimentos de Lawrence, W. Santo Crimp y W. J. Dibdin decidieron en 1891 experimentar con un patrón de dosificación que fluía a través de un lecho de filtración de un medio grueso durante 8 horas, seguido de un estado de secado de 16 horas (Metcalf and Eddy, 1916). De los medios gruesos probados en el agua residual tratada químicamente de Londres, Dibdin encontró que las briznas de coque aportaban un tratamiento satisfactorio, mientras que la arena se colmataba mucho. En tests posteriores, Dibdin probó un doble contacto, usando lechos primarios y secundarios respectivamente conteniendo medios más pequeños sucesivamente (Metcalf and Eddy, 1916). El éxito de esta operación supuso rápidamente la aparición de varias instalaciones a escala real, y todas ellas mantenían los ciclos de llenado, reactor y de secado. Y en su quinto informe (Thompson, 1909), la Comisión Real aportó un extenso soporte técnico para la instalación y operación de dichos lechos de contacto.

En cuanto al diseño de los lechos de contacto, hay registrados varias aplicaciones a escala natural (Metcalf and Eddy, 1916). Aunque en Estados Unidos se construyeron

unas cuantas unidades a gran escala, los lechos de contacto no recibieron demasiado interés fuera de Europa; debido a la inundación del filtro, las condiciones anaeróbicas que tendía a reducir la calidad del efluente (Hurley, 1943). Esta circunstancia combinada con frecuentes colmataciones del medio del lecho por el lodo arrastrado (Hurley, 1943), comenzaron a arrojar dudas sobre la utilidad del tratamiento mediante lechos de contacto.

Reconociendo la conveniencia de una biopelícula aerobia, Dibdin decidió en 1904 experimentar con lechos de aireación forzada (Keefer, 1940).

Los alumnos del Dr. Fowler, Edward Ardern y William Lockett comenzaron el estudio histórico del tratamiento de biomasa suspendida. En 1914, estos dos estudiantes publicaron el primer registro sobre un proceso de fangos activos, adheridos al patrón de intermitencia aceptado, pero cambiando a una biomasa suspendida (Ardern and Lockett, 1914).

Durante los siguientes 25 años, la filtración intermitente y los lechos de contacto fueron desechados en favor del diseño de los filtros percoladores. En los EE.UU., se hizo un gran esfuerzo para mejorar y actualizar el funcionamiento de los filtros percoladores, incluyendo el desarrollo y la adopción de estándares técnicos para el diseño de las cargas hidráulicas, construcción de los lechos y la operación de los sistemas (Hardenberg, 1936).

Gran parte de la popularidad de estas unidades de filtros percoladores podía deberse a su relativa simplicidad, facilidad de operación y buena relación coste-beneficio en cuanto a la capacidad de funcionamiento. Los fangos activos eran todavía un procedimiento innovador, y que levantaba bastante interés debido a su demanda de energía para la aireación (Ardern, 1917). Además, el proceso de fangos activos estuvo plagado de problemas legales, con demandas impuestas contra varias grandes ciudades por infringir patentes por Activated Sludge, Ltd (Anonymous, 1934). Con la solución de dichos problemas, el tratamiento con fangos activos comenzó a desplazar a los sistemas basados en biopelícula fija, de tal manera, que se convirtió en el sistema principal para el tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Existían, sin embargo, varios desarrollos tangenciales en el campo de la tecnología de película fija que merecen algunas consideraciones. La aplicación de una de esas opciones, el proceso Hays, una variación del lecho de contacto, realmente rivalizaba con la instalación de los filtro percoladores durante el período de 1930 a 1940 (Griffith, 1943). Desarrollado en 1930 por Clifford Hays, un químico de la Waco, Texas, este procedimiento empleaba grandes láminas de asbestos de hormigón apiladas verticalmente espaciadas 1 o 2 pulgadas entre sí. Por 1942, había 63 unidades como ésta en funcionamiento en los EE.UU, muchas de las cuales estaban localizadas en instalaciones militares (Kessler and Norgaard, 1942). Sin embargo, la limitada disponibilidad de láminas acanaladas de asbestos de hormigón durante tiempos de guerra hizo necesario el uso de láminas planas (Otts, 1982). La ausencia de rigidez superficial hizo que estas láminas se torcieran y derrumbaran frecuentemente, resultando en fallos del proceso los cuales condenaron una posible consideración del mismo en el futuro.

En los 50 se sucedieron desarrollos significativos con la incorporación del medio soporte basado en plástico en varios sistemas de tratamiento de película fija. Estas formas sintéticas ofrecían numerosas ventajas frente a los materiales naturales disponibles en términos de área superficial de contacto, resistencia a roturas, densidad de empaquetamiento, y flexibilidad en la construcción.

Investigación y desarrollo en medios plásticos siguieron dos líneas distintas durante los primeros años 50. En América, se proponían y experimentaban unidades atadas de plástico como empaquetamientos innovadores para aplicaciones en filtros fijos (Bryan, 1955). Investigadores de Europa, sin embargo, comenzaron probando discos de plástico rotativos.

Al principio de los años 80 apareció un proceso de lecho sumergido de flujo descendente comercializado por Cyttox incorporando una fila paralela de láminas de plástico colocadas verticalmente. El reciclaje continuo del fluido dentro del tejido es dirigido hacia una paleta de agitación sobre el tanque lo que provoca el transporte de oxígeno. Aparte de este último sistema de aireación, el sistema Cyttox bien podría ser considerado como un proceso Hays resucitado.



El interés suscitado por este tipo lechos inundados, desde inicios del siglo XIX, como se ha reflejado en las referencias encontradas en el trabajo realizado por Alleman (2000), permanece en la actualidad, encontrando modificaciones y referencias que así lo atestiguan; como las experiencias registradas en Francia por la Compañía General de Aguas (Cabe destacar la Estación Depuradora de Mónaco; 1990, con la patente Biocarbono) y Lionesa de Aguas o las de Canadá a raíz de las exigencias establecidas en su normativa de 1993. Interés favorecido por la necesidad de buscar alternativas a los fangos activos debido a los diversos problemas que aparecen en la explotación de estos: flotabilidad de fangos, menor resistencia frente agentes tóxicos, etc.

Los estudios de la multinacional francesa O.T.V. (Grupo Compañía General de Aguas) concluyeron en el patentado, entre otros, de dos modelos de filtro biológico para depuración de aguas residuales: Biostyr® y Biocarbhone®. El Biocarbhone® (figura 3.10) utiliza un material pizarroso granular, con un tamaño de 2.5-3 mm, con una superficie específica de $1.450 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y una porosidad de 0.40. El proceso Biocarbhone®, que se comercializa como el Filtro Airedor Biológico (BAF) en Norteamérica, utiliza flujos en contracorriente de agua residual y aire. El agua residual primeramente tratada se aplica en flujo descendente. El aire se rocía a dos tercios de profundidad. El flujo de enjuague se hace ascender arrastrado por aire. Las cargas de superficie para Biocarbhone® sólo son ligeramente superiores a las de los filtros percoladores, aunque la carga volumétrica es aproximadamente 10 veces mayor, debido a la mayor área específica del medio.

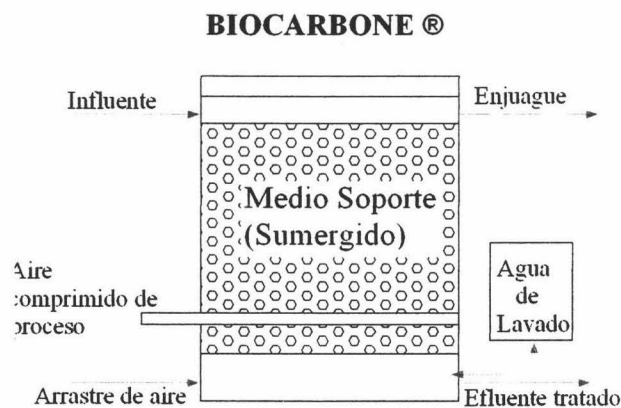


Figura 3.10.- Esquema simplificado de la configuración de la patente Biocarbhone

El Biostyr® es un lecho poroso de flujo ascendente con un material soporte de discos de poliestireno, que son ligeramente menos pesados que el agua y flotan. Están retenidos en el reactor por una pantalla, y poseen un tamaño de 3.0-3.5 mm, y 1.050 m²/m³ de superficie específica y una porosidad de 0.39. El material de poliestireno se comercializa con el nombre de Biostyrene.

Las investigaciones llevadas a cabo por la empresa Degremont (Grupo Lionesa de Aguas), en 1994, se consumó en una patente denominada Biofor®, que es un filtro totalmente sumergido con inyección de aire en el lecho (Figura 3.11). Las cargas de superficie y volumétricas son parecidas. Biofor® difiere en que el agua residual y la corriente de agua son concurrentes. La configuración de concurrencia se dice que da un rendimiento de transferencia de oxígeno superior, dado que el oxígeno se suministra en el lugar de máxima concentración de DQO, dando menos problemas de obstrucción del medio. Esta patente rellena sus filtros con un medio que recibe el nombre de *Biolite*® y está compuesto de un material arcilloso, con una densidad superior a la unidad, con una talla efectiva de 3.0-6.0 mm. (Cabe destacar la construcción en España de la primera planta depuradora con esta patente, la del Puerto de Santamaría por esta empresa).

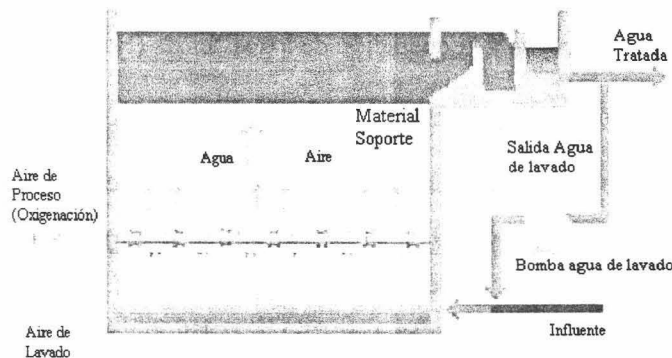


Figura 3.11.- Esquema de uno de los sistemas de filtros sumergidos, Biofor® (Degremont, Francia)

Actualmente en España, el sistema de lechos inundados se está utilizando fundamentalmente en el campo de las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas: Puerto de Santa María, Ibiza, Santa Cruz de Tenerife y Benalmadena (Málaga, en la actualidad en construcción). El Departamento de Ingeniería Civil y más concretamente su Área de Tecnologías del Medio Ambiente perteneciente a E.T.S. de

Caminos, Canales y Puertos de la Universidad de Granada en el año 1990 comienza una ardua labor en la investigación de utilización de los lechos inundados para el tratamiento de distintas aguas. Desde entonces, y ya perteneciendo al Grupo de Investigación Microbiología y Técnicas Ambientales (MITA) y al Instituto del Agua de la Universidad de Granada se han realizado varias tesis profundizando en el conocimiento de los lechos inundados: “Estudio comparativo de rellenos en sistemas de depuración de lechos inundados” Zamorano (1996), “Optimización de los lechos inundados con soporte de residuos reciclados” Osorio (1998), “Eliminación biológica de NO_3^- de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos: Optimización del sistema” Gómez (1998), “Eliminación de la materia orgánica y del nitrógeno en el agua residual urbana mediante lechos inundados” Gálvez (2001) y “Mejora de los parámetros de diseño de filtros sumergidos aplicados a la desnitrificación de aguas subterráneas mediante la inoculación selectiva” Moreno (2001).

Nandy y Kaul (2001), afirman que dentro del amplio rango de sistemas de tratamiento para aguas residuales con un poder alto de contaminación, los filtros sumergidos han emergido como una aplicación con mucho éxito y un tratamiento alternativo muy viable, debido a su gran concentración de biomasa, adhesión y a los problemas mínimos de flotabilidad de fangos (Tritt, 1992).

Los filtros sumergidos con respecto a los procesos convencionales de fangos activos principalmente, poseen las siguientes ventajas adicionales (Pujol *et al.*, 1994):

- ✓ No requieren decantación secundaria, lo que significa un coste menos de inversión y disminución en el espacio de ocupación.
- ✓ El reactor biológico ocupa de 3 a 4 veces menos espacio en volumen que el de un fango activo.
- ✓ Son fáciles de cubrir, permitiendo el control de los efectos negativos de los olores y ruidos, además de minimizar el impacto visual.
- ✓ No existe flotabilidad de fangos y espumas.
- ✓ Permiten la construcción de montajes modulares sencillos y de fácil automatización.

- ✓ Operación estable en el tiempo.

Como sistema, consisten en un material de relleno que actúa como soporte de la biopelícula, material que está inmovilizado y completamente sumergido en el agua a tratar. De manera, que la biopelícula se encargará de la depuración, y el relleno puede actuar además como un filtro para sólidos de mayor tamaño.

La principal desventaja que presenta estos sistemas es la pérdida de carga hidráulica producida bien por el crecimiento progresivo de la biopelícula o por los sólidos retenidos. Esto, supone la necesidad de establecer ciclos de lavados del sistema. La estructuración y duración de los ciclos de lavado pueden variar, siendo las fases empleadas las siguientes (Gálvez, 2001):

- 1.- Fase de esponjamiento, utilizando para ello exclusivamente aire.
- 2.- Fase de lavado, con agua y aire.
- 3.- Fase de aclarado, usando solo agua.

El agua resultante de estos lavados que habrá arrastrado y recogido la biopelícula desprendida y otras partículas serán recirculadas hasta el tratamiento primario o decantación habilitada al efecto, para pasar el fango a su propia línea de tratamiento.

En la tabla 3.3 se recogen algunos de los materiales soporte para la fijación de biopelículas en sistemas de lechos sumergidos mas utilizados en la actualidad junto algunas características propias.

Tabla 3.3.- Característica de algunos materiales soporte utilizados en sistemas de lechos sumergidos.

MATERIAL	TAMAÑO (mm)	DENSIDAD (g/cm ³)	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECIFICA (m ² /m ³)	REFERENCIAS
Porcelana	4mm	1.9	0.48	700	Villaverde et al., 2000; Fdez, Polanco et al., 2000
Cerámica	1.7-6	1.5-1.8	0.49	700-1500	Bouwer et al., 2000
Anillos de polipropileno	1.3 cm diámetro		0.93	340	Oh, et al, 2001.
Gránulos de Polietileno	3.0-3.5mm			1050/1200	Borregaard, 1997; Punzava et al., 2001
Anillos de poliuretano				700	Jou and Huang, 2003.
Biolite (arcilla vitrificada)	3-4mm	1.5-1.8		1200-1500	Pujol et al., 1998; Richard and Thébault, 1992

Debido a las características fisiológicas de la microbiota desnitrificante y nitrificante, el proceso de biopelícula en filtros sumergidos se puede aplicar de dos modos diferentes principalmente:

Post-desnitrificación

El proceso de post-desnitrificación, básicamente, consiste en dos reactores en serie, uno aireado y el otro no. El agua entra en el primer reactor aireado (Nitrificación) para pasar al segundo reactor anóxico (Desnitrificación) (Figura 3.11). Se precisa una previa oxidación de la materia orgánica para que no interfiera en el proceso de la nitrificación (microorganismos autótrofos) y posteriormente se debe dosificar un fuente de carbono fácilmente asimilable que facilite la actividad desnitrificante (microorganismos heterótrofos). Estas fuentes de carbono fácilmente metabolizables, permiten su rápida utilización como donadores de electrones por las bacterias desnitrificantes y por otro lado permiten una selección de microorganismos desnitrificantes con alta actividad.

Se consiguen altos rendimientos de eliminación de nitrógeno, siendo el metanol la fuente de carbono más utilizada por su alto índice de desnitrificación, ser fácilmente biodegradable y tener bajo precio (Chudoba y Pujol., 1998); otros autores hablan del

ácido acético (Constantin and Fick, 1997), sacarosa y etanol (Gómez *et al.*, 2000a), metanol (Pujol *et al.*, 1994) y otras muchas fuentes.

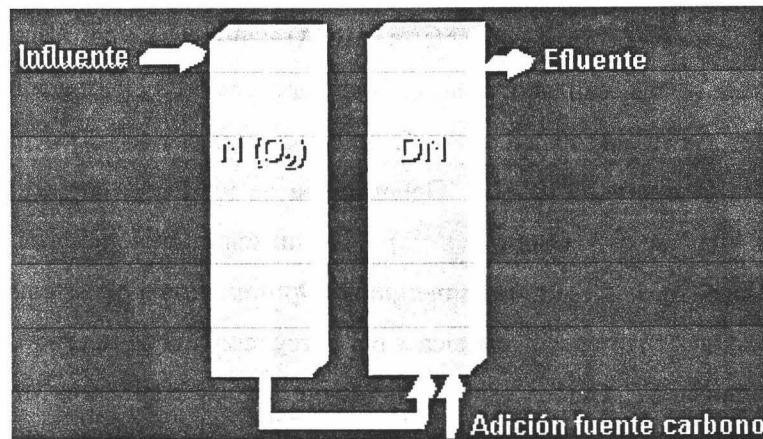


Figura 3.11.- Esquema Post-desnitrificación

Para influentes ricos en fuente de carbono sería un sistema poco rentable, pues se consumiría la fuente de carbono propia del influente en la columna óxica necesitándose después adicionarle una fuente externa a la columna anóxica donde se encontraría la microbiota desnitrificante en su mayoría heterótrofos, lo que implicaría un aumento en los costes de explotación. Son sistemas indicados para influentes pobres en donadores de electrones, que no es el caso del influente que se va a utilizar en este trabajo de investigación.

Pre-desnitrificación

En el proceso de pre-desnitrificación inicialmente se elimina la materia orgánica en un filtro anóxico y posteriormente se nitrifica en una segunda columna aireada. El efluente obtenido (el cual contendrá el nitrato procedente de la nitrificación) se recirculará al filtro anóxico donde en presencia de fuente de carbono proveniente del influente y nitrato, la microbiota desnitrificante presente en dicha columna transformará nitrato en nitrógeno molecular (Pujol *et al.*, 1995) que pasará a la atmósfera (Figura 3.12). Este sistema, por lo general, no precisa de la adición de fuente de carbono, es la propia contenida en el influente, siendo el esquema apropiado para el trabajo de investigación.

El control de la desnitrificación y consecuentemente del nivel de eliminación de nitrógeno depende del ratio de recirculaciones (relación entre lo que se vuelve al proceso o recircula y el flujo de entrada) del reactor nitrificante al reactor donde se produce la desnitrificación. Generalmente los valores usados varían del 100 al 600% (Bryers, 2000). Para Karschunke and Sieker (1997) la recirculación interna óptima para procesos de nitrificación-desnitrificación utilizando el sistema de pre-desnitrificación esta limitada a 400-500 %, ya que para estos mismos autores recirculaciones mayores introducen en la fase anóxica concentraciones elevadas de oxígeno que pueden inhibir la desnitrificación.

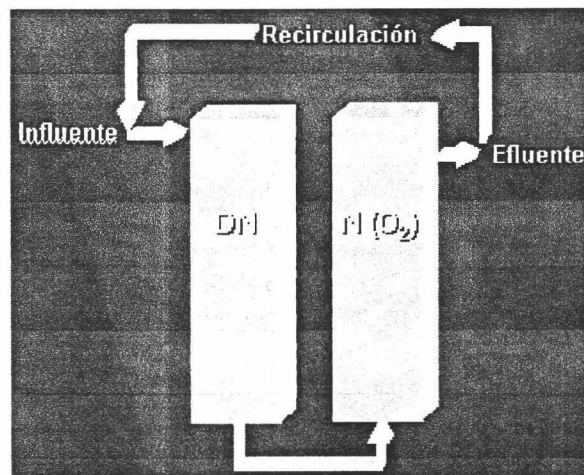


Figura 3.12.- esquema en Pre-desnitrificación.

El rendimiento total teórico del sistema para la eliminación de nitrógeno se puede obtener mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento Teórico}_{\text{Total}} = \% \text{ Recirculación} / (100 + \% \text{ Recirculación})$$

Son numerosos los estudios realizados en los últimos años utilizando los lechos sumergidos para el tratamiento del nitrógeno con procesos de nitrificación, desnitrificación, o ambos, a saber:

Chui *et al.*, (2001) emplea un sistema de dos filtro sumergidos: uno de los sistemas consta de dos filtros sumergidos conectados en serie y el segundo sistema se

compone de un filtro con una zona anaeróbica, anóxica y otra zona aeróbica incorporado en el mismo filtro. Sistema usado para el tratamiento de un agua sintética con una concentración en nitrógeno de 480 mg/l, consiguiéndose para ambos sistemas rendimientos de eliminación de aproximadamente el 90 % de nitrógeno y el 98 % de DQO.

Oh *et al.*, (2001) investiga la influencia de los parámetros mas importantes que afectan a la desnitrificación bajo condiciones de alta concentración de nitratos de un agua sintética utilizando para ello el sistema de filtros sumergidos con un material plástico como soporte de la biopelícula. La investigación concluye que la desnitrificación es completa para cargas volúmicas entorno a 9 Kg $\text{NO}_3^- \text{-N/m}^3$ día decreciendo significativamente los ratios de desnitrificación para cargas volúmicas superiores a 24 Kg $\text{NO}_3^- \text{-N/m}^3$ día.

Villaverde *et al.*, (2000) y Fdz-Polanco *et al.*, (2000) ambos pertenecientes al mismo grupo de investigación, emplean los lechos sumergidos para el tratamiento, también de aguas sintéticas de nitrógeno utilizando como material soporte para la biopelícula partículas de porcelana con un tamaño alrededor de los 4 mm. Fdz-Polanco *et al.*, (2000) en su estudio describen, entre otros, los cambios de la actividad de oxidación del amonio por parte de la microbiota nitrificante en función de la relación C/N, concluyendo que la actividad nitrificación no pierde eficiencia cuando el efluente presenta una concentración inferior de 200 mg O_2/l de DQO que equivale en este estudio a una relación de DQO/NH_4^+ de 4.

También son numerosos los estudios que se han realizado utilizando los sistemas de filtros sumergidos BIOSTYR®. Punzaba *et al.* (2001) utilizó este sistema para estudiar el efecto de la aireación en un proceso simultaneo de nitrificación y desnitrificación controlado en tiempo real. Estos autores señalan que la desnitrificación se lleva a cabo en la mayor parte de la biopelícula cuando la concentración de oxígeno disuelto del influente se encuentra por debajo de 3 mg/l pues según demuestran estos mismos autores la penetración de oxígeno disuelto en la biopelícula con los valores indicados no es significativa como para afectar a la microbiota responsable de la desnitrificación que

compone la biopelícula. Sorensen *et al.* (2000) emplea el mismo sistema de lecho sumergido para la eliminación de nitrógeno en post-desnitrificación y pre-desnitrificación con 50-225 % y 600-800 % de recirculación interna respectivamente.

Como se ha podido ver son bastantes lugares del mundo (hacia 1992 operaban en el mundo alrededor de cincuenta plantas en países como Canadá, Estados Unidos, Japón y varios en Europa coincidiendo fundamentalmente en Francia) los que aplican el sistema de Filtros Sumergidos o Lechos Biológicos Inundados, pero a pesar de ello, la investigación sigue siendo necesaria, ya que el dimensionamiento de éstos se basa prácticamente en conceptos empíricos y pruebas a escala de planta piloto diferentes escalas.

Objetivos

4.- OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO PRINCIPAL.

Los mares y el medio ambiente litoral europeo constituyen un importante recurso económico y son áreas naturales de alto interés ecológico, que en los últimos años han recibido altas concentraciones de nitrógeno de fuentes antropogénicas como aplicación de fertilizantes o vertidos de aguas residuales de diversos orígenes. Esta contaminación es causante de cambios en el ecosistema que afecta a todas sus comunidades bióticas, teniendo como consecuencia final la eutrofización, que tanto directa como indirectamente afecta al ser humano (Wu, 1999).

Desde los años sesenta, la actual Unión Europea ha ido legislando para desarrollar toda una serie de reglas comunes de protección y prevención de la contaminación. Así, las calidades mínimas del agua se han ido definiendo en orden a limitar el impacto de la acumulación de emisiones contaminantes para así proteger al ser humano y al medio ambiente.

Más concretamente, el litoral es una de las piezas principales del territorio andaluz que más problemas y oportunidades genera en la actualidad, no solo para su desarrollo económico sino también por el estado del medio ambiente. Para proteger este recurso, la legislación andaluza, dentro del marco jurídico español y europeo, establece como límites medios diarios para el vertido de amonio, nitrato y fenol sobre el litoral marino, 80, 100 y 15 mg/l respectivamente, implicando de esta manera la necesidad y el deber de tratar los distintos efluentes que viertan a dicho medio.

Con respecto a los compuestos nitrogenados, éstos pueden ser eliminados por procesos físico-químicos aunque con un elevado coste económico, mientras que los tratamientos biológicos se presentan como una alternativa viable tanto económica como técnicamente. En este sentido la nitrificación y desnitrificación son unos de los tratamientos biológicos más efectivos y económicos para eliminar nitrógeno de efluentes residuales de origen urbano e industrial (Azevedo *et al.*, 1995). La nitrificación es una

oxidación autotrófica del ión amonio a nitrito (fase I) y nitrato (fase II), mientras que la desnitrificación consistirá en una reducción desasimilatoria de nitrato y nitrito a nitrógeno molecular.

Hay efluentes industriales, como ocurre en esta investigación, que además de compuestos nitrogenados muestran presencia de compuestos fenólicos, y todo ello en medio salino. Son compuestos extremadamente tóxicos en ecosistemas acuáticos en concentraciones de mg/l incluso a concentraciones de $\mu\text{g/l}$ que influyen en las propiedades organoeléctricas de las aguas con vida piscícola o marisco (Buttino and Filippi, 1991). La eliminación de estos elementos se han llevado principalmente por procesos fisico-químicos con bastante precisión al problema, pero suponen un elevado grado de tecnología, altos costes de instalación y mantenimiento, y presencia de personal especializado. La degradación biológica de estos compuestos, ha sido descrita utilizando distintos procesos y entre estos bajo condiciones de desnitrificación, donde este compuesto es utilizado por los microorganismos como única fuente de carbono (Tschech and Fuchs, 1987; Blaszyk *et al.*, 1998).

Con relación al medio en que se encuentra los contaminantes, salino, ha mostrado afectar negativamente a los procesos biológicos destinados a la eliminación de materia orgánica y nitrógeno (Pansward *et al.*, 1999). Aunque sin embargo otros autores (Glass and Silverstein, 1999) han puesto de manifiesto la posibilidad de tratar efluentes con alta salinidad mediante procesos biológicos, precisando de periodos previos de aclimatación de la biomasa a la alta concentración salina.

De entre los sistemas biológicos, los lechos sumergidos parecen tener un gran potencial para la eliminación de altas concentraciones de nitrógeno en un espacio reducido además son considerados como un tratamiento muy flexible y económico para aplicaciones prácticas (Grady *et al.*, 1999).

Teniendo todo esto en cuenta, el objetivo principal que se planteó en este trabajo es **la aplicación de la tecnología de los sistemas de lechos inundados en el tratamiento de eliminación de compuestos nitrogenados y fenólicos procedentes de un efluente salino industrial.**

4.2- OBJETIVOS SECUNDARIOS.

Para ello, y con el objetivo inicial marcado se establecieron una serie de objetivos secundarios:

1. El diseño y puesta en marcha de una planta experimental a escala de laboratorio que permita profundizar en el conocimiento de los lechos sumergidos y su posible aplicación a efluentes salinos con alta carga en compuestos nitrogenados y fenólicos.
2. Aplicar del proceso de pre-desnitrificación y determinar la influencia que ejercen las distintas variables como: carga hidráulica, recirculación interna, carga orgánica, volúmica, oxígeno disuelto, en la eliminación de compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino.
3. Determinar la influencia del material soporte sobre el pH del medio líquido en el proceso de nitrificación-desnitrificación mediante lechos sumergidos para el tratamiento en la eliminación de compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino.

Con los objetivos marcados y siguiendo las metas iniciadas hace poco más de una década por el Área de Tecnologías del Medio Ambiente y el grupo de investigación MITA en el conocimiento de los procesos de lechos sumergidos en el tratamiento de diferentes efluentes, y utilizando los conocimientos precedentes, se planteó esta Tesis Doctoral con el Título:

“APLICABILIDAD DE LOS LECHOS INUNDADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES CON ALTA CARGA EN COMPUESTOS NITROGENADOS Y FENÓLICOS EN MEDIO SALINO.”

Variables y Parámetros

5.- VARIABLES Y PARÁMETROS.

5.1.- VARIABLES PREVIAS

En todo estudio o investigación sobre cualquier proceso de depuración, aparecen multitud de factores que influyen en mayor o en menor medida en el fenómeno estudiado. Es por ello, por lo que se hace necesario determinar cuales son los que manifiestan mayor influencia, y simplificar el modelo de forma que sea dominable y se pueda conocer como inciden en el sistema.

Se entiende por variable aquella magnitud, por tanto cuantificable, de influencia directa en el proceso estudiado y cuya causa de variación es ajena al sistema dependiendo de solo hechos externos y sin influirse por el propio encadenamiento del sistema físico posterior. Teniendo esto en cuenta se van ha considerar las siguientes variables:

❖ **Carga Hidráulica (m^3/m^2 día).**

Se define como el caudal de agua que atraviesa una unidad de superficie del sistema de tratamiento. Va a condicionar la velocidad de paso del agua a través del material que compone el filtro.

❖ **Recirculación (%).**

Es el tanto por ciento de efluente que se devuelve al sistema en relación al caudal de influente. De este va a depender el tiempo de contacto que el agua va a estar en el interior del sistema y la carga hidráulica real.

La recirculación resulta imprescindible para el proceso de eliminación de nitrógeno mediante pre-desnitrificación pues aporta a la fase anóxica las formas nitrogenadas oxidadas. Por otro lado desarrolla una serie de funciones que se pueden resumir en:

- Condiciona el rendimiento máximo del sistema al aportar el nitrógeno (nitrito, nitrato), que se va a eliminar por vía desnitrificación.
- Realiza un efecto de dilución del influente, provocando una amortiguación de cargas contaminantes del sistema, en especial frente al fenol en esta investigación.

❖ **Carga Orgánica Volúmica (Kg/m^3 día).**

Es la concentración total de contaminante por unidad de tiempo que aporta el influente sobre el volumen activo de reactor biológico. En este caso los contaminantes referidos serán el nitrógeno total, amonio, fenol y DQO.

❖ **Sistema de lavado.**

Un filtro sumergido obliga a disponer de un sistema de lavado. En el sistema de lavado concurren distintos factores, como son la duración y fases que componen cada ciclo de lavado, caudal de agua de lavado y caudal de aire. Todo ello, componen un sistema del cual va a depender no solo el rendimiento del sistema sino la duración del mismo por atascamientos debido al crecimiento de la biopelícula. Este tipo de estudios son más adecuados a una escala superior, sin embargo se hace preciso considerarla como una variable previa de manera que se pueda seleccionar el sistema de lavado óptimo sin interferencias en el estudio del resto de variables.

5.2.- PARÁMETROS PREVIOS.

Se va a definir parámetro como aquellas magnitudes que expresan el resultado del tratamiento en función de las variables y que deben considerarse para el conocimiento del proceso.

Los parámetros que se van a utilizar en el desarrollo del estudio son los siguientes:

❖ **Oxígeno disuelto.**

Como se describió en la introducción el oxígeno puede por un lado inhibir la actividad desnitrificante y por otro lado es imprescindible para que tenga lugar la nitrificación, lo que se hace necesario su medida y control. Es también importante como valor

❖ **pH.**

Tanto la nitrificación como la desnitrificación son procesos biológicos que se ven afectados por este parámetro. Igualmente el pH puede verse modificado por la actividad de ambos procesos biológicos.

❖ **Demanda Química de Oxígeno (DQO).**

Permite obtener una estimación de la materia orgánica presente en el agua y así mismo determina la fuente de carbono disponible para las bacterias desnitrificantes. Además la DQO se considera un parámetro limitante en los vertidos en las aguas litorales, de manera puede actuar como un factor importante en el funcionamiento del sistema.

Habiendo comprobado que la relación entre DBO_5 y DQO fue superior a 0.2, indicado biodegradabilidad del agua, y dado que son aguas residuales industriales solo se consideró la DQO. Además esta elección se debió a la rapidez analítica con la que se obtiene la DQO.

❖ **Nitrógeno Total. Nitrato. Nitrito. Amonio.**

Tanto la concentración de amonio como la de nitrato se encuentran recogidas en la normativa vigente como parámetros limitantes para vertido en aguas litorales. De igual forma estos compuestos pueden actuar como parámetros de control para conocer tanto el proceso de nitrificación como desnitrificación. Además el conocimiento de estos parámetros permite el seguimiento del estado de oxidación-reducción en que se encuentra el nitrógeno, hecho que facilita el análisis del funcionamiento del sistema así como comprobar el rendimiento global de la planta en la eliminación de uno de los compuestos contaminantes del efluente.

Con estos parámetros se podrá realizar un balance de materia permitiendo diferenciar entre el nitrógeno que es asimilado y transformado en biomasa y aquel que es eliminado mediante la desnitrificación.

❖ **Fenol.**

El fenol es una sustancia fijada de igual modo, marcándose un límite máximo de vertido en aguas litorales. Es por ello obvio que sea considerado como un parámetro de control. Su análisis y seguimiento es también de máxima importancia por su actividad antimicrobiana pudiendo afectar de una forma significativa a los procesos de nitrificación y desnitrificación.

❖ **Actividad desnitrificante de la biopelícula (mM N₂O/g relleno).**

Con este parámetro se va a conocer la capacidad potencial de la microbiota existente en la biopelícula de eliminar las formas oxidadas de nitrógeno del sistema. Expresa la cantidad de nitrógeno liberado del sistema en forma de óxido nítrico por gramos de relleno.

❖ **Turbidez y recuento de microorganismos.**

Ambos parámetros dan idea de la tasa de crecimiento de los microorganismos que van a participar en la formación de la biopelícula.

❖ **Cantidad de biopelícula adheridos al material soporte.**

Este parámetro asesora acerca de la formación de biopelícula sobre el material soporte, así como del mayor a menor espesor alcanzado por la biopelícula dentro del medio poroso filtrante.

Materiales y Métodos Analíticos

6.- MATERIAL Y MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1.-CARACTERÍSTICAS DEL EFLUENTE INDUSTRIAL.

El conocimiento previo de las características del agua residual industrial objeto de estudio tiene una gran importancia a la hora de seleccionar el tipo de tratamiento (Henze *et al.*, 1994). Tras una serie de analíticas se caracterizó el influente que se va a tratar en esta investigación, valores que están recogidos en la tabla 6.1:

Tabla 6.1.- Caracterización del efluente proporcionado por DSM Deretil y concentraciones del efluente tras ser diluido por agua de mar.

Parámetro	Concentración ^a del efluente de DSM-DERETIL S.A.
pH	2-3
Demanda Química de Oxígeno	70.000-92.000
Sólidos en Suspensión	7.000-10000
Nitrógeno Total como N	9.000-15.000
Amonio (NH ₄ ⁺)	5.000-13.000
Fenol	25.000-31.000

^a Valores expresados mg/l excepto pH.

Las formas nitrogenadas se encuentran en sus estados de oxidación más reducida (Amonio y nitrógeno orgánico) y la DQO es fundamentalmente debida a los compuestos fenólicos.

Como ya se vio en la introducción, el tratamiento biológico en el ámbito de inversión del proceso de eliminación de compuestos tanto nitrogenados como fenólicos requiere menor capital que los fisico-químicos, y desde el punto de vista de la explotación, el tratamiento biológico requiere en principio menos recursos tanto energéticos como de reactivos. Los procesos de biodegradación pueden ser una alternativa a los procesos fisico-químicos.

Ahora bien, con estas concentraciones, el agua residual industrial es de difícil tratamiento, más si éste se pretende que sea biológico. De manera que fue necesaria su

dilución para conseguir concentraciones adecuadas para su tratamiento biológico. Al ubicarse la planta en zona litoral, y como se indicaba en la introducción, el agua de mar es para DSM Deretil un recurso, que utiliza en sus distintos procesos, de manera que se utilizó el agua de mar para la dilución del agua residual industrial. Agua de mar procedente de la zona de vertido del agua residual industrial de DSM Deretil S.A.

El agua de mar para la dilución del influente, presenta una concentración de cloruros de 25 ± 3 g/l, y salinidad del 3.4 ± 0.2 %.

El efluente de DSM DERETIL S.A. fue recogido de un ecualizador (Figura 6.1) o depósito donde son recogidas todas las aguas residuales de los distintos procesos de producción de la empresa. En él, los efluentes son mezclados consiguiéndose de esta manera una homogeneización para su posterior tratamiento en la planta de fangos activos (Figura 6.2) ubicada en las propias instalaciones.

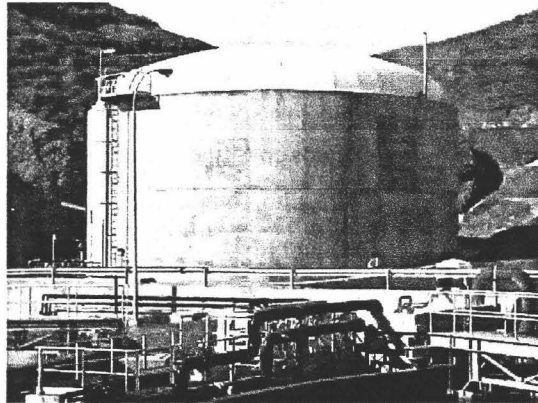


Figura 6.1.- Ecualizador de DSM Deretil S.A.

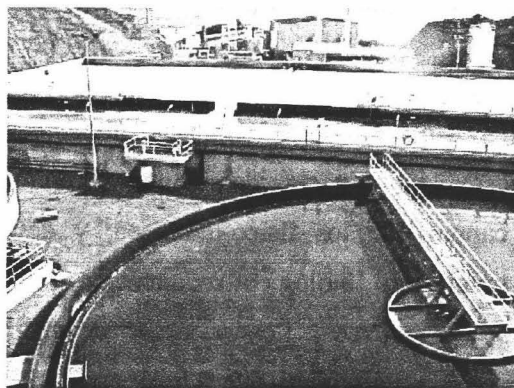


Figura 6.2.- Vista general de la planta de fangos activos de la empresa DSM DERETIL S.A. en Villaricos (Almería).

6.2.- MÉTODOS FÍSICO- QUÍMICOS

6.2.1.- Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O.). (Método Reflujo Cerrado, APHA, AWWA and WEF, 1992)

Se puede considerar como una forma de estimar la materia reductora presente en una muestra de agua, a través de la determinación por vía química de la cantidad de oxígeno necesario para oxidarla.

Mediante este método se oxida tanto la materia orgánica biodegradable como la que no lo es, sin posibilidad de diferenciar entre ellas. Con esta técnica se logra la oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos entre un 95 a un 100%. Junto con la materia orgánica, hay otra serie de compuestos de naturaleza inorgánica que también se pueden oxidar. Este es el caso de los nitritos o compuestos reducidos de hierro (Fe^{2+}), azufre (S^{2-}), manganeso (Mn^{2+}), etc.

Para la determinación de la DQO se empleó una oxidación con reflujo cerrado, realizando la valoración por espectrofotometría de visible (colorimetría) a una longitud de onda 600 nm.

El método se basa en una oxidación fuerte de la materia orgánica, empleando para ello un oxidante potente como el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en medio ácido fuerte (exceso de H_2SO_4). Este proceso de oxidación es aplicable a gran número de muestras siendo a su vez de fácil manipulación, así mismo el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ posee una gran capacidad oxidante. La ecuación química siguiente refleja el proceso de oxidación para la glucosa.



El proceso ha de realizarse en caliente (150°C) durante un tiempo de 2 horas. La reacción se ayuda con Ag^+ como catalizador, lo cual facilita la oxidación de compuestos alifáticos de cadena lineal. Para evitar pérdidas de Ag^+ por precipitación debida a los cloruros se debió añadir antes una cantidad adecuada de Hg^+ , y con muestras salinas

además se precipitaron previamente los cloruros con nitrato de plata, como ha sido en esta investigación. La valoración final se basa en la cantidad de Cr^{3+} que se produce tras la oxidación.

La oxidación se realizó en tubos de 12 ml de capacidad, contando estos con tapón a rosca para realizar la oxidación en recipiente cerrado. En la valoración se empleó un espectrofotómetro.

Para este tipo de valoraciones se precisó realizar una curva de calibración que compara los valores de absorbancia obtenidos a partir del Cr^{3+} formado con los valores de D.Q.O. para ello se empleó una sustancia oxidable por el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y que guardara una relación directa en valor de $\text{mg O}_2/\text{l}$. Para este caso se empleó Ftalato ácido de potasio (1mg FHP equivale a 1.176 $\text{mg O}_2/\text{l}$), preparando una solución madre con Ftalato ácido de potasio de 1000 $\text{mg O}_2/\text{l}$, llevando 0.8503 g de Ftalato hasta 1000 ml de agua bidestilada. Con esta solución se prepararon varias diluciones seriadas con 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 $\text{mg O}_2/\text{l}$, las cuales se oxidaron de igual forma que las muestras, obteniendo así la curva de calibrado. Los valores de DQO ($\text{mg O}_2/\text{l}$) se obtenían por interpolación en la recta de calibración o sustituyendo en la ecuación obtenida. La recta de calibración se obtuvo mediante regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, a partir de los datos de absorbancia medidos con las concentraciones conocidas (Statgraphics Plus for Windows Statical Graphies Corp.). No se aceptaron como recta de calibración aquellas que presentaran un coeficiente de regresión menor del 0,99.

En las determinaciones se utilizaron tubos de 10 ml, limpios y secos, a los que se les añadió 2.5 ml de la muestras, previamente preparadas ya que presentan una alta salinidad. Para ello, se precipitaron los cloruros con nitrato de plata, y se filtró con filtros de 0.22 μm . Una vez obtenidas las muestras, se les añadió 1.5 ml de la solución oxidante, y sobre éstos se añadió lentamente, dejando escurrir por la pared del tubo 3.5 ml de la solución ácida. Hecho esto, se cerraron los tubos y se agitaron invirtiéndolos para mezclar perfectamente los reactivos con la muestras. Seguidamente se calentaron durante 2 horas

a 150°C en un bloque térmico. Transcurrido este periodo de tiempo y tras esperrar el tiempo necesario para que las muestras estuvieran a la temperatura ambiente (20-25 °C) se procedió a la medida en el espectrofotómetro a la longitud de onda indicada. Se usó agua bidestilada en todos los casos como control al objeto de ajustar la lectura del espectrofotómetro a cero.

Preparación de los reactivos empleados:

✓ Solución oxidante ($K_2Cr_2O_7$ 0.0167 M):

Durante 2 horas se pone a secar en estufa (103°C) $Cr_2O_7K_2$. Una vez seco se añadía sobre 500 ml de agua destilada en agitación 40.913 g del reactivo hasta disolución. Se adicionó 33.33 g de $HgSO_4$ (cada ml debe contener 20 mg) y lentamente, por la pared del matraz aforado se añadieron 167 ml de H_2SO_4 (98%) dejando escurrir a través de ella. Finalmente se enrasó hasta 1000 ml con agua destilada.

✓ Solución ácida:

Sobre 500 ml de H_2SO_4 (98%) en agitación, se añadieron 10.1 g de Ag_2SO_4 hasta disolución. Se enrasó hasta 1000 ml con H_2SO_4 . El reactivo se dejó reposar al menos 24 horas (aquel reactivo que presentó turbidez se rechazó).

✓ Nitrato de plata 1.0 M:

Este reactivo se prepara añadiendo 16.9 g de nitrato de plata en 100 ml de agua destilada.

✓ Solución madre de FHP (1mg/ml):

Durante 1 hora el FHP se secó a 120°C. Una vez seco se añadió sobre 500 ml de agua destilada en agitación, 850.34 mg de FHP hasta disolución. Se enrasó hasta 1 litro con agua destilada.

Se realizaron tres replicas para cada muestra, determinando el valor medio y la desviación estándar. Cuando esta última fue alta se repitió el análisis de la muestra.

6.2.2.- Nitrógeno Total (APHA, AWWA and WEF, 1992)

La determinación de nitrógeno total pretende simplificar las determinaciones de NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- y $\text{N}_{\text{orgánico}}$ en una sola, para lo cual debemos transformar los diferentes compuestos de nitrógeno en uno solo. La forma más sencilla es mediante una oxidación que los transforme todos en nitrato, realizando una determinación final del NO_3^- -N. Esta oxidación es sencilla para el nitrito, el cual fácilmente se transforma en nitrato, sin embargo es más difícil dicha transformación en el caso del nitrógeno amoniacal y sobre todo en el caso del nitrógeno orgánico. Es por ello que esta determinación no es adecuada para muestras con alto contenido en nitrógeno orgánico, siendo necesario en este caso una dilución.

El proceso consiste en una determinación del nitrato de una muestra (método colorimétrico) tras una oxidación previa de la muestra con peroxodisulfato que oxida todas las formas de nitrógeno hasta nitrato.

Para determinar el Nitrógeno total por este método, se tomaron 50 ml de la muestra a analizar sin filtrar previamente introduciendo ésta en frasco de autoclavado de 100 ml. En nuestro caso diluimos, de modo que en el frasco no contenga más de 0.5 mg de nitrógeno orgánico. Se añade a continuación 7 ml de la solución oxidante y se agita. Pasamos a autoclavar la muestra durante 1 hora a 120 °C, dejando enfriar. Posteriormente se añadió 0.875 ml de ácido sulfúrico y a continuación se midió a una longitud de onda de 220 nm en el espectrofotómetro, obteniendo el dato de absorbancia.

Previamente a los análisis de las muestras problema se debe preparar una curva patrón, con una solución madre de nitrato, con la que se preparó una serie de patrones empleando matraces aforados de 100 ml, añadiendo la cantidad adecuada de patrón enrasando con agua destilada. Una vez preparados los patrones se les añadió todos aquellos reactivos que se han indicado en el párrafo anterior, procediendo a realizar la oxidación de igual manera.

Se preparó un blanco para ajustar el "0" del espectrofotómetro tanto para la curva patrón como en el proceso de determinación de las muestras. Luego, mediante interpolación en la curva patrón o sustitución en la regresión lineal obtuvimos el valor del Nitrógeno Total.

Los reactivos utilizados fueron:

- ✓ Reactivo oxidante de peroxodisulfato.
Se añadió Peroxodisulfato potásico 50g., ácido bórico 30 g, hidróxido sódico 14g llevándolo a enrasar a 1 litro de agua destilada.
- ✓ Ácido sulfúrico al 96 %.
- ✓ Solución patrón de nitrato (0.1 mg N/ml)
Se secó KNO_3 en horno de desecación a 105°C durante 24 horas. Sobre 500 ml de agua destilada en agitación se añadió 0.7218 gramos de nitrato potásico anhidro hasta disolución y se enrasó hasta 1000 ml. Se añadió también 2 ml de cloroformo (CHCl_3) como conservante. La solución es estable durante 6 meses

6.2.3.- Nitratos. (Método del Salicilato sódico, APHA, AWWA and WEF, 1992)

Este método es aplicable tanto para conocer la concentración de NO_3^- en el agua como para completar la determinación anterior de nitrógeno total. Para ello se empleó el método del salicilato sódico. Para este método, las muestras deben filtrarse inicialmente para evitar las interferencias por las partículas en suspensión, así como eliminar la turbidez. Igualmente se debe eliminar el hierro de la muestra si excede de 5 mg/l, el cloruro si está sobre 200 mg/l o los nitritos sobre 2 mg/l. El método es aplicable hasta concentraciones de 10 mg NO_3^- /l, siendo necesaria dilución para concentraciones mayores.

El método del salicilato sódico se fundamenta en la coloración (amarilla) manifestada por la reacción entre el nitrato y el salicilato, formando paranitrosalicilato siendo la intensidad de color directamente proporcional a la concentración. El color manifestado es estable durante al menos 1 hora.

Como método calorimétrico se preparó una solución madre a partir de la cual, prepararemos una serie de patrones, empleando para ello matraces aforados de 100 ml, sobre los cuales se añadieron la cantidad adecuada de patrón enrasando con agua destilada.

Una vez preparados los patrones se procedió a añadirles a todos ellos los reactivos, a excepción de la alcalinización con NaOH, realizando los mismos tratamientos. Una vez terminado el proceso se determinaba la absorbancia, realizando la curva patrón de forma análoga a la indicada para la DQO.

Para el desarrollo diario del método, se introducía una muestra de 10 ml previamente tratada según su interferencia o diluida según su concentración, en una cápsula de porcelana (100 ml). Alcalinizamos levemente empleando solución de NaOH 0.1 N, se añadía 1 ml de la solución de salicilato a cada una de las muestras, evaporándolas hasta sequedad en estufa de desecación a temperatura entre 75 y 80°C, evitando temperaturas superiores y tiempos excesivos. Una vez enfriadas hasta temperatura ambiente, se trataba el residuo seco con 2 ml de ácido sulfúrico 98%, procurando que quedara todo impregnado. Se esperaba 10 minutos para añadir a continuación con cuidado 15 ml de agua destilada y 15 ml de la solución de hidróxido y tartrato. Después de este proceso, se midió la absorbancia a 420 nm empleando cubetas de 1 cm² de sección. Se empleó un blanco para ajustar el cero del aparato.

Mediante sustitución en la ecuación de la recta obtenida se fueron obteniendo los datos de la concentración en nitratos de las muestras.

Para evitar las reacciones inespecíficas del nitrito cuando este presenta concentraciones superiores a 2 mg/l, se añadió 0.05 g de sulfamato de amonio.

Preparación de los reactivos utilizados:

- ✓ Solución de salicilato sódico (5%)
Sobre 50 ml de agua destilada en agitación se añadió hasta disolución 5 gramos de salicilato sódico y se enrasó a 100 ml. Esta solución debe prepararse nueva cada 24 horas.

- ✓ Solución de NaOH (0.1N).
A 500 ml de agua destilada en agitación, se añadieron 4 g de NaOH hasta su completa disolución. Con posterioridad se procedió al enrasado hasta 1000 ml con agua destilada.

- ✓ Solución de hidróxido sódico y de tartrato.
Sobre 700 ml de agua destilada en agitación se añadieron 400 g de NaOH y 60 gramos de tartrato doble de sodio y potasio, hasta disolución. Dejando enfriar al chorro de agua y se enrasó hasta 1000 ml. Este reactivo se guardó en frasco de polietileno.

- ✓ Solución patrón de nitrato (0.1 mg N/ml)
El KNO_3 se secó en horno de desecación a 105°C durante 24 horas. Sobre 500 ml de agua destilada en agitación se añadieron 0.7218 g de nitrato potásico anhidro hasta disolución y se enrasó hasta 1000 ml. Se adicionaron 2 ml de cloroformo (CHCl_3) como conservante. La solución es estable durante 6 meses

Al igual que en los casos anteriores se trabajó con tres replicas por muestra, repitiéndose el análisis si la desviación estándar era elevada.

6.2.4.- Nitritos. (Método de la Sulfanilamida, APHA, AWWA and WEF, 1992)

El método utilizado para la determinación del nitrito en las distintas muestras fue el método colorimétrico de la sulfanilamida, con el que se pudo llegar a determinaciones de hasta 0.2 mg de $\text{NO}_2\text{-N/l}$, diluyendo para muestras con mayores concentraciones.

Teniendo en cuenta la inestabilidad del nitrito, siendo fácilmente oxidado a nitrato por procesos tanto químicos como biológicos, su análisis se realizó inmediatamente después de la toma de muestra, no empleándose nunca la conservación por adición de ácidos.

Este método se basa en la reacción del nitrito con sulfanilamida en presencia de diclorhidrato de N-(1 naftil)-etilendiamina y en medio ácido fuerte, dando lugar a un compuesto de color púrpura rojizo cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de nitrito hasta aproximadamente 0.2 mg/l. El color desarrollado es estable durante al menos 2 horas.

Se realizó una curva patrón, a partir de la solución de NO_2^- preparada como se indica más adelante. Así se realizaron una serie de patrones, empleando para ello matraces aforados de 100 ml, añadiendo la cantidad adecuada de patrón enrasando con agua destilada. Una vez preparados los patrones, se procedió con ellos de igual forma que para las muestras, determinando igualmente la absorbancia a 543 nm.

El procedimiento seguido para determinar los nitritos fue el siguiente:

A partir 50 ml de muestra se añadió 2 ml del reactivo de sulfanilamida y agitando, se dejó 10 minutos en reposo, para pasar a continuación a medir la absorbancia a 543 nm en cubetas de 1 cm^2 de sección. Se utilizó un blanco para ajustar el 0 del espectrofotómetro.

Como en los casos anteriores donde se han utilizado curvas patrón, los valores de nitrito se calcularon sustituyendo en la ecuación de la recta o bien interpolando en la gráfica.

Al igual que en la determinación de los nitratos, se eliminaron las interferencias posibles, destacando la presencia de sólidos en suspensión y color. De la misma manera, se trabajó con tres replicas por muestra.

Para la preparación de los reactivos empleados se procedió del siguiente modo:

✓ Reactivo de sulfanilamida

Sobre 800 ml de agua destilada se añadieron 100 ml de ácido fosfórico (85%) y se disolvió completamente 10 g de sulfanilamida. Tras la completa dilución del anterior reactivo se disolvió 1 g de diclorhidrato de N-(1 naftil) etilendiamina y se enrasó hasta 1000 ml con agua destilada. El reactivo se conservó en frasco topacio y refrigerado a temperatura de 4°C.

✓ Patrón de nitrito (1mg/l).

El nitrito sódico se desecó en estufa de desecación durante al menos 1 hora a 105°C. Sobre 500 ml de agua destilada en agitación se añadieron 0.4928 g de nitrito sódico enrasando hasta 1000 ml con agua destilada. Se añadió 1 ml de CHCl_3 como conservante. De este modo se obtuvo una solución de 100 mg NO_2^- -N /l. Se pasó esta dilución hasta la centésima parte (1 ml sobre 99 ml de agua destilada) obteniendo una solución de 1mg/l. La dilución es poco estable y debe prepararse diariamente. A partir de esta dilución se realizaron los diferentes patrones para obtener la curva de calibración (0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/l).

6.2.5.- Amonio. (Método de la sal de fenol, APHA, AWWA and WEF, 1992)

El principio en el que se basa el método de la sal de fenol es la reacción del amoníaco, hipoclorito y fenol, catalizada por una sal manganosa formando un compuesto

azul intenso. El nitrógeno de amonio aparece en forma de ión amonio y parcialmente como amoniaco. Existe un equilibrio dependiente del pH entre las dos formas. En soluciones alcalinas fuertes el N-NH_4^+ esta presente casi enteramente en forma de amoniaco. Este reacciona con iones de hipoclorito para formar monocloramina, que reaccionan con un compuesto de fenol para formas azul indofenol. La determinación del N-NH_4^+ se realizó espectrofotométricamente a 630 nm..

Los reactivos utilizados fueron:

- ✓ Reactivo de ácido hipocloroso.
Se añadió 40ml de solución de NaClO al 5% preparada a partir de lejía comercial a 40ml de agua. El pH se ajustó entre 6.5-7 con HCl , preparándose este reactivo semanalmente.
- ✓ Solución de sulfato manganoso, 0.003M
Esta solución se preparó utilizando 50mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos en 100ml de agua destilada.
- ✓ Reactivo de sal de fenol
Para la preparación de este reactivo se disolvieron 2.5g de NaOH y 10 g de fenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, en 100ml de agua destilada. Debido a que se oscurece este reactivo tuvo que ser preparado semanalmente.
- ✓ Solución madre de amonio:
Para conseguir una solución madre de amonio se disolvieron 381.9mg de NH_4Cl anhidro, secado a 100°C , en 1000ml de agua destilada; obteniéndose una concentración de 100mg NH_4/l .

El procedimiento analítico seguido en la determinación de amonio, se puede resumir en:

Se añadió una gota (0.05ml) de solución de $MnSO_4$ a una muestra de efluente de 10ml en un vaso de 50ml, colocándolo sobre un agitador magnético y añadiendo 0.5ml de reactivo de ácido hipocloroso. Inmediatamente, se adiciona gota a gota, 0.6ml de reactivo de sal de fenato, sin intervalos, utilizando una bureta adecuada. La formación de color es completa a los 10 minutos y permanece estable durante 24 horas por lo menos. Aunque el color azul tiene un máximo de absorbancia a 630nm, se pueden hacer determinaciones en el rango de 600 a 660nm.

La concentración de amoníaco se calculó del siguiente modo:

$$\text{mg/l (NH}_3\text{-N)} = \frac{A \times B}{C \times S}$$

Siendo:

A= absorbancia de la muestra

B= NH_3 -N en el patrón, μg

C= absorbancia del patrón

S= volumen de muestra usado, ml

6.2.6.- Fenol. (Método colorimétrico, Derivado del tiazol)

Desde el punto de vista analítico, el termino fenol engloba este producto y sus homólogos. El fenol se emplea como patrón y el resultado obtenido corresponde a este y a sus derivados y otras sustancias acoplables.

El método seguido fue el de acoplamiento oxidante del fenol y derivados del fenol con un derivado del tiazol dando un azocolorante violeta rojizo que se determina fotométricamente a una longitud de onda de 475 nm.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

A 10 ml de muestra en tubos con rosca se añade una microcucharada del reactivo 1 propio del Kits, ya agitando vigorosamente hasta que el reactivo se disolviera. A continuación se añadió otra microcucharada del reactivo 2, también del propio Kits, y de igual manera se agitó hasta su disolución. Tras 3 minutos de reposo se pasaba a medir en el espectrofotómetro, obteniendo la absorbancia. Como método calorimétrico previamente como en los casos anteriores se realizó una curva patrón.

Como en los casos anteriores se trabajó con tres replicas por muestra, repitiéndose el análisis si la desviación estándar era elevada.

6.2.7.- Cloruros. (Método argentométrico, APHA, AWWA and WEF, 1992)

El cloruro, en forma de ión (Cl^-), es uno de los aniones inorgánicos principales en el agua natural y residual. Un contenido elevado de éste puede dañar desde las conducciones, estructuras metálicas hasta perjudicar el crecimiento biológico.

La determinación de este ión se basa en que en una solución neutra o ligeramente alcalina, el cromato potásico puede indicar el punto final de la titulación de cloruros con nitrato de plata. El viraje del indicador en la titulación se produce al formarse cromato de plata de color rojo.

Los reactivos utilizados fueron:

- ✓ Solución indicadora de cromato potásico:
Se disolvió 50g de cromato potásico en agua destilada. Se fue añadiendo una solución de nitrato de plata hasta que se formó un claro precipitado rojo. Se dejó reposar 12 horas, se filtro y diluyó en 1 litro de agua destilada.

- ✓ Titulante de nitrato de plata 1N:

Se disolvió 169 g de nitrato de plata en un litro de agua destilada. La equivalencia alcanzada fue de 1 ml = 35.5 mg de Cl⁻. Se conservó en frasco topacio a temperatura ambiente hasta su uso.

El procedimiento seguido fue:

Muestras de 100 ml de efluente o una porción adecuada diluida se a un pH entre 7 y 10, añadiendo a continuación 1 ml de la solución indicadora de cromato potasio. Con posterioridad se procedió a la titulación con nitrato de plata 1N.

El cálculo para obtener el resultado fue:

$$\text{mg Cl}^{-}/\text{l} = \frac{(A - B) \times 35.450}{\text{ml} \cdot \text{de} \cdot \text{muestra}}$$

Donde:

A= ml valoración para la muestra.

B= ml para el blanco con agua destilada.

6.2.8.- pH.

El principio básico de la determinación electrométrica del pH es la determinación de la actividad de los iones hidrógeno H⁺ por medición potenciométrica utilizando un electrodo patrón de hidrógeno y otro de referencia.

El pH de los sistemas acuosos se puede medir convenientemente con un pHmetro. En este caso el equipo empleado fue un pHmetro de la casa comercial Crison modelo GLP91.

Para su medida se procedió de la siguiente manera:

El calibrado del equipo se realizó diariamente de acuerdo con instrucciones del pH-metro con las soluciones tampón de pH 4.0 y pH 7.0. Una vez realizada la calibración, se introducía el electrodo en una alícuota de la muestra contenida en un vaso

de precipitado manteniéndose en agitación suave para asegurar su homogeneidad, con cuidado de no producir arrastre de dióxido de carbono. Se esperaba hasta una lectura estable anotando el resultado. Se aclaraba bien el electrodo con agua destilada entre muestra y muestra.

6.2.9.- Oxígeno disuelto (APHA, AWWA and WEF, 1992).

Los niveles de oxígeno disuelto en aguas naturales y residuales depende de la actividad física, química y bioquímica del sistema de aguas. El análisis de éste es prueba clave en la contaminación del agua y control del proceso de tratamiento, fundamentalmente si se basan en procesos biológicos.

El método utilizado fue el de Electrodo de Membrana, método adecuado para obtener el oxígeno disuelto de aguas contaminadas industrialmente.

El oxígeno disuelto de los sistemas acuosos se puede medir convenientemente con un oxímetro, en nuestro caso el equipo empleado fue de la casa comercial Crison modelo oxi 320.

El procedimiento seguido para obtener la medida de oxígeno disuelto fue el siguiente:

Se calibró el oxímetro según especificaciones propias de éste. Una vez realizada, la determinación se efectuó sumergiendo directamente el electrodo en el agua analizar. El resultado se expresa automáticamente en mgO_2/l .

6.2.10.- Aireación.

Para determinar el caudal de aire suministrado al sistema de lechos sumergidos se utilizó un Manoreductor de aguja DYNAVAL AIR con un rango de 0-15 l/min de caudal

de aire, que mide en continuo, bajo una presión de 2 Atm. Cada 24 horas se procedía a la revisión del manoreductor corrigiéndose en caso necesario.

6.2.11.- Temperatura.

La medida de la temperatura se efectuó diariamente mediante un termómetro de máximas y mínimas.

6.2.12.- Turbidez (Espectrofométrico de la formacina, APHA, AWWA and WEF, 1992)

La turbidez del agua está producida por la presencia de diferentes partículas en suspensión o de tipo coloidal como arcillas, lodo, herrumbre, materias orgánicas e inorgánicas finamente divididas, algas, *bacterias u otros microorganismos*. La presencia de esta materia particulada no permitirá la transmisión de la luz en línea recta a través de la muestra de agua, absorbiéndose o dispersándose la luz, lo cual da lugar al aspecto turbio.

El método empleado para la determinación de la turbidez fue el espectrofotométrico, el cual consiste en la medida de la intensidad de luz absorbida a una determinada longitud de onda y su comparación con un patrón de turbidez. En este método es necesario seleccionar una longitud de onda para la cual la absorbancia de la intensidad de luz por las partículas sea máxima, siendo en este caso $\lambda = 640 \text{ nm}$. Las unidades empleadas fueron las de referencia para turbidez o Unidades Nefelométricas (UNT) empleando la formacina como sustancia que da lugar a una suspensión de referencia estándar.

La suspensión de formacina se preparó diariamente, debido a que es poco estable. Para su preparación se precisó mezclar los siguientes reactivos:

- ✓ Solución de sulfato de hidracina $(\text{NH}_2)_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ (1 g/100 ml).

Esta solución se guardó en frío (4°C) siendo estable durante un mes. Debido a su carácter cancerígeno se puso especial atención en su manipulación.

- ✓ Solución de hexametileno tetraamina ($(\text{CH}_2)_6\text{-N}_4$) : (10 g./100 ml). Esta solución se conservó en frío (4°C), siendo estable durante un mes.

A partir de estas dos soluciones se preparó el patrón de formacina, para lo cual se mezclaron 5 ml de la solución de sulfato de hidracina con 5 ml de solución de hexametileno tetraamina. Esta mezcla se mantuvo en contacto durante 24 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras este tiempo se diluyó hasta 100 ml, formando así una suspensión de formacina (aspecto lechoso) con una concentración de 400 UNT. Esta suspensión era estable en frío a 4°C durante 15 días.

A partir de la suspensión madre de formacina se prepararon diferentes patrones (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, y 10.0 UNT) mediante dilución con agua bidestilada con los que se obtuvo la curva de calibración. Para valores mayores a los empleados en la curva, se preparó una nueva de concentraciones más altas. La curva se preparó empleando mínimos cuadrados para el cálculo de la ecuación de la recta. Curvas con coeficiente de correlación inferior a $r = 0.99$ se despreciaron, pasando a realizarla de nuevo.

Una vez obtenida la recta de calibración se analizó cada una de las muestras, sometiéndolas previamente a sonicación durante 2 segundos para eliminar las burbujas de aire presentes en la muestra que podían alterar la medida. Se prestó especial atención a los tubos empleados en el ensayo, los cuales debían estar perfectamente limpios, secos.

6.2.13.- Salinidad. (Conductividad, APHA, AWWA and WEF, 1992)

La determinación de la salinidad se realizó por el método de conductividad eléctrica, basada en la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura de medición.

Para la obtención de este parámetro se trabajó de la siguiente manera:

Una vez obtenida la muestra se introdujo en un baño termostatzado para estandarizar la temperatura a 20 °C, midiéndose la conductividad en un conductivímetro WTW Microprocessor Conductivity Meter LF 537. La calibración del conductivímetro se realizó según su manual. El cálculo de la salinidad tras la medida de conductividad se realizó de acuerdo a Standard Methods (APHA, AWWA and WEF, 1992).

6.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.

6.3.1.- Microorganismos mesófilos totales. (Método en placa difusa).

En este estudio, el recuento de heterótrofos en placa tiene como objetivo calcular el número de bacterias cultivables heterótrofas que existen en la mezcla del efluente con agua de mar para la inoculación del lecho sumergido y determinar así mismo la presencia de esta microbiota en la biopelícula.

El medio base de cultivo utilizado en este caso fue de Trypticase Soja Agar (TSA) de DIFCO. Debido a que los microorganismos a determinar son marinos se modificó la concentración salina del agua de destilada para impedir procesos osmóticos que impidieran el crecimiento normal de los microorganismos en la placa. De esa manera, la composición final del medio se describe en la tabla 6.2.

Tabla 6.2.- Composición del medio de cultivo utilizado para el recuento de microorganismos marinos mesófilos totales.

Componentes	
Digerido pancreático de caseína	17 (mg/l)
Digerido papaínico de soja	3 (mg/l)
Glucosa	2.5 (mg/l)
KH ₂ PO ₄	2.5 (mg/l)
NaCl	5 (mg/l)
Agua destilada al 3.4 % salino	1000 ml
Agar	20 g

Tras coger una muestra de la mezcla del efluente con el agua de mar, se fueron preparando diluciones con solución salina estéril (3.4% NaCl) Las diluciones se

seleccionaron de forma que el número de colonias en una placa sea de 30 a 300. Con una pipeta se añadía el volumen de 0.1ml de muestra a la superficie del agar presecado. Con una varilla de vidrio estéril curvada, se distribuyó la muestra sobre la superficie del medio. A continuación se incubaron las placas sembradas durante 24h a 30°C, y transcurrido este tiempo se procedió al recuento del número las colonias por placa.

6.3.2.- Determinación de la actividad desnitrificante de la biopelícula.

Para el estudio de la actividad desnitrificante de la biopelícula generada en el sistema se determinó la producción de N_2O a partir de NO_3^- , empleando el método de inhibición del acetileno descrito por Yoshinri y Knowels (1976). El método consiste en hacer crecer la biopelícula de un gramo de material soporte, en este caso extraído de los diferentes puntos de muestreo en medio de cultivo (desnitrificante) dentro de un vial cerrado herméticamente con una atmósfera inerte, que no contiene oxígeno, durante 24h a 30°C. La concentración de NO_3^- es conocida y se determina la producción de N_2O producido tras inhibir la actividad enzimática de la óxido nitroso reductasa con acetileno.

El medio de cultivo empleado para esta prueba fue descrito por Gómez *et al.* (2000a), una modificación del Nitrato-Sacarosa descrito por Rodina (1972). Para este estudio se aumentó la concentración de NO_3^- y se descendió la de fuente de carbono, lo cual permitió una mayor formación de N_2O y menor de CO_2 , facilitando la posterior determinación de N_2O .

La composición del medio de cultivo utilizado en la determinación de la actividad desnitrificante se describe en la tabla 6.3

Tabla 6.3.- Composición del medio de cultivo desnitrificante.

Componentes	
NaNO ₃	3g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
Sacarosa	2 g/l
FeSO ₄ 7H ₂ O	Trazas
Agua destilada al 3.4 % salino	1000 ml

El pH del medio se ajustó a 7.2 empleando HCl 0.1N. Una vez preparado se añadió a través de un sistema Swinex (Millipore®) con filtro de celulosa de 0.22 µm. en tubos estériles de 10 ml de capacidad con tapón de rosca y sellados con silicona de 3mm de espesor.

Al objeto de eliminar el oxígeno presente en los tubos de ensayo una vez inoculados con las muestras motivo de estudio, se procedió a un burbujeo de He estéril durante un tiempo de 10min. Este procedimiento ya ha sido anteriormente utilizado por otros autores (Gómez *et al.*, 2000a)

Para la determinación de N₂O se empleó un Cromatógrafo de gases Varian® Star 3400CX, equipado con un horno universal para termostatación de los inyectores “On Colum” para las columnas empaquetadas (1040, Porapak®N 1/8”SS de 32 metros de longitud), con detector de conductividad térmica (TCD) y línea auxiliar de gas de referencia para TCD. El equipo estaba conectado a un integrador/registrator incorporado IBDH.

Como condiciones de trabajo se mantuvieron, la temperatura del inyector en 150°C debido a que las muestras a analizar eran gaseosas. La temperatura del horno fue de 50°C y la del detector 150°C. El gas de arrastre fue He con una presión de 14 p.s.i.

Los tubos de ensayo una vez inoculados con la muestra objeto de estudio, en condiciones anaerobias se incubaron a la temperatura de 30 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se tomaron 250 µl de la atmósfera mediante una jeringuilla. El pico de N₂O se registró 3.2 minutos de tiempo de retención, dando un área que se comparaba con la obtenida por patrón.

Para la preparación de los patrones se pinchó 250µl de N₂O purísimo (Abelló Linde S.A) en un tubo de 10 ml cerrado herméticamente. El tubo estaba lleno de aire y previo a la incorporación del N₂O se extrajo 1ml de este. Con esta mezcla se conseguía un patrón de 4464 µmoles/l que corresponde a un área de 3782525 unidades.

6.4.- ESTUDIO SOBRE LA BIOPELÍCULA.

6.4.1.- Sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Para obtener las sustancias poliméricas extracelulares de la biopelícula formada en el lecho sumergido se tomaron 3 litros de agua de lavado de cada columna, una óxica y otra anóxica. Cada litro se colocó en conos Imhoff durante una hora para facilitar la sedimentación de la biopelícula arrancada en el proceso de lavado. Transcurrido el tiempo de reposos se introdujo el sedimento en botes de plástico con un volumen de 500 ml, rotulados y diferenciados en función del método de extracción del EPS a seguir.

- 2 botes (óxica y anóxica) para el método de extracción con EDTA.
- 2 botes para el método de extracción con etanol.
- 2 botes para el método de extracción con glutaraldehido.

Para mantener la biopelícula en las mismas condiciones iniciales hasta que se realice la extracción, se introducen los botes a -80° C. A partir de aquí, se inician los diferentes métodos de extracción.

6.4.1.1.- Método de extracción con EDTA

Las muestras que se utilizaron (una de la columna óxica y otra de la anóxica) para obtener el EPS mediante este método, se centrifugaron después de añadirle agua destilada en una cantidad equivalente a 25 ml por cada gramo de biopelícula a **3500 rpm** durante **10 minutos**. Después de esto, se procedió a recoger el sobrenadante.

En los mismos tubos donde ha quedado el “pellet” centrifugado se volvieron a llenar otra vez con agua destilada para resuspenderlo. Se agitaron los botes en un vortex durante un minuto, recogiendo su contenido.

Se unieron los líquidos obtenidos en los dos puntos anteriores. Se preparó EDTA en una concentración al **2 %**, y se mezcló a volúmenes iguales con el líquido del paso

anterior, dejando en reposo durante **3 horas a 4°C**. Se pasó a centrifugar el líquido a **10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C**. El sobrenadante obtenido se filtró con filtros de un tamaño de poro de 0.22 μm , para eliminar impurezas.

El siguiente paso fue llenar con este sobrenadante membranas de diálisis con un tamaño de poro de 12-14000 Daltons , dializando durante 24 horas a 4°C en una corriente continua de agua. Después de dializar, se liofilizó durante 48 horas, obteniendo así el material extracelular.

El pellet se liofilizó para posteriormente ser pesado, obteniendo la biomasa de la cual se obtuvo el material extracelular.

6.4.1.2.- Método de extracción con etanol.

Para este método (Figura 6.3), se centrifugaron las dos muestras obtenidas de forma independiente a **10.000 rpm durante 1 hora**. El sobrenadante obtenido en la centrifugación se filtró a través de filtro de 0.22 μm , para eliminar impurezas. Después de esto, se le añadió tres volúmenes de etanol al 90% con relación al sobrenadante obtenido. Esta mezcla se dejó durante **24 horas a 4°C**. Transcurridos el tiempo se pudo observar un precipitado blanquecino. Se procede a retirar el etanol teniendo cuidado que el precipitado no se redisolviere. Este precipitado se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 min., quedándose con el pellet, que será el material extracelular precipitado por el etanol. Se dejó secar para eliminar todo el etanol por evaporación, para posteriormente solubilizarlo en agua destilada. Esta nueva disolución se volvió a filtrar a través de filtro de 0.22 μm (eliminamos así las impurezas restantes), y el sobrenadante se pasó a dializar durante 24 horas a 4°C en una corriente continua de agua en membranas de diálisis con un poro de 12-14000 Daltons. El líquido dializado se colocó en placas congelando a -80°C para después liofilizarlo y obtener el material extracelular.

El pellet de esta última centrifugación se coloca en placas, y se dejó a -80°C para liofilizarlo, y así obtener el peso de biomasa seca. Esto servirá para obtener la relación EPS/biomasa seca.

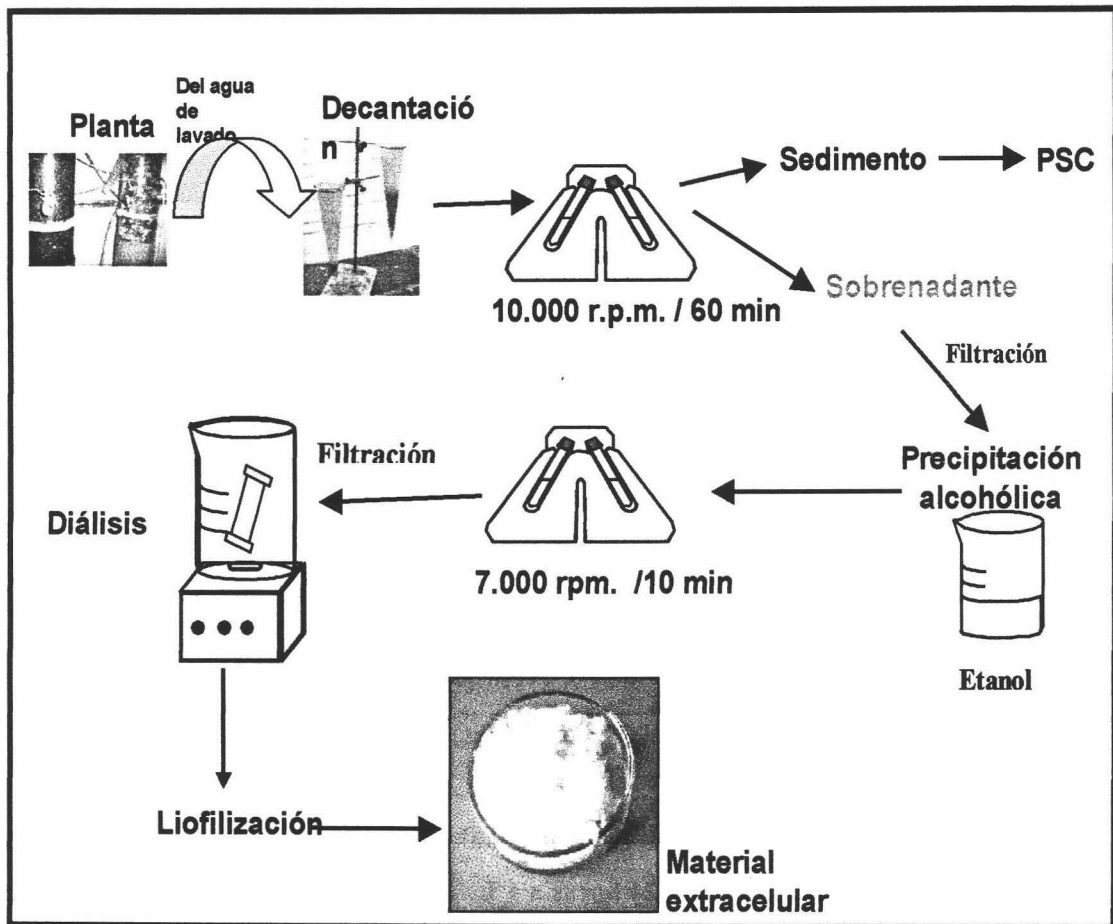


Figura 6.3.- Esquema para la extracción del material extracelular mediante etanol.

6.4.1.3.- Método de extracción con formaldehído

Al igual que se hizo para las muestras en la extracción de EPS con EDTA, se centrifugó las muestras a **3500 rpm** durante **10 minutos**. A ambas se le añadió agua destilada, 25ml/g de biopelícula. Se procedió a recoger el sobrenadante. El pellet de la centrifugación se mezcló con 25 ml de solución de NaCl al 6% que contienen además un 0,22% de CHO. Se agita el pellet con CHO, durante 1 minuto pasando a mezclar con el sobrenadante obtenido en la centrifugación, y juntos se vuelven a **centrifugar a 11.000 rpm a 4°C durante 30 minutos**.

El sobrenadante es obtenido y filtrado a través de un filtro de 0.22 μm para eliminar impurezas. El líquido filtrado se dializa durante 24 horas en corriente continua

de agua a 4°C en membranas de diálisis con un tamaño de poro de 12-14000 Daltons. Tras la diálisis se vertieron en placas para llevarlas a -80°C durante 24 h. Para pasar a liofilizar, obteniendo así el material, EPS, para analizar. El pellet de esta 2ª centrifugación se guarda en placas, congelándolas a -80°C, se liofilizan, pesando el residuo seco para ver la relación EPS/biomasa seca.

6.4.2.- Determinación de la composición química del material extracelular.

Una vez obtenido el EPS por los diferentes métodos de extracción se pasó a caracterizar a este desde el punto de vista químico, utilizando los siguientes procedimientos para los distintos parámetros.

6.4.2.1.- Carbohidratos.

Se siguió la metodología descrita por Dubois y colaboradores en 1959.

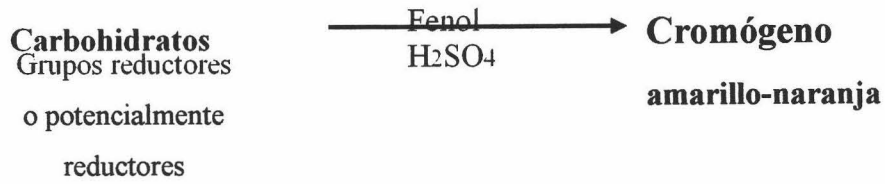
Los reactivos utilizados fueron:

- Ácido sulfúrico de pureza 95-98 % (v/v)
- Fenol al 5 % (p/v).

Se preparó una suspensión de EPS en agua destilada (1mg/ml). Se tomaron 30µl de EPS y en un tubo eppendorff se completaron hasta 200µl con agua destilada. Posteriormente se adicionaron 200µl de fenol 5% (p/v). La mezcla se agitó en un vórtex y se añadió 1ml de ácido sulfúrico 96% de forma brusca, sin que resbalara por las paredes del tubo; de esta forma se mezclan bien e hierve la solución. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 490nm.

La aparición de una coloración amarillo-anaranjada indicó la presencia de carbohidratos en la muestra como consecuencia de la reacción del fenol. El ácido sulfúrico provoca la hidrólisis del polisacárido, quedando sus monómeros libres para que

se produzca la reacción. Son, por tanto, los monómeros los que cuantifican la técnica colorimétrica:



Para la realización de la curva patrón (Figura 6.4) se preparó una solución madre de glucosa en agua destilada (1mg/ml), a partir de la cual se realizaron las siguientes diluciones (Tabla 6.4):

Tabla 6.4.- Composición de las soluciones de la curva patrón de carbohidratos.

Glucosa (µl)	0	10	15	20	25
Agua (µl) (p/v)	200	190	185	180	175
Fenol 5% (µl) (p/v)	200	200	200	200	200
Ácido sulfúrico (ml)	1	1	1	1	1

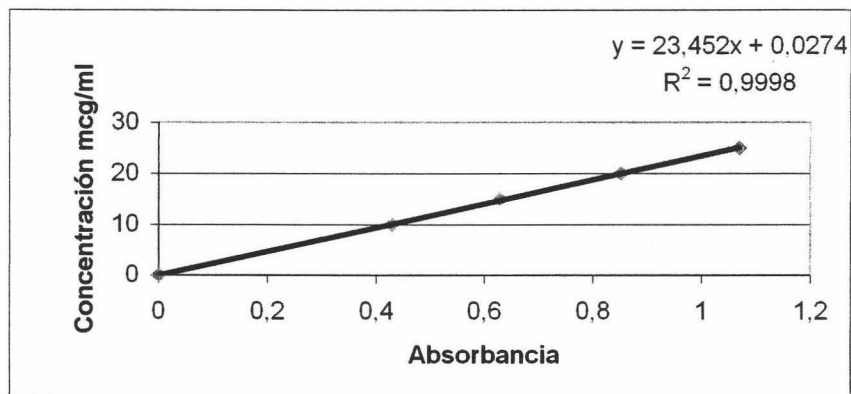
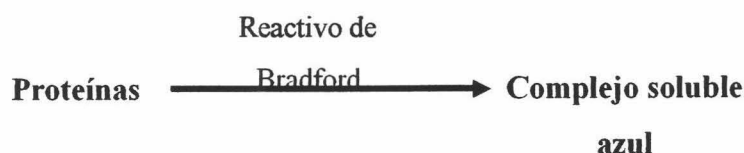


Figura 6.4.- Curva patrón de carbohidratos.

6.4.2.2.- Proteínas.

Se preparó una suspensión de 1mg/ml de EPS en agua destilada. Se tomaron 200µl y se completaron hasta 800µl con agua destilada. Se adicionaron 200µl de reactivo de Bradford y, tras agitar, se midió la absorbancia a 590nm.

El reactivo de Bradford reacciona con las proteínas que contiene el polímero, dando lugar a la formación de un complejo azul soluble:



Para la realización de la curva patrón (Figura 6.5) se preparó una solución de 1mg/ml de albúmina sérica bovina en agua destilada. A partir de la misma se obtuvo una dilución 1/10 (100µl/ml), que constituyó la solución madre para la curva patrón, a partir de la cual se realizaron las distintas diluciones (Tabla 6.5) para obtener los distintos puntos de la curva patrón:

Tabla 6.5.- Composición de las soluciones de la curva patrón de proteínas.

Albúmina (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	800
Agua destilada (µl)	790	780	770	760	750	740	730	720	710	700	200
Reactivo (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	0

El color es estable durante una hora, pero para una mayor precisión la medida de la absorbancia debe efectuarse entre los 5 y 20 minutos posteriores a la adición del reactivo.

El complejo puede unirse a las paredes de la cubeta y colorearla de azul, para evitarlo hay que lavar la cubeta con alcohol y con agua destilada. Tras la determinación

se deja en una solución al 0.1% (v/v) de HCl durante una hora y así se elimina completamente el complejo.

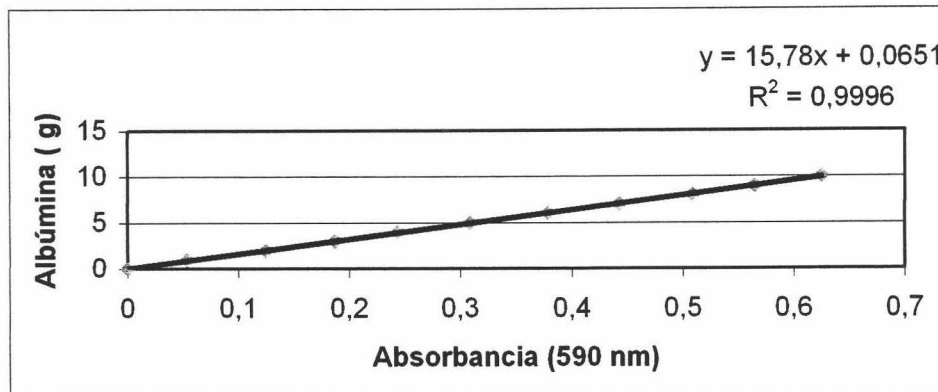


Figura 6.5.- Curva patrón de proteínas.

6.4.2.3.- Carbono Orgánico Total (TOC)

A partir de una solución de 1mg/ml de EPS, se determinó los compuestos orgánicos tanto fijos como volátiles de dicha muestra, mediante una oxidación catalítica a 950 °C, donde los elementos carbonados dan anhídrido carbónico que se determina en un analizador de infrarrojos. El carbono de origen mineral se elimina previamente pudiéndose determinar separadamente como así se hizo. Los resultados vienen expresados en miligramos por litro.

6.4.3.- Estudios de la biodiversidad en la biopelícula.

Una de las aproximaciones más extendidas para explorar la diversidad procarionta a nivel genético se basa en la clonación y secuenciación de los genes que codifican el ARN 16S de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (ADNr 16S).

Este gen cumple los requisitos para actuar como una buena sonda evolutiva, al tratarse de un gen de distribución universal que posee una función constante, que cambia con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas, y de un tamaño relativamente pequeño (aproximadamente 1.5 Kb) que ha facilitado su

secuenciación, especialmente antes de la introducción generalizada de los métodos de secuenciación automática a partir de mediados de los años 90.

La secuencia del ADNr 16S tiene una estructura de mosaico, presentando una alternancia de regiones altamente conservadas en el reino procariota y regiones hipervariables que sólo están conservadas entre los individuos evolutivamente muy próximos. Esa estructura ha permitido el diseño de cebadores universales para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh *et. al.*, 1991), que posibilitan la clonación de fragmentos de los ADNr 16S de microorganismos a partir de ADN total extraído de muestras naturales, y de este modo profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas naturales (Muyzer and Smalla, 1998).

Sin embargo, a pesar de que estos estudios proporcionan una exploración de la diversidad microbiana superior a la que se vislumbra con los métodos tradicionales dependientes del cultivo de los microorganismos, tienen dos claras desventajas: la clonación es un método laborioso y poco práctico para múltiples muestras, y por lo tanto es difícil de aplicar para el estudio de la dinámica de las poblaciones, constantemente influenciadas por las fluctuaciones naturales de los parámetros ambientales o las perturbaciones introducidas por la actividad humana sobre el medio ambiente. Por ello, recientemente se han desarrollado otras técnicas de huella genética más adecuadas para estos propósitos.

En 1993, Muyzer *et al.* introdujeron la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) en el campo de la ecología microbiana. Esta técnica, junto con su homóloga TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura), fue inicialmente diseñada para distinguir mutaciones genéticas, y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño pero de distinta secuencia de nucleótidos.

El fundamento de la técnica se basa en la disminución de la velocidad electroforética que sufren las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturizadas, debido a cambios de la forma física de la molécula que

afectan a su movilidad cuando migran en la matriz de un gel que contenga un gradiente lineal de desnaturizantes del ADN.

El gradiente desnaturizante se crea bien a partir de sustancias químicas (DGGE) o bien mediante un rango de temperaturas (TGGE), que es más fácilmente reproducible, y por tanto proporciona resultados más comparativos (Riesner *et al.*, 1989) (Fig. 6.6).

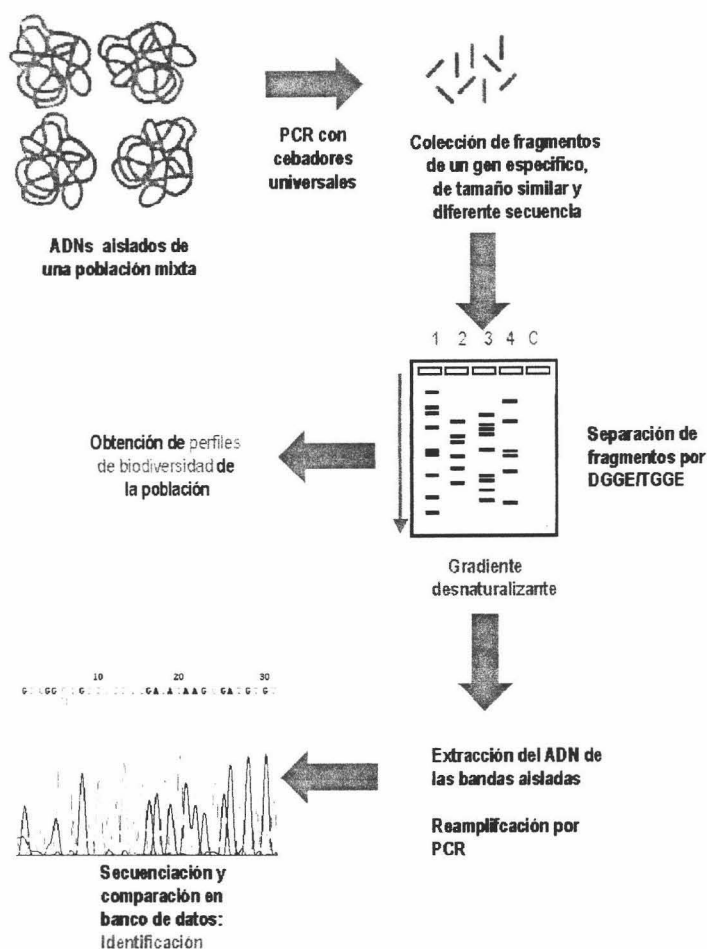


Fig. 6.6.- Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE/TGGE a estudios de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas.

Cuando la electroforesis de una mezcla de fragmentos de ADN amplificados con cebadores universales a partir de ADN total extraído de una muestra ambiental se realiza en condiciones adecuadas en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de desnaturalizantes químicos o de temperaturas, las moléculas con distinta secuencia se desnaturalizan parcialmente a distintas alturas del gradiente, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer and Smalla, 1998; Muyzer, 1999). De esta forma, se obtienen perfiles de la composición de la población en la muestra de partida. Una vez separadas, las bandas correspondientes a distintas secuencias de ADN pueden reamplificarse con los mismos cebadores universales y ser secuenciadas, permitiendo la comparación de las nuevas secuencias con las ya conocidas y depositadas en los bancos de datos, y de esta forma es posible establecer su afiliación taxonómica.

Las ventajas de esta técnica son múltiples: permite investigar la diversidad de una población microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, posibilita la identificación de los microorganismos hasta nivel de especie, es apta para el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, y permite comparar los perfiles de biodiversidad de la población evaluando diferencias espaciales y temporales en un determinado nicho ecológico, así como el impacto producido por la introducción de agentes externos. Hoy día se considera una técnica de elección para la caracterización de poblaciones naturales, en las que un porcentaje elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables (Muyzer, 1999).

6.4.3.1.- Extracción del DNA de las columnas.

En primer lugar se realizó una extracción de la microbiota que forma la biopelícula adherida al soporte tanto de la columna óxica como anóxica, a diferentes alturas y de forma independiente, procediendo de la siguiente manera:

En un vaso estéril se recogieron muestras de 5 g de árido, al que se le añadió 50 ml de solución salina al 0.9% estéril. Se pasó a sonicar durante 2 min. y a agitación en orbital a 200 rpm durante 1 hora 30 minutos, con esta suspensión se trató según el protocolo de Watanabe modificado (Watanabe *et al.*, 1998), según continua:

1. Esta suspensión se centrifugó a 3000rpm durante 30min desechándose el sobrenadante y quedándonos con el pellet.
2. A continuación se resuspendió añadiendo 1ml de buffer de suspensión de células (para 50mL: 500 μ L de Tris clorhídrico 1M pH 8, 100 μ L de EDTA 0.5M pH 8, 5.96 g de sacarosa y 49.4 mL de agua, añadiéndose extemporáneamente 20mg/mL de lisozima), dejándose incubar 10min a 37°C.
3. Se pasó a añadir 1.5 mL de solución de lisis (para 50mL: 5mL de Tris clorhídrico 1M pH 8, 2mL de EDTA 0.5M pH 8, 0.87g de cloruro de sodio, 1g de SDS enrasándose a 50mL y añadiéndose extemporáneamente 2-mercaptoetanol hasta concentración 2% y proteinasa K 200 μ L/mL) y se incubó a 37°C durante 1h.
4. Tras este periodo de tiempo se extrajo dos veces con un volumen de fenol:cloroformo (fenol saturado de cloroformo), tomándose siempre la fase acuosa y desechándose la orgánica.
5. Al sobrenadante se añadió RNAasa a una concentración final de 125 μ g/mL y se incubó a 37°C durante 10min. Una vez extraída con cloroformo se dividió el extracto acuoso en fracciones de 800 μ L añadiéndose igual volumen de isopropanol y dejándose precipitar a -20°C durante 30min.
6. A continuación se centrifugó a 13000g durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de etanol al 70% centrifugándose a continuación durante 2min. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar, añadiendo 50 μ L de buffer TE estéril y dejándose redisolver toda la noche.

6.4.3.2.- Amplificación de fragmentos de ADN codificantes del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S).

Una vez aislado el ADN, se amplificó la región genómica que codifica la subunidad 16S del ribosoma bacteriano (ADNr 16S). Para ello, las muestras de ADN se

sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando una estrategia anidada que consistió en dos amplificaciones consecutivas. En la primera PCR, se amplificó la casi totalidad del gen (aproximadamente 1.5-1.6Kb), y en la segunda una región interna de menor tamaño (aproximadamente 0.2Kb), correspondiente a la región hipervariable V3 (nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli*, Muyzer *et al.*, 1993). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, que permite obtener patrones de bandas más completos.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores universales fd1 y rd1 (Weisburg *et al.*, 1990), y para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer *et al.*, 1993). La secuencia del cebador GC-P1 está basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de 40 pares de bases ricas en GC necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer *et al.*, 1993). La figura 6.7 muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la tabla 6.6.

Tabla 6.6.- Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada.

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
RD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC
GC-P1 ^A	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG
P2	ATT ACC CGC CGT GCT GG

a- en negrita se indica la cola rica en GC.

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de los descritos por Vinuesa *et al.*, (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla 6.7.

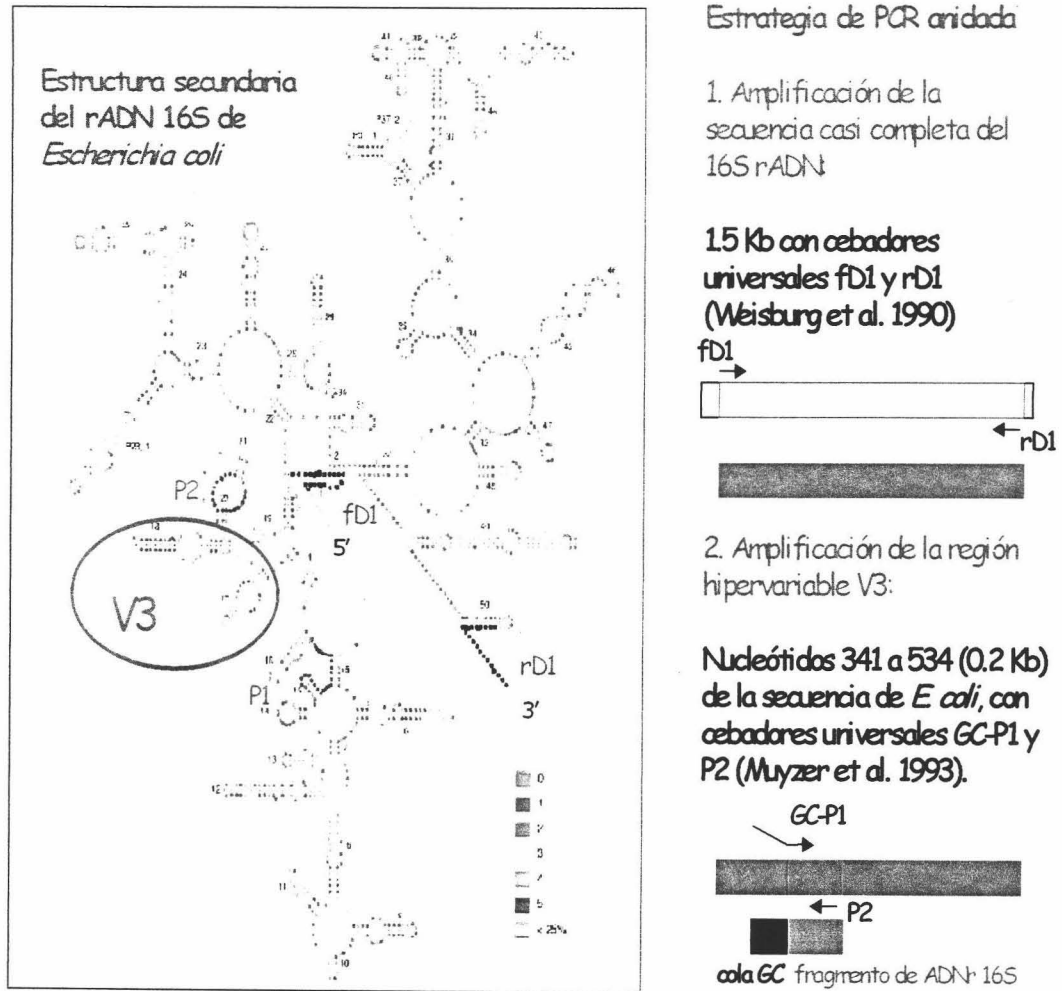


Figura 6.7.- Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen y en la segunda una región interna de menor tamaño.

Tabla 6.7.- Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50µl.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5
MgCl ₂ 25mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10mg/ml (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2.5
Cebador fD1 100µM (Sigma)	0.2
Cebador rD1 100µM (Sigma)	0.2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0.2
ADN molde	1
Agua bidestilada grado PCR	37

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 7 minutos.
2. 25 ciclos que constan de:
 - 2.1. Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto 10 segundos.
 - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado (*Annealing*):
56°C durante 40 segundos.
 - 2.3. Extensión: 72°C durante 2 minutos.
3. Extensión final: 72°C durante 6 minutos 10 segundos.
4. Mantenimiento a 4°C.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5µl que se chequearon en gel de agarosa al 0.8%, para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1.5-1.6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región hipervariable V3. La segunda reacción de PCR se

efectuó en un volumen final de 100µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe et al. (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8.- Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 100µl.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	10
MgCl ₂ 25mM (Applied Biosystems)	6
Seroalbúmina bovina 10mg/ml (N E Biolabs)	2
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	2
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	5
Cebador GC-P1 100µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	0.4
Cebador P2 100µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	0.4
Ampli <i>Taq</i> Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0.4
ADN molde (producto de la primera PCR)	1
Agua bidestilada grado PCR	73

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 minutos.
2. 30 ciclos que constan de:
 1. Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 2. *Annealing*: 65°C durante 1 minuto.
Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1°C cada 2 ciclos, hasta alcanzar 55°C, temperatura a la cual se efectuaran 10 ciclos adicionales
 3. Extensión: 72°C durante 2 minutos.
3. Extensión final: 72°C durante 10 minutos .
4. Mantenimiento a 4°C.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1µl que se chequearon en gel de agarosa al 3%, para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0.2 Kb).

6.4.3.3.- Concentración del producto de la PCR anidada.

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron aproximadamente 10 veces, empleando las membranas Microcon (Millipore), siguiendo las indicaciones del fabricante. Gracias al uso de estas membranas se consiguió además purificar los productos de PCR eliminando las sales y componentes de bajo peso molecular.

6.4.3.4- Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Whatman Biometra). Para la separación de los distintos fragmentos se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida, preparado en agua bidestilada, según indica la Tabla 6.9:

Tabla 6.9.- Composición del gel desnaturalizante de poliacrilamida empleado en la electroforesis en gel con gradiente de temperatura.

Reactivos	Concentración
Poliacrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Sigma)	6%
Urea, grado biología molecular (Sigma)	8M
Formamida desionizada (Sigma)	20%
Glicerol (Sigma)	2%
Buffer tris-acetato 40mM, EDTA 1mM (TAE) pH 8.0	1x
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), grado biología molecular	0.06%
Persulfato de amonio, grado biología molecular	0.06%

Los geles se dejaron polimerizar durante 3h antes de hacer la electroforesis.

Para la electroforesis se empleó buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) a la concentración 1X. Se cargaron 5µl de cada muestra mas 1µl de buffer de carga (5X) de la siguiente composición: TAE (5X), 0.1% Triton-X100, 0.01% Azul de Bromofenol, 0.01% Xilencianol y EDTA 2mM. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0=20^{\circ}\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10}=20^{\circ}\text{C}$
- Voltaje= 300V
- Duración= 15min

2. Establecimiento del gradiente de temperatura:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0=43^{\circ}\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10}=63^{\circ}\text{C}$
- Voltaje= 0V
- Duración= 10min

3. Separación de las muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0=43^{\circ}\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10}=63^{\circ}\text{C}$
- Voltaje= 115V
- Duración= 18 horas

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron sumergiéndolos en 500ml de solución de colorante fluorescente SYBR GREEN-I (Sigma) (2X), preparado en buffer TAE (1X). La tinción se efectuó durante 20 min. con agitación suave y en la oscuridad, tras lo cual se visualizaron los perfiles de bandas con luz ultravioleta empleando el sistema de documentación de geles GelDoc-2000 (BioRad).

Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó un marcador de seis especies a partir de las cepas de colección que se indican en la Tabla 6.10. El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

Tabla 6.10.- Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en el TGGE.

ESPECIE	CEPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 8750
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 15308
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α
<i>Nocardia corynebacterioides</i>	ATCC 21253
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341

ATCC: American Type Culture Collection.

Investigación de Choque

7.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE

Para el desarrollo de la investigación y como paso previo, se construyó y se puso en marcha una planta a escala de laboratorio de filtros sumergidos destinada al tratamiento del influente industrial a estudio, con la finalidad de conocer la capacidad o aplicabilidad de dicha tecnología en función de la respuesta a las variables consideradas, para conseguir la eliminación de los compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino.

Trabajar con plantas a pequeña escala permite operar en un laboratorio con la facilidad para aplicar modificaciones en su diseño y controlar determinadas variables así como disponer de todos los medios de control aplicables con su correcta precisión. Todo ello, para obtener resultados que deben ser útiles para aplicar el proceso a plantas de una escala superior

7.1.- PLAN DE TRABAJO

Se ha de tener en cuenta que tratar de depurar un efluente industrial, como en este caso el agua residual industrial de DSM Deretil S.A. mediante una tecnología de base biológica, en la cual no existen experiencias previas con lechos sumergidos, obliga a realizar una investigación de choque destinada al conocimiento reducido del sistema y lograr un prototipo adaptable a los objetivos marcados en la investigación. Esto llevó a un plan de trabajo que se dividió en 4 fases.

- ❖ En la **primera fase** se construyó una planta prototipo a escala de laboratorio para comenzar los ensayos de tratamiento del efluente industrial mediante filtros sumergidos. Como material soporte se seleccionó un esquistos arcilloso en función de trabajos previos del grupo de investigación y sobre todo por una posible capacidad de regulación sobre el pH del medio líquido, fenómeno este, estudiado en esta primera fase. De esta manera se inició la formación de la biopelícula que debería ser responsable de la descontaminación, partiendo de la misma microbiota presente en el agua de

mar empleada en la dilución del influente industrial. El tiempo de duración de la fase fue de aproximadamente de 7 meses.

- ❖ La **fase segunda** se destinó a solucionar los problemas en el sistema de lavado del proceso originados por la incorrecta homogeneización del influente con el agua de mar, que llevo a obtener valores de concentración de entrada muy heterogéneos. Esto obligó a realizar una serie de modificaciones en la planta. Una vez realizadas, se comprobó el funcionamiento de la nueva planta estudiando la influencia de las variables carga hidráulica, recirculación y lavado del sistema. Para la realización de esta fase fue necesario un tiempo de 5 meses.

- ❖ La **tercera fase** de la investigación se inició al observarse que los rendimientos del sistema frente a los parámetros nitrógeno total, DQO y fenol no fueron los esperados teóricamente. Se modificó la columna anóxica cambiándola por una columna de igual diámetro y altura de relleno que la columna óxica pasándose a verificar el comportamiento del proceso frente a la variable carga hidráulica. Se realizó en el tiempo de un mes.

- ❖ La **cuarta fase** surgió para estudiar el comportamiento del sistema ante una variación en el aumento de la carga hidráulica ó disminución en el tiempo de retención hidráulico con el objetivo de obtener referencias del ajuste del sistema y control de la planta ante las variables de estudio. Para su realización fue necesario emplear un mes.

7.2.- 1ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

7.2.1.- Metodología de la 1ª Fase.

7.2.1.1.- Ensayos sobre la capacidad reguladora del material soporte frente al pH del medio líquido.

7.2.1.1.1.- Descripción de la planta experimental utilizada en el ensayo del pH.

Es bien conocido que los minerales de la arcilla ejercen una gran influencia sobre las propiedades químicas y física de los suelos, como consecuencia de su pequeño tamaño de partícula, alta superficie específica y sus propiedades para intercambiar cationes, propiedad esta última que le confiere poder tampón del pH. Es por ello que en esta investigación y previo al uso de un dispositivo regulador de pH, se realizó un estudio para demostrar la capacidad reguladora del relleno utilizado sobre el pH del medio líquido que deberá pasar a través de él en un proceso de nitrificación-desnitrificación mediante lechos inundados, y así ahorrarse tanto el dispositivo para regular el pH del proceso como el propio reactivo tampón.

Para ello, se utilizó una probeta para simular un lecho inundado de 50 cm de alto y 6 cm de diámetro con una altura de relleno de 45 cm (figura 7.1). Dicho relleno fue el mismo que se utilizó en la planta prototipo de lechos inundados a escala de laboratorio. El sistema contó con dos depósitos, uno para el agua de entrada y el otro para recoger el agua de salida, dispuestos como se puede observar en la figura 7.2. Al sistema se le hizo pasar agua destilada con un pH de 2.5 para observar mejor la variación y capacidad tampón del árido sobre el pH del medio acuoso.

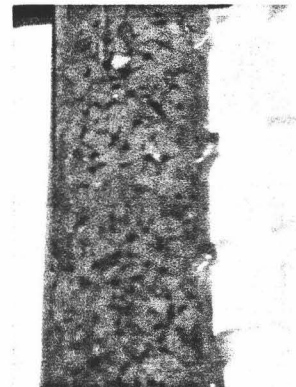


Figura 7.1.- Aspecto del relleno en el interior de la probeta

Todo el sistema estuvo cerrado para impedir que elementos externos tomaran contacto con el agua y pudieran interferir en el ensayo.

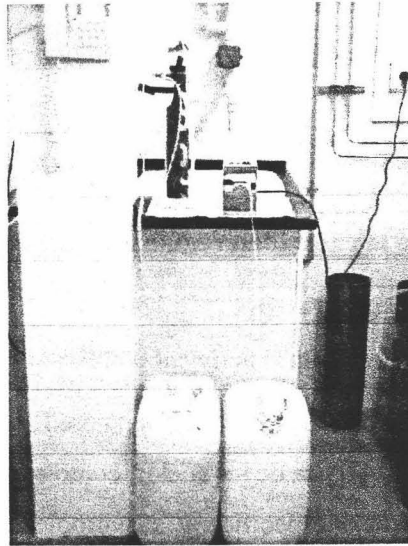


Figura 7.2.- Planta a escala de laboratorio utilizada en el ensayo de regulación del pH mediante el árido soporte de la biopelícula.

7.2.1.1.2.- Variables y parámetros utilizados en el ensayo.

La variable que se fijó y controló en el sistema fue la carga hidráulica.

Los parámetros a los cuales se les hizo un seguimiento fueron:

1. El pH de entrada del influente previamente ajustado y el pH de salida del efluente, que daría idea del poder regulador del relleno sobre el pH del medio líquido.
2. La concentración de diferentes cationes en el influente y efluente, para comprobar la capacidad de intercambio catiónico del relleno.

7.2.1.2.- Estudios de la capacidad de formación de la biopelícula con el propio influente.

El tratamiento del agua residual urbana se enfoca hacia los tratamientos biológicos, en parte por la biodegradabilidad de los contaminantes que contiene y por la presencia de una microbiota capaz de depurar. En el caso del agua residual industrial con

una composición como la del agua objeto de esta investigación se precisa inicialmente incidir en la biodegradabilidad de sus componentes y una vez asegurada esta, se precisa conocer de la existencia de una microbiota capaz de reducir o eliminar dichos contaminantes. Un efluente con un pH extremadamente ácido (2-3) y una elevada concentración de fenol, difícilmente contendrá microorganismos aplicables en el proceso depurador. Sin embargo, dada la necesidad de diluir el efluente para afrontar su tratamiento biológico y el empleo para ello de agua de mar procedente de la zona de vertido de este agua residual, se planteó la posibilidad de formar la biopelícula a partir de la mezcla entre el agua residual industrial y el agua de mar. El vertido continuo de este agua residual dio lugar a una selección de la microbiota en la zona de vertido, la cual en presencia de la concentración adecuada de los contaminantes biodegradables aportados por el agua residual favorecería un crecimiento poblacional que permitiera la formación de la biopelícula.

Para comprobar esta posibilidad se incubó la microbiota presente en el agua de mar en presencia de agua residual industrial en una relación 1/30 (la misma a utilizar en el tratamiento del influente), al objeto de observar el posible incremento de la microbiota mediante recuento de microorganismo y valoración de la turbidez.

El éxito en la obtención de crecimiento llevaría a la formación de biopelícula en la planta prototipo de lechos inundados a escala de laboratorio, comprobando su formación mediante el análisis del peso seco de la biopelícula formada alrededor del soporte. La microscopía electrónica de barrido de superficie apoyó a valorar la formación de esta biopelícula sobre el material soporte.

7.2.1.2.1.- Variables y parámetros utilizados en la formación de la biopelícula.

Para la realización de dicho ensayo se fijaron y controlaron las siguientes variables:

Carga hidráulica, recirculación y caudal de aire de proceso, con los cuales se llevó a cabo la formación de la biopelícula en la planta prototipo a escala de laboratorio que se describe en el siguiente apartado.

Los parámetros a los cuales se les hizo un seguimiento fueron:

Sobre la biopelícula, en la fase de inoculación del sistema durante un tiempo de 120 horas de seguimiento y en diferentes puntos de muestreo, se analizaron:

1. Actividad nitrificante I y II. Se estima el potencial de la microbiota presente en la biopelícula para transformar las formas reducidas de nitrógeno en otras más oxidadas dispuestas para ser utilizadas en la fase desnitrificante.
2. Actividad desnitrificante de la biopelícula (mM N_2O /g relleno). Que indica la capacidad potencial de la microbiota existente en la biopelícula de eliminar las formas oxidadas de nitrógeno del sistema.
3. Turbidez y recuentos de microorganismos: estima el crecimiento de la microbiota y así las posibilidades de formación de la biopelícula.
4. Cantidad de biofilm por gramo de relleno y microscopia electrónica de barrido de superficie para comprobar el éxito y fijación de la microbiota en el material soporte.
5. Concentración de oxígeno disuelto: que influye tanto en la actividad nitrificante como desnitrificante.

7.2.1.3.- Estudios previos del funcionamiento del prototipo de planta de lechos inundados a escala de laboratorio.

7.2.1.3.1.- Descripción del prototipo de planta de lechos inundados.

Atendiendo a los datos obtenidos por nuestro grupo de investigación en estudios destinados al tratamiento de aguas residuales con lechos inundados (Zamorano, 1996; Osorio, 1998) y a la experiencia en probeta sobre el material soporte de la biopelícula que más adelante se describe, se diseñó y construyó una planta de lechos inundados para el tratamiento de las aguas residuales industriales con la finalidad de eliminar los compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino mediante procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación siguiendo el esquema de pre-desnitrificación.

El diseño consistió en un cilindro de 7 cm de diámetro y 100 cm de altura de relleno funcionando como columna no aireada o anóxica a través de la cual entró el influente a tratar. De forma paralela y conectada mediante vasos comunicantes formando una "U" (Figura 7.3) se colocó otro cilindro de 15 cm de diámetro y 120 cm de altura de relleno, la cual funcionó como columna aireada. De esta manera se consiguió que el volumen de la columna aireada fuese 5 veces mayor que la columna anóxica, relación buscada por dos motivos principalmente: las tasas de crecimiento teórica de la microbiota nitrificante es significativamente más lenta que las tasas de crecimiento de la microbiota desnitrificante y en los procesos de nitrificación-desnitrificación la fase nitrificante limita el rendimiento total del proceso. De la nitrificación depende la cantidad de nitrógeno oxidado que va a ser utilizado en la fase desnitrificante para transformarse en nitrógeno atmosférico. Hernández (1997) recoge que en procesos de nitrificación-desnitrificación en fangos activos la

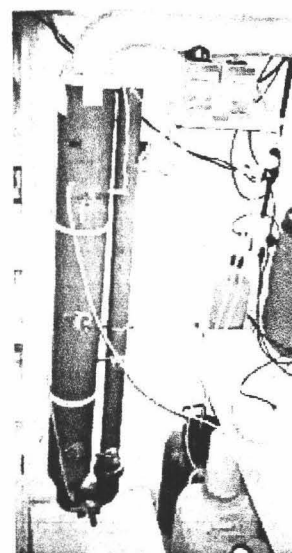


Figura 7.3.- Filtro sumergido a escala de laboratorio para pre-desnitrificación.

relación entre el volumen de reactor anóxico con respecto al volumen del reactor total puede ser de 0.2 a 0.5 en función de diferentes condicionantes. Elegir la nitrificación y desnitrificación de forma independiente es debido a que permite una mayor flexibilidad y fiabilidad del proceso, y obtener un rendimiento óptimo de cada uno, al favorecer que se pueda eliminar problemas de toxicidad potencial, ya que la materia orgánica biodegradable, que puede resultar limitante para el crecimiento de las bacterias nitrificantes, se pueda eliminar en la etapa de oxidación de carbono mediante la desnitrificación (Metcalf and Eddy, 1995).

En la parte baja de la columna óxica se colocó un aireador (Figura 7.4) formado por un tubo de silicona perforado, para aportar aire que permita conseguir concentraciones de oxígeno disuelto en el agua entre 5-6 mgO₂/l (se mantuvo con un caudal de aireación de 12 m³/m² hora). La perforación del tubo de silicona se realizó mediante una aguja consiguiendo tamaños de burbuja con diámetros inferiores a 4mm. Con esos diámetros de burbuja, y según Trillo (1998), se pueden considerar dentro de los difusores de burbuja fina con los cuales se consigue una buena transferencia de oxígeno. Además, en esta misma columna se colocó, en su parte central, una entrada con tubo de silicona para inyectar el agua con la que realizar los lavados de ambas columnas.

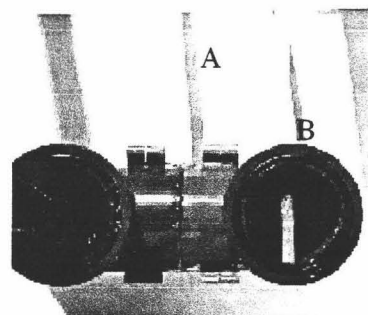


Figura 7.4. Aspecto de la conexión del aireador en la parte baja de la columna aireada (B) y entrada para el agua de lavado (A).

La columna se rellenó con material arcilloso, concretamente residuos de ladrillo procedente del rechazo por roturas por deficiente manipulación, pero con una cocción correcta. La granulometría del material fue de 5-7 mm con una densidad de 1.74 g/cm³, granulometría utilizada en otros trabajos de investigación con tecnologías de lechos inundados por el grupo de investigación MITA

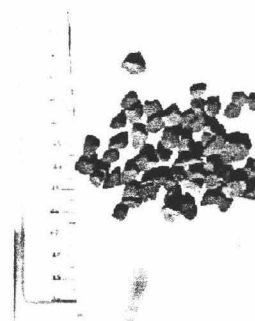


Figura 7.5.- Material arcilloso empleado como relleno y soporte de la biopelícula en el lecho inundado.

(Osorio *et al.*, 2001) y por otros autores (Richard and Thébault, 1992; Pujol *et al.*, 1998). A 5 cm por encima del tubo perforado para inyectar aire de proceso y en el interior de la columna se colocó una malla para separar el árido de la zona de aireación y sujeción del mismo. Igualmente y a la misma altura se colocó otra malla en la columna anóxica. La figura 7.5 muestra un detalle del material de relleno y en la tabla 7.1 se resumen las características de la planta.

Tabla 7.1.- Características de la planta a escala de laboratorio de la 1ª fase.

Altura y diámetro de la columna anóxica	1 m de altura y 7 cm de diámetro
Altura y diámetro de la columna óxica	1.2 m de altura y 15 cm de diámetro
Superficie del lecho Anóxico	0.00385 m ²
Superficie del lecho Óxico	0.0176 m ²
Volumen ocupado por el material soporte del lecho Anóxico	0.00218 m ³
Volumen ocupado por el material soporte del lecho Óxico	0.01204 m ³
Densidad del material soporte	1.74 g/cm ³
Granulometría del material soporte	5-7 mm
Porosidad del medio filtrante	0.4323

Para conseguir concentraciones adecuadas del efluente de DSM DERETIL S.A. que permitiera su tratamiento biológico, se dispuso de un sistema de alimentación consistente en un depósito de 25 l para el agua de mar y otro, independiente, de 2 l para el influente industrial. La mezcla y dilución con una relación 1/30 de efluente y agua de mar respectivamente, se realizó en el interior de la columna anóxica, consiguiéndose una relación entre DQO/N_{total} de 6.3 próxima a la indicada por Tseng *et al.*, (1998) para que se produzca una desnitrificación completa. Las concentraciones de trabajo de entrada teóricas que se conseguían con esta dilución serían: 300 mg/l de N_{total}, 500 mg/l de fenol y 2000 mgO₂/l de D.Q.O.

El pH del influente antes de la mezcla se mantuvo entre 1-2 teniéndose que ajustar a un pH próximo a la neutralidad para facilitar el tratamiento biológico por parte de la microbiota del proceso. Para ello, por un lado el agua de mar se ajustó hasta un

valor de 10.5 y por otro al influente de DERETIL hasta pH 4. El ajuste se realizó con hidróxido sódico 1N, obteniéndose un pH final de entrada entre 7.0-8.0, tal y como se hace en la propia industria.

La salida del agua tratada se situó a la altura de lámina de agua de la columna óxica, para su recogida en un pequeño depósito. Este agua se utilizó para la recirculación del sistema, introduciéndola a través de la columna anóxica a la misma altura que la entrada de influente.

El lavado de la planta se llevó a cabo cuando la pérdida de carga era excesiva debido al crecimiento de la biopelícula y retención de sólidos. Para el control de la pérdida de carga se colocó un tubo de silicona paralelo a la columna anóxica que medía el nivel real de agua. La pérdida de carga se reflejaba mediante el incremento en centímetros en la columna de agua, accionándose el lavado del filtro para pérdidas de carga superiores a 17 cm, como media recogida por Metcalf and Eddy (1995) para los lavados de los filtros sumergidos.

El lavado se realizó con agua tratada para la columna anóxica y agua-aire para la columna óxica. El aire es el mismo que el aplicado en el proceso, al no interrumpir la entrada del aire durante el lavado. El agua de lavado se aportó mediante una bomba de 370 W. (1400 l/h de caudal máximo). La figura 7.6 muestra un esquema completo del sistema.

Los puntos de muestreo elegidos (figura 7.6) para realizar el seguimiento del proceso y analizar los parámetros indicados fueron:

1. De la columna anóxica los puntos D1 y D3 representando la entrada del influente mezclado y la salida de la columna anóxica (control del proceso de desnitrificación) respectivamente

2. De la columna aireada los puntos N4 representando la entrada a la columna aireada y N2 la salida tanto de la columna aireada como del sistema de lechos sumergidos.

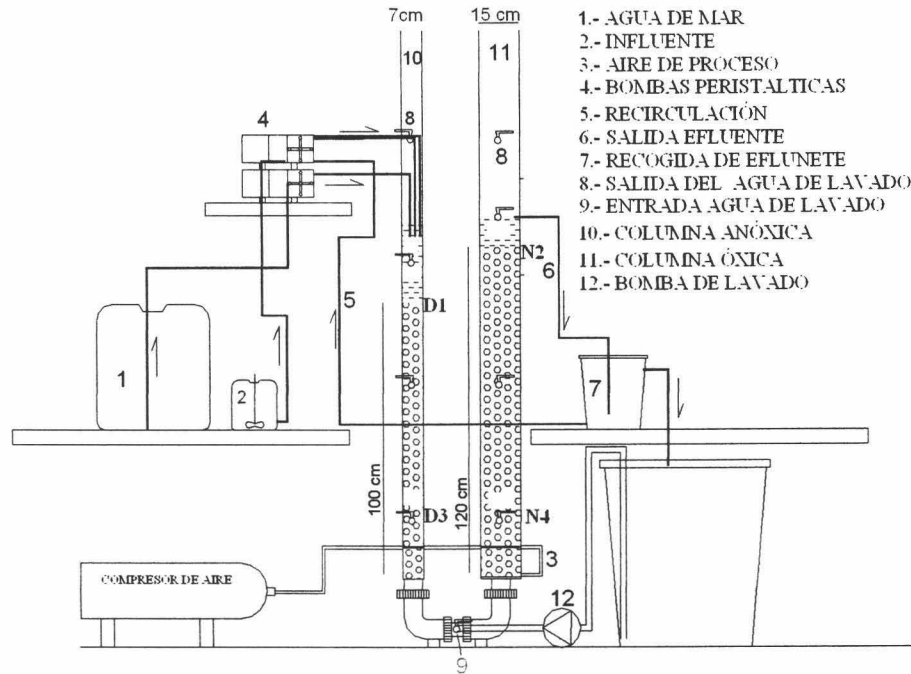


Figura 7.6.- Esquema de funcionamiento del sistema

7.2.1.3.2.- Variables y parámetros utilizados en el ensayo.

Las variables que se fijaron y controlaron en el sistema fueron:

Carga hidráulica, caudal de recirculación y de aire de proceso, con los cuales se comenzó el trabajo de investigación.

Los parámetros a los cuales se les hizo un seguimiento fueron:

Sobre el influente de entrada (E), entendiéndose como tal la dilución 1/30 entre el efluente de DERETIL S.A. y el agua de mar que participó en la inoculación del sistema se analizaron:

1. Turbidez y recuento de microorganismos. Ambos parámetros estimaron el crecimiento bacteriano que van a participar en la formación de la biopelícula.

Sobre el influente en el punto de muestreo D1 o zona de mezcla entre el agua de mar y el efluente de DERETIL S.A, se analizaron:

1. La concentración en nitrógeno total y DQO, que informaron de las cargas contaminantes que el sistema tuvo que soportar y tratar, además de indicar la correcta o no homogeneización de ambos influentes de entrada.

7.2.2.- Resultados y Discusión.

7.2.2.1.- Capacidad reguladora del material soporte sobre el pH del medio líquido.

En un proceso de nitrificación-desnitrificación el consumo de alcalinidad por parte de la nitrificación y la producción de alcalinidad por parte de la desnitrificación lleva consigo un balance neto de acidificación del medio, que en los distintos sistemas de tratamiento de aguas se debe controlar para impedir descensos del pH que suponga disminución o inhibición de ambas actividades, nitrificación y desnitrificación.

Los primeros resultados obtenidos fueron recogidos del ensayo montado a propósito del estudio del comportamiento de la capacidad del relleno para regular el pH del agua preparada para la ocasión, y que a continuación se describen.

El caudal de trabajo fue de 2 l/día, equivalente a una carga hidráulica de 0.7 m³/m² día valor próximo utilizado por otros autores (Richard and Thébault, 1992; Pujol *et al.*, 1998) en filtros sumergidos para el tratamiento de aguas residuales industriales con procesos de nitrificación-desnitrificación

Como se puede observar en la figura 7.7 el pH de entrada se mantuvo aproximadamente constante con un valor medio de 2.6 ± 0.1 mientras que el pH de salida se mantuvo con un valor medio de 6.3 ± 1.0 durante los primeros 90 días de funcionamiento, siguiendo un comportamiento polinómico ($r^2=0.8371$) de segundo grado de tipo cóncavo.

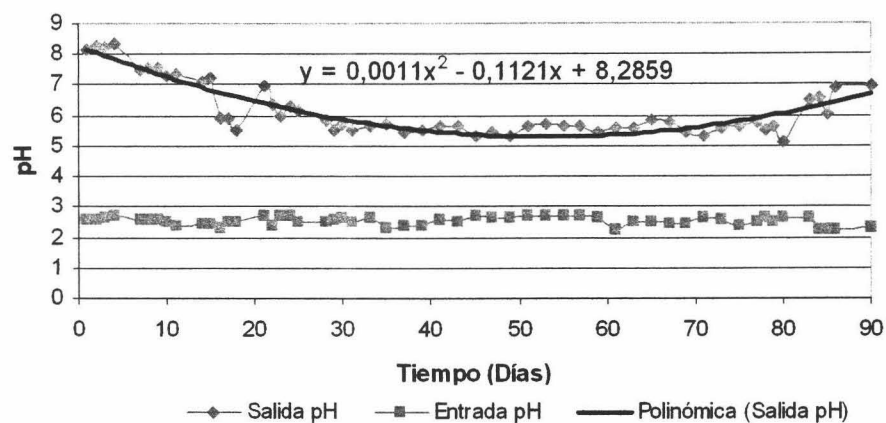


Figura 7.7.- Evolución en 90 días del pH para los puntos de muestreo de entrada y salida de la probeta.

Tabla 7.2.- Análisis estadístico realizado para la variación de pH durante 90 días para los puntos de muestreo: entrada y salida de la probeta.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Punto de muestreo (Entrada-Salida)	1	265.964	265.964	518.65	0.0000

Como indica la tabla 7.2 existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el comportamiento entre el pH de entrada y el pH de salida. El único elemento entre ambos puntos de muestreo del sistema que pudo influir en esas diferencias fue el relleno, implicando un aumento medio hasta valores próximos a la neutralidad.

Las arcillas poseen carga eléctrica, negativa en la mayoría de los casos (Porta *et al.*, 1999). La existencia de superficies cargadas negativamente exige que haya iones de signo contrario, relacionados con tales superficies, para que se cumpla el principio de

electroneutralidad del sistema. Tales cationes adsorbidos en la superficie, forman complejos que resultan menos estables que los cationes presentes en estructuras internas, por lo que son intercambiables (Sposito, 1989). Este proceso constituye, en las arcillas, la base de sus propiedades de intercambio catiónico. Esta propiedad confiere a los suelos y por consiguiente a las arcillas, presentar variaciones muy lentas en su pH al añadirle un ácido o una base: actúa como un medio tamponado. El comportamiento de un suelo al añadirle un ácido o base suele tener una curva suave, con plataformas a determinados pH, debido a presentar en ellos mayor capacidad tampón. Por lo general, a pH= 7.0 el tamponamiento se debe a presencia de álcalis mientras que entre pH=5.0 y 4.0 se debe a las bases de intercambio (Ulrich and Sumner, 1991). El poder tampón de un suelo frente a un ácido o base aumenta con el contenido de arcilla y con el de materia orgánica (Porta *et al.*, 1999).

El ensayo se continuó durante 160 días para comprobar en estas circunstancias si el relleno dejaba de influir en el pH de salida del sistema, obteniéndose los siguientes resultados.

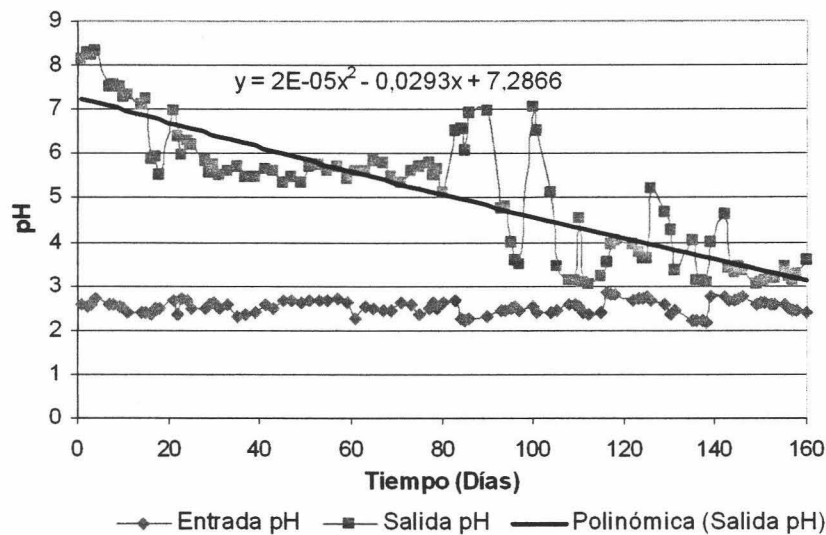


Figura 7.8.- Evolución en 160 días del pH para los puntos de muestreo de entrada y salida de la probeta.

Tabla 7.3.- Análisis estadístico realizado para la variación de pH durante 160 días para los puntos de muestreo: entrada y salida de la probeta.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Punto de muestreo (Entrada-Salida)	1	228.265	228.265	166.98	0.0000

Como se pone de manifiesto en la figura 7.8 el pH de salida tendió en el tiempo a igualarse con el pH de entrada siguiendo un ajuste polinómico ($r^2 = 0.741$) de segundo grado, por agotamiento del poder regulador del relleno. Como refleja el análisis estadístico sigue existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de pH de entrada y salida del sistema para el total del ensayo. Como se observa en la figura 7.8 el árido se comporta como un suelo, suavizando los descensos del pH del medio e incluso se puede determinar una plataforma de pH muy acusada a pH 5 y 3, posiblemente al presentar una mayor capacidad tampón por medio de los procesos de intercambio catiónico (Ulrich and Sumner, 1991). La primera fase de la regulación, pH elevados, ha podido deberse, por la composición de las arcillas, a los silicatos que también contribuyen a la alcalinidad del medio (Porta *et al.*, 1999).

La figura 7.9 refleja para los días muestreados (días 80,83, 84, y 85 con pH de salida 5.10, 6.52, 6.57, 6.04 respectivamente y un pH de entrada próximo a 2.5) las distintas concentraciones de cationes en el influente y efluente. Como se puede observar en la misma figura, no se detectó concentración de ninguno de los cationes muestreados a la entrada, debido a que se trató de agua destilada. En cambio, a la salida si se observó concentraciones de Sodio (68.1 ± 14.6 mg/l), Manganeseo (17.5 ± 3.2 mg/l), Potasio (1.71 ± 0.3 mg/l), principalmente, y diferentes metales pesados como Zinc (3.64 ± 0.1 μ g/l), Níquel (3.5 ± 0.5 μ g/l) y cobre (1.08 ± 0.3 μ g/l). El cromo, plomo, cadmio no se detectaron con los métodos analíticos manejados. Los metales pesados liberados se recogen en la normativa con fuertes limitaciones de vertido, pero que en este caso las concentraciones se encontraron por debajo de las exigidas en la legislación aplicable sobre vertidos al litoral. La liberación de sodio, manganeseo y potasio principalmente indica el efecto de

intercambio catiónico entre el árido y el medio líquido con alta concentraciones de hidrogeniones.

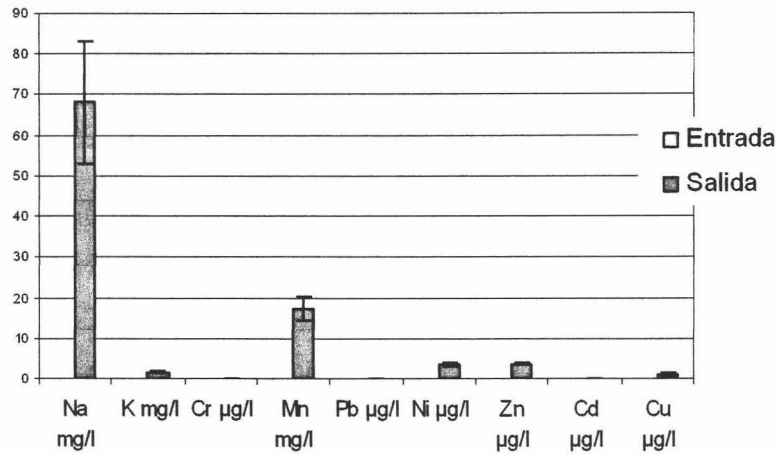


Figura 7.9.- Concentración de distintos cationes en el agua de entrada y salida tras pasar por el árido contenido en la pobreta.

Este ensayo implicó, en principio, no disponer de un dispositivo de álcalis para ajustar el pH en el proceso de nitrificación-desnitrificación que se pretende conseguir para el tratamiento del efluente industrial en cuestión, de ahí que no este reflejado en el esquema inicial de la planta de lechos inundados

Por otro lado, la agregación de cobre por parte de este al medio acuoso como se puede reflejar en la figura 7.9 tendría un aspecto negativo inicialmente por las limitaciones en el vertido. Ahora bien, el cobre esta reconocido como un nutriente esencial durante la nitrificación (Sharma and Ahlert, 1977). Aunque el cobre contenido en las enzimas es abundante en la cadena transportadora de electrones para ambas oxidaciones de amonio y nitrito (Jones, 1982), la adición de cobre implica una respuesta rápida por parte de la enzima amonio mono-oxigenasa favoreciendo la nitrificación. Barber (1999) así lo corrobora en su trabajo al adicionar cobre al efluente a los 91 días de funcionamiento, provocando una rápida y positiva respuesta en la nitrificación, sugiriendo que el sistema estaba limitado anteriormente a la adición por el cobre. La eliminación de amonio se vio incrementada en un 65% en tan solo una semana, de

manera que dicha liberación de cobre podría tener algún aspecto positivo en tratamientos del influente a tratar.

Por línea general los sistemas de tratamiento basados en procesos de nitrificación, desnitrificación o nitrificación-desnitrificación deben disponer de dispositivos con distintas sustancias para regular esas variaciones de pH (Metcalf and Eddy, 1995) producida por la actividad nitrificante y desnitrificante. En la actualidad son muchos los trabajos que han utilizado compuestos naturales con capacidad tamponante: tiza, kaolinita y otras rocas de carbonato cálcico (Green *et al.*, 2000; Campos *et al.* 2002; Green *et al.*, 2002) para la nitrificación o otras sustancias para la desnitrificación como: limonita (Liu and Koenig, 2002) o cápsulas artificiales cuyo contenido en el interior era KH_2PO_4 sensible al pH (Rust *et al.*, 2002), siendo necesario acoplar a los sistemas distintos dispositivos que permitan añadir y disolver dichas sustancias en el medio acuoso. El coste de obra y de explotación y mantenimiento de tales sistemas encarece el tratamiento. De manera que la utilización de este árido puede ser una posible alternativa a los problemas de variación de pH generados en los tratamientos de eliminación de nitrógeno mediante procesos de nitrificación-desnitrificación. Además puede suponer un ahorro inmediato de costes de primera inversión al eliminar elementos del sistema destinados a la regulación del pH así como un ahorro en los costes de explotación y mantenimiento al no tener que añadir o adicionar sustancias reguladoras de pH al proceso.

Por otro lado, el relleno que se utilizó como soporte de la biopelícula fue un material arcilloso, concretamente material de ladrillo procedente del rechazo por roturas por deficiente manipulación en fabricación o colocación en obras de construcción. Este material está catalogado como residuo (CER 170103) por la legislación europea y española, de manera que su utilización en esta investigación buscó abrir nuevas perspectivas o vías de valorización para dicho material. Hay que indicar que la composición química del ladrillo, así como su posible capacidad de regulación de pH depende de la procedencia de la arcilla y su composición mineralógica, y por tanto tendrán comportamientos diferentes. Por otro lado es importante el carácter estructural del residuo cerámico para la función de soporte de biopelícula, que va a venir dado principalmente por su correcto grado de cocción (Moreno, 2001).

El ensayo se realizó utilizando agua destilada, caracterizada por su baja concentración de sales, de manera que pudo influir en la capacidad de intercambio catiónico. El tratamiento del influente se realizaría sobre un agua con una alta concentración catiónica como es el agua de mar, consecuentemente implicará corroborar estos resultados con el seguimiento del pH en el tratamiento del agua residual industrial objeto de estudio.

7.2.2.2.- Capacidad de formación de la biopelícula con el propio influente.

Una vez construida la planta de lechos sumergidos según referencias del propio grupo de investigación y el ensayo de la capacidad reguladora del ácido sobre el pH de medio acuoso, se hizo necesario la formación de la biopelícula que se debía encargar de eliminar los elementos contaminantes contenidos en el efluente industrial a tratar.

Con la propia mezcla entre el efluente de DSM Deretil S.A. y el agua de mar (dilución 1/30), una vez ajustada el pH, se realizó una incubación en un agitador orbital a 30°C para obtener crecimiento de microorganismos autóctonos de la mezcla y así inocular la planta y formar la biopelícula del sistema. Estos microorganismos poseerían unas características idóneas, a saber, aclimatados no solo al influente sino además a las condiciones salinas del medio (Andreadakis *et al.*, 1997; Glass and Silvertsein, 1999), obteniéndose así una selección de la microbiota de forma natural que fuese capaz de tratar el influente.

Como se puede apreciar en la figura 7.10, donde se representa el crecimiento microbiano (recuentos en T.S.A. y turbidez a 640nm) con respecto al tiempo, se obtuvo un crecimiento de tipo exponencial, dando inicialmente cierta garantía de que esta densidad de microorganismos formaría la biopelícula que se fijase al material de relleno del lecho inundado.

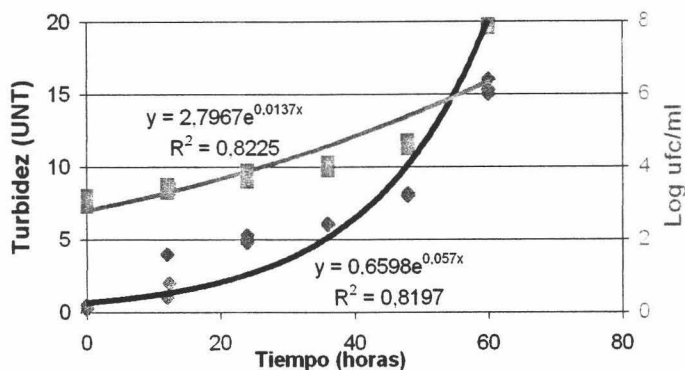


Figura 7.10.- Crecimiento bacteriano en la mezcla del efluente con agua de mar.

Estos resultados previos permitieron acometer la formación de la biopelícula en la planta prototipo de lechos inundados a escala de laboratorio y depuración del efluente, sin necesidad de realizar una inoculación previa del sistema empleando un inoculante específico con mayor o menor éxito de inoculación.

Teruel (2001) investigó el tratamiento del agua residual industrial de DSM Deretil mediante fangos activos. Para la puesta en marcha de la planta y así la formación del fango responsable de la descontaminación del efluente se utilizó una adaptación, principalmente, de los fangos activos procedentes de la planta de Geleen (Países Bajos) perteneciente a la misma empresa que había conseguido desarrollar un sistema de tratamiento que era capaz de tratar unas aguas residuales industriales con características similares a las de DSM Deretil, con la diferencia de contener una concentración de fenol muy inferior (100 mg/l) y un contenido en cloruros inferior a los 5 g/l, también muy inferior a las de DSM Deretil (25 ± 3 g/l). Las dificultades que encontraron, fueron por un lado el volumen de fangos líquidos que desde los Países Bajos se debían transportar y que suponía una gran logística, y la aclimatación de dicho fango a las diferencias de salinidad y concentración de fenol. El trabajo se concluyó con la demostración de que era posible adaptar una comunidad microbiana de fangos activos de un sistema de tratamiento de aguas residuales industriales si se cumplía con la condición de que la aclimatación debía de realizarse con respecto a los cloruros de forma lineal con un umbral de viabilidad del proceso en cuanto a la tasas de los cloruros de 2 g de Cl/l día.

El éxito de este ensayo permitía una inoculación a todas luces más viable desde el punto de vista de ahorro de transporte de fangos procedentes de otros lugares y afrontar el tratamiento de las aguas residuales industriales de DSM Deretil con las garantías de una biopelícula formada con la microbiota ya aclimatada que reduciría el tiempo de puesta en marcha de la planta y así del tratamiento de dicha aguas, de manera que los lechos sumergidos pudieran conformarse como una alternativa más económica que otros tratamientos, tales como los tratamientos físico-químicos ó como los procesos de fangos activos.

Las condiciones de trabajo para acometer la formación de la biopelícula en la planta prototipo de lechos inundados a escala de laboratorio y depuración del efluente fueron: 5 l/día de caudal de entrada, 100% de recirculación interna y una aireación de proceso de 12 m³/m² hora que proporcionó unas concentraciones de oxígeno disuelto entre 5-6 mgO₂/l. Condiciones que permitieron un tiempo de retención hidráulico de 54 horas que favoreciera la fijación de la microbiota, y una recirculación que devolviera y aumentase la densidad de microorganismos en el fluido y mejorara dicha fijación al soporte (Gómez *et al.*, 1999)

Fue por tanto de esperar, que en estos sistemas la formación de la biopelícula se obtuviera tan solo con el paso del influente a través del material soporte. Como se puede apreciar en la figura 7.11, donde se representa el peso de la biopelícula (mg/g relleno) con respecto al tiempo de funcionamiento para los cuatro puntos de muestreo. La fijación de la microbiota sobre el árido se consiguió a partir de las 24 horas sin existir diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los distintos puntos muestreados manteniéndose en el tiempo estudiado. En los procesos de biopelícula fija sobre soportes, la fijación de la microbiota y su formación en la superficie del soporte son de los factores más importantes, ya que estos afectan a los ratios de crecimiento y a la dificultad de desprenderse del sistema (Iwai and Kitao, 1994), en definitiva a los rendimientos de eliminación de cualquier contaminante.

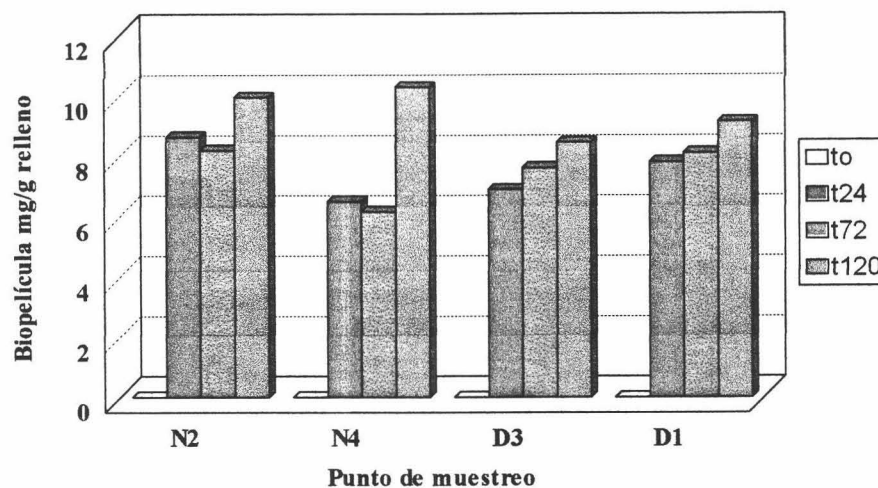


Figura 7.11.- Crecimiento de la biopelícula tras el paso del influente a tratar en varios puntos de la columna.

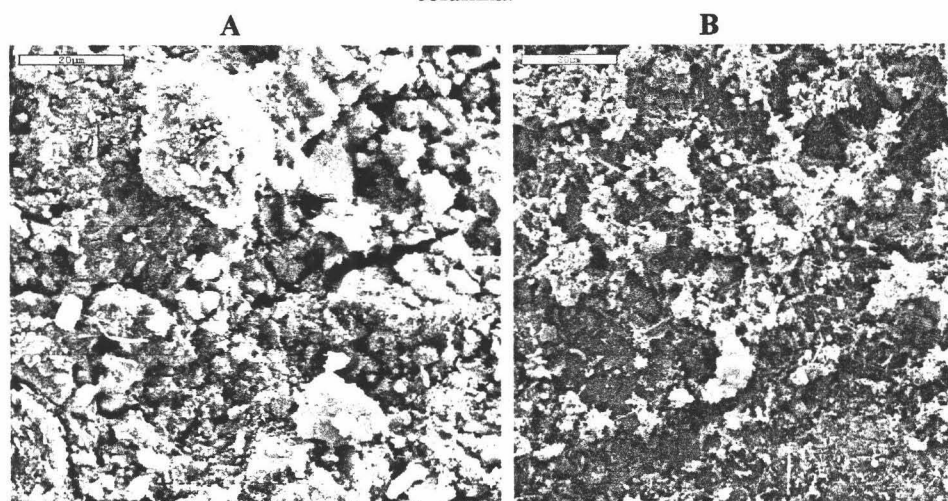


Figura 7.12.- Microscopía electrónica de barrido de superficie: (A) Superficie del árido antes de pasar el influente, (B) Fijación y crecimiento de la biopelícula a las 72 horas.

La figura 7.12 corrobora la fijación de la microbiota en el material soporte. La foto A muestra como en la superficie del árido antes de iniciar la inoculación no hay presencia de biopelículas, mientras en la imagen B realizada a las 72 horas del comienzo de la inoculación ya aparece microbiota fija al árido.

Paralelo al control del crecimiento de la biopelícula, se estudió la variación tanto de la actividad desnitrificante como de la actividad nitrificante I y II en los mismos

puntos de muestreo del sistema. Los datos obtenidos se muestran en las figuras 7.13, 7.14, 7.15.

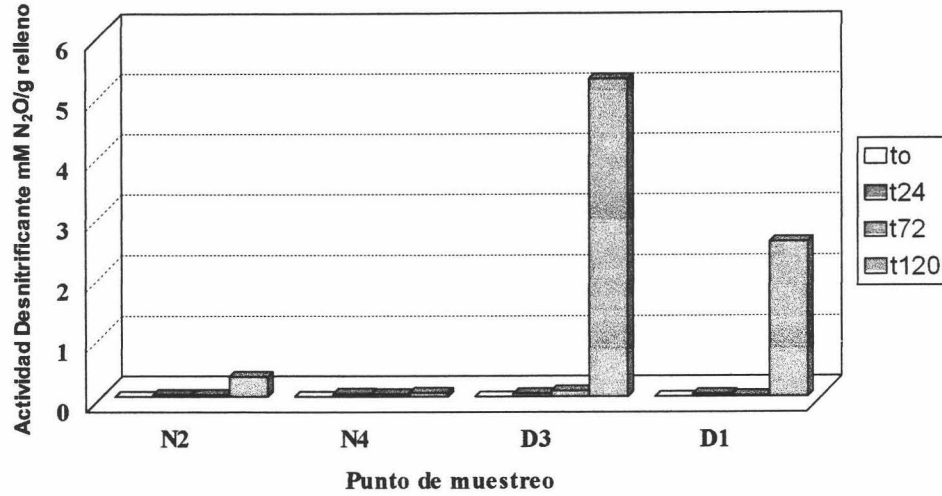


Figura 7.13.- Actividad desnitrificante manifestada por la biopelícula en función del tiempo y para diferentes puntos de muestreo.

Se puede apreciar como la actividad desnitrificante se manifestó a lo largo de la columna anóxica a partir de las 120 horas de funcionamiento de forma muy significativa, y no antes

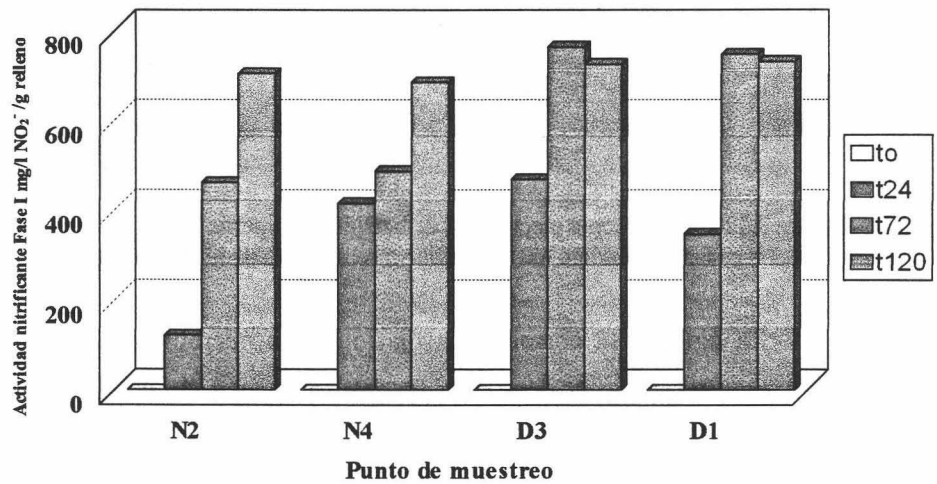


Figura 7.14.- Actividad nitrificante I manifestada por la biopelícula en función del tiempo y para diferentes puntos de muestreo.

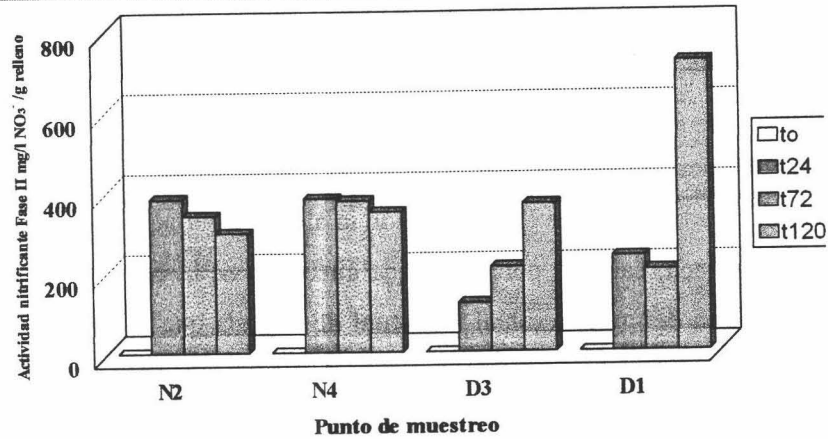


Figura 7.15.- Actividad nitrificante II manifestada por la biopelícula en función del tiempo y para diferentes puntos de muestreo

A diferencia de lo sucedido con la actividad desnitrificante, tanto la actividad nitrificante I y II, manifestada por la biopelícula se apreció para todos los puntos de muestreo, independientemente de que la columna fuese aireada o no.

Al contrario de lo que cabía pensar, dado el más lento crecimiento de los microorganismos nitrificantes con respecto a los desnitrificantes (Rittman and McCarty, 2001), se manifestó actividad nitrificante en todo el volumen del lecho inundado no siendo necesariamente más significativa en la columna aireada. Esta actividad justifica la presencia de oxígeno disuelto en todo el sistema, el cual se aportó en la columna aireada por difusión del mismo alcanzando concentraciones entre 5.0 y 6.0 mgO₂/l con un caudal de aire ya indicado.

Al realizar un seguimiento del oxígeno disuelto en la columna anóxica se observa que este se mantiene en concentraciones semejantes a la columna aireada, siendo su procedencia la recirculación (100 %) del efluente y del agua de mar utilizada para la dilución del agua residual industrial, tal como se puede apreciar en la tabla 7.4.

Tabla 7.4.- Concentraciones medias de oxígeno disuelto en diferentes zonas de la planta prototipo experimental.

Columna Óxica	Columna Anóxica	Efluente Recirculado	Agua de mar	A. Residual Industrial
5.5 mgO ₂ /l	4.4 mgO ₂ /l	5.5 mgO ₂ /l	6.8 mgO ₂ /l	0.3 mgO ₂ /l

La situación, fue pues, un doble problema responsable de las altas concentraciones de oxígeno en la columna anóxica, la cual motivó la importante presencia de microorganismos nitrificantes, tal como muestra la actividad nitrificante I como la actividad nitrificante II. Por un lado la alta concentración de oxígeno disuelto en el agua recirculada, causada por la elevada aireación en la columna aireada y por otro lado la agitación del agua residual industrial de entrada que incrementaba la presencia oxígeno disuelto en éste, y además del oxígeno disuelto propio del agua de mar utilizada para la dilución del influente fueron los responsables de la alta oxigenación en la columna anóxica, que sin duda dificultó la eliminación de nitrato vía desnitrificación (Punzava *et al.*, 2001), independientemente de la existencia de microorganismos desnitrificantes en cantidad adecuada.

La no existencia de actividad desnitrificante significativa hasta las 120 horas no fue en principio respuesta a la presencia de oxígeno, pues gran parte de los desnitrificantes descritos son aeróbicos (Prescott *et al.*, 1999; Atlas and Bartha, 1998; Peyton *et al.*, 2001). La explicación a este fenómeno se puede encontrar en el efecto de la salinidad tal como describen Andreakis *et al.*, (1997), los cuales concluyen que los procesos de nitrificación se ven menos afectados por la salinidad que los desnitrificantes.

Como reflejan las figuras 14 y 15 la actividad nitrificante II fue menor en el tiempo que la nitrificante I, a saber, sin donador de electrones NO_2^- , proporcionados por la nitrificante I las bacterias nitrificantes II no pueden manifestar su actividad. En los procesos de nitrificación, tanto los responsables de la nitrificación I como de la nitrificación II se ven afectados por la presencia del cloruro sódico (Nowak *et al.*, 1994), siendo los primeros los más afectados (Vredendregt *et al.*, 1997). Autores como Schenk y Hergemann (1995) encontraron que la oxidación de nitritos es más sensible a alta concentración salina que la oxidación del amonio. Rosa *et al.*, (1998) investigaron el desarrollo de biopelícula y los parámetros de proceso de la nitrificación de un agua sintética con una concentración en NaCl del 50% mediante filtros sumergidos aireados, observándose que a los 10 días de la puesta en marcha del sistema se formó una biopelícula con una actividad estable.

7.2.2.3.- Funcionamiento de la planta prototipo de lechos inundados.

Una vez el sistema inoculado, para controlar y confirmar la homogeneización de las cargas contaminantes se realizó un seguimiento analítico en el punto de muestreo D1 obteniéndose los siguientes resultados:

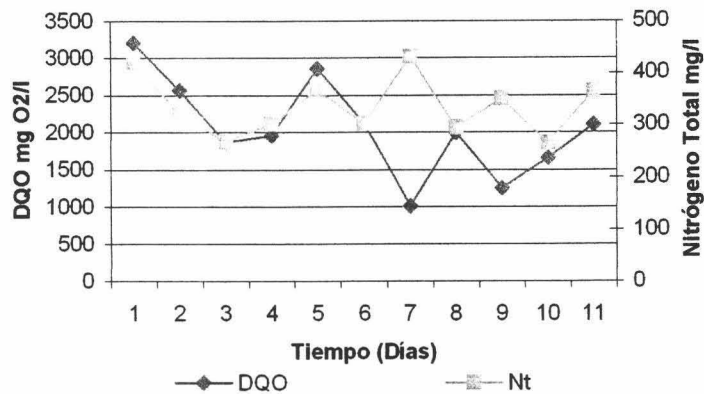


Figura 7.16.- Seguimiento de las concentraciones de la DQO y nitrógeno total en la zona de mezcla (D1)

Como se puede observar en la figura 7.16 la variabilidad del influente y así de las cargas contaminantes fueron muy importantes con una desviación estándar para la DQO próximo a 650 mg O₂/l para una media de 2050 mg O₂/l. La desviación estándar para el nitrógeno total fue de 70 mg/l para una media de 340 mg/l. Esto se debió a la mala homogeneización de la mezcla, causada por la bomba dosificadora que introducía el efluente de DERETIL.

Con los primeros lavados de la planta se apreciaron diversos problemas en el funcionamiento del lecho sumergido, los cuales obligaron a modificar algunos aspectos físicos de la planta: problemas de homogeneización del agua de mar con el agua residual industrial e incorrecto sistema de lavado.

7.2.3.- Conclusiones.

En vista de los resultados obtenidos se puede apreciar que el prototipo de planta de lechos inundados a escala de laboratorio contó con una mala distribución de oxígeno y caudales, los cuales dificultaron el correcto desarrollo del proceso y a lo que hay que

unirle la influencia de un sistema de lavado con diversas carencias. Todo esto llevó a una 2ª Fase con variaciones en el prototipo. A pesar de esto de la primera fase se puede concluir que:

1. El relleno posee propiedades con capacidad de regular el pH del medio líquido en el que se encuentre inundado, permitiendo descartar en un principio el uso de álcalis para la regulación del pH del sistema propuesto para la eliminación de nitrógeno del influente a tratar.
2. La capacidad reguladora del árido utilizado como soporte de la biopelícula en el lecho inundado para un agua con un pH medio de 2.6, se puede valorar en un volumen de agua regulada de 141.5 veces el volumen de relleno, implicando que esta garantía de comportamiento obliga a una renovación del soporte a los 3 meses.
3. La inoculación del sistema se puede realizar con la propia microbita existente en los distintos efluentes, agua de mar y efluente de DERETIL, consiguiéndose su fijación en el material soporte y actividad tanto nitrificante como desnitrificante en los lechos inundados.

7.3.- 2ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

7.3.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio.

Para favorecer el correcto trabajo del proceso y puesta a punto de la planta, y una vez analizados los problemas ya mencionados anteriormente, se realizaron una serie de modificaciones que se resumen a continuación:

- ❖ **Entrada del efluente.** Como se ha comentado se produjo una mala homogeneización de la mezcla entre el agua de mar y el agua residual industrial, de manera que se modificó el sistema pasándose a preparar la mezcla en un depósito único de entrada para dosificarla a caudal constante desde este a la

columna anóxica. El depósito contó con un agitador para evitar la sedimentación de los sólidos del influente, manteniendo la mezcla homogénea. El giro del rotor fue lento, de 80 r.p.m. evitando una oxigenación del influente, lo que dificultaría el proceso de desnitrificación en la columna anóxica.

Esta mezcla se preparó de forma diaria, para evitar el inicio de los procesos biológicos de depuración en el depósito de entrada, lo cual volvería a alterar nuevamente las cargas contaminantes de entrada.

- ❖ **Variaciones en el sistema de lavado.** Con el sistema trabajando bajo las condiciones de inoculación comenzó a formarse una gran cantidad de biomasa en la zona baja de la columna de nitrificación. Esto dificultó el paso del agua de proceso así como la de lavado, la cual discurría a lo largo de la otra columna. El mal lavado de esta zona, por falta de fuerza del agua de lavado capaz de arrastrar la biopelícula, dió lugar a una colmatación continua del filtro, produciendo pérdidas de carga importantes. Por otro lado y debido al atasco en la zona baja de nitrificación, se realizaba un lavado excesivo de la columna anóxica, y no así de la columna óxica. Se pasó de lavar cada 10 días a lavar aproximadamente cada 2 o 3 días.

Para evitar el problema, se colocaron difusores de aire en la parte baja de las dos columnas (A), empleándolo para introducir aire de lavado en la columna anóxica mientras que para la columna aireada sirvió tanto para introducir aire de lavado como aire de proceso. Igualmente se colocaron entradas de agua de lavado (B), una en cada columna, de modo que se pudiera aportar agua y aire de lavado de forma individual a cada cilindro. Para evitar que el agua pase mediante vasos comunicantes de una a otra columna, se colocó una llave

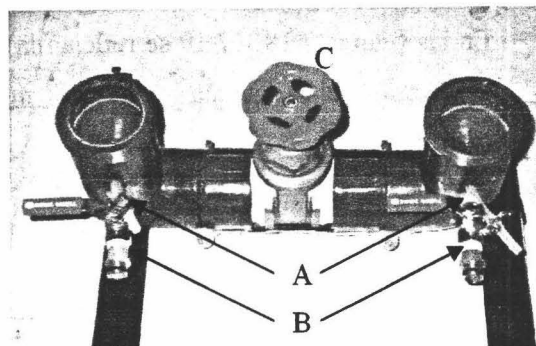


Figura 7.17.- Nueva conexión de las columnas y sistema de lavado

de paso (C) que cerraba el sistema y permitía lavar de forma individual las columnas (figura 7.17). De esa manera no se perdía la fuerza de presión para desprender y arrastrar la biopelícula.

Otra de las variaciones fueron las pautas de lavado. Estas pautas se variaron para que fuese más efectivo consistente en:

- Aporte de aire de lavado durante 1 minuto. Se conseguía así romper la obstrucción del biofiltro y desprender la biopelícula más débil.
- Aporte de aire de lavado y agua de lavado durante 2 minutos. Para conseguir arrastrar el exceso de biopelícula sin elevar el relleno de forma considerable.
- Aporte de agua de lavado durante 1 minuto, para sacar la biopelícula arrastrada fuera del biofiltro.

Tras las modificaciones realizadas, principalmente en la presentación del influente y en el sistema de lavado se comenzó a estudiar la influencia de la recirculación interna manteniendo constante la variable carga hidráulica, siempre con el objetivo de eliminar el nitrógeno presente en el influente a la vez disminuir la concentración a niveles normativos de DQO y fenol. En las figuras 7.18 y 7.19 se reflejan la nueva planta así como el esquema con las modificaciones realizadas.

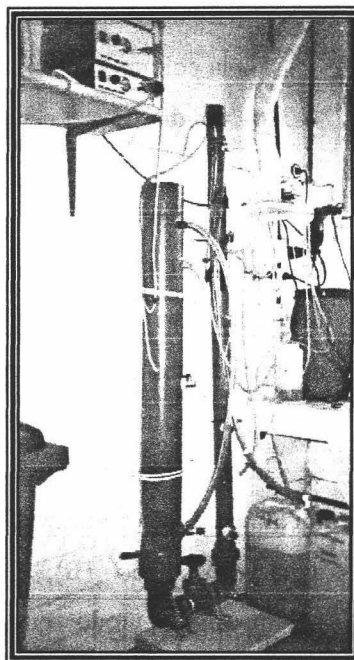


Figura 7.18:- Aspecto de la planta utilizada en la fase II de la investigación tras las modificaciones realizadas.

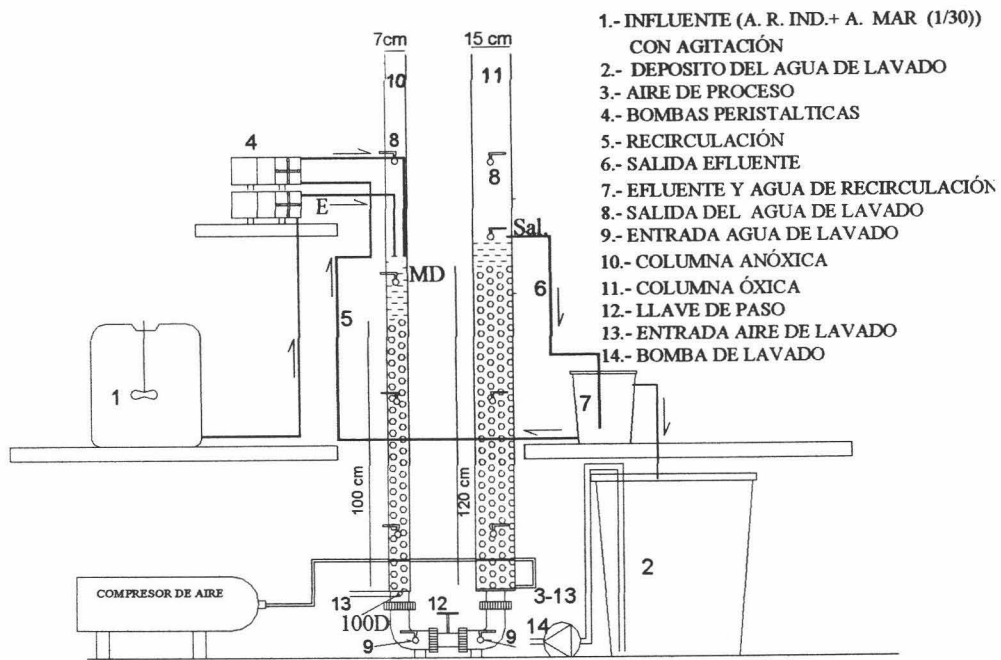


Figura 7.19.- Esquema de funcionamiento de la planta utilizada en la fase 2ª de la investigación.

Los puntos de muestreo elegidos (figura 7.19) para analizar los parámetros indicados y así estudiar la influencia de las variables sobre el sistema fueron:

1. La entrada del influente representada por el punto de muestreo E.
2. De la columna anóxica los puntos MD y 100 D representando la zona de mezcla entre el influente y agua de recirculación interna y la salida de la columna anóxica (control del proceso de desnitrificación y entrada a la columna aireada) respectivamente.
3. De la columna aireada los puntos SAL representando la salida del sistema agua utilizada en la recirculación interna del sistema de lechos sumergidos.

La toma de muestras para la segunda fase se realizó aproximadamente a la misma hora, entre 9 y 10 de la mañana durante el funcionamiento del sistema en esta fase.

7.3.2. Variables y parámetros.

Las variables del sistema fueron:

Carga hidráulica referida a la superficie de la columna anóxica, cargas volúmicas y tiempo de retención hidráulico en función del volumen de ambas columnas, caudal de aire de proceso que quedaron fijas y recirculación interna que varió para valores de 100, 200, 250 y 300%. Con estas variables se inició el estudio de adaptabilidad de los lechos inundados para el tratamiento del influente industrial.

Los parámetros a los cuales se les hizo un seguimiento fueron:

Sobre el influente de entrada (E), entendiéndose como tal la dilución 1/30 entre el efluente de DERETIL S.A. y el agua de mar tras pasar por la bomba peristáltica, se analizaron:

Las concentración en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ así como pH y oxígeno disuelto, que informaron de las cargas contaminantes que el sistema tuvo que soportar, de la homogeneización de la mezcla y referencia para determinar los rendimientos totales de los parámetros analizados.

Sobre el agua residual industrial tras pasar por el lecho no aireado (100D) se analizaron:

La concentración en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ para determinar la participación de la microbiota presente en dicho lecho en la eliminación de éstos parámetros y como indicadores de la transformación en las formas de oxidación del nitrógeno y control del proceso de desnitrificación. Se midieron el pH y el oxígeno disuelto que influyen en el proceso biológico de nitrificación.

Sobre el agua residual industrial tratada (SAL) se analizó:

La concentración en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3 y NH_4^+ para obtener los rendimientos totales del sistema de estos parámetros pues sus vertidos están limitados a zona de litoral por normativa. También se midieron el pH y el oxígeno disuelto para controlarlos en el agua tratada de recirculación que influyen de forma importante en el proceso biológico de desnitrificación. De igual modo se analizó la concentración de NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ como indicadores de la transformación en las formas de oxidación del nitrógeno y así del proceso de nitrificación.

Sobre la zona de mezcla (MD), es decir, zona donde se mezclan el influente y agua de recirculación que coincide con la parte superior de la columna no aireada se analizaron:

Todos los parámetros anteriores, nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3 y NH_4^+ , para conocer las concentraciones y cargas contaminantes reales que debe soportar la columna no aireada y poder determinar los rendimientos en dicho columna y comportamiento de la misma en el sistema.

7.3.3.- Resultados y Discusión.

Las condiciones de trabajo en esta fase fueron: un caudal de entrada de 12 l/día, equivalente a una carga hidráulica de $3.1 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día y una carga contaminante de nitrógeno teórica de $0.4 \text{ kg}/\text{m}^3$ día próxima a valores utilizados en diversas experiencias con lechos sumergidos (Meaney and Strickland, 1994; Boller *et al.*, 1997; Bigot *et al.*, 1998), un tiempo de retención hidráulico próximo a las 21 horas totales, repartidas aproximadamente en 3 horas de retención en la columna anóxica y 18 horas en la columna aireada. Para comenzar a determinar la influencia de la recirculación se empezó a ensayar como inicio de comprobación con los valores: 100%, 200% y 250% respecto al caudal de influente, obteniéndose los siguientes resultados.

Como se observa en la figura 7.20, las variaciones del pH fueron poco significativas para las tres recirculaciones utilizadas, pero existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la variación de pH en la salida del sistema (Tabla 7.5) para las recirculaciones utilizadas, posiblemente debida a la cada vez mayor formación de nitratos y consumo de alcalinidad favorecida por el aumento de tiempo de retención hidráulico que proporciona un incremento de la recirculación interna, produciéndose de esa manera una tendencia a la disminución del pH. En cambio, dicha variación no se produjo de forma instantánea sino regulada y suavizada en el tiempo, pasando de valores medios de pH de 8.0 a 7.4 y 7.0 para las recirculaciones 100, 200 y 250% respectivamente. Esta regulación pudo deberse a tres causas principalmente: al efecto que puede presentar la biopelícula al contener diferentes grupos sulfato ó fosfato u otras sales tampón (Nielsen, 1996), a la presencia en el agua de mar de carbonatos, boratos, fosfatos, silicatos y sulfatos con capacidad tamponante (López, 2002) ó por otro lado la capacidad reguladora de pH que el material soporte utilizado ha demostrado.

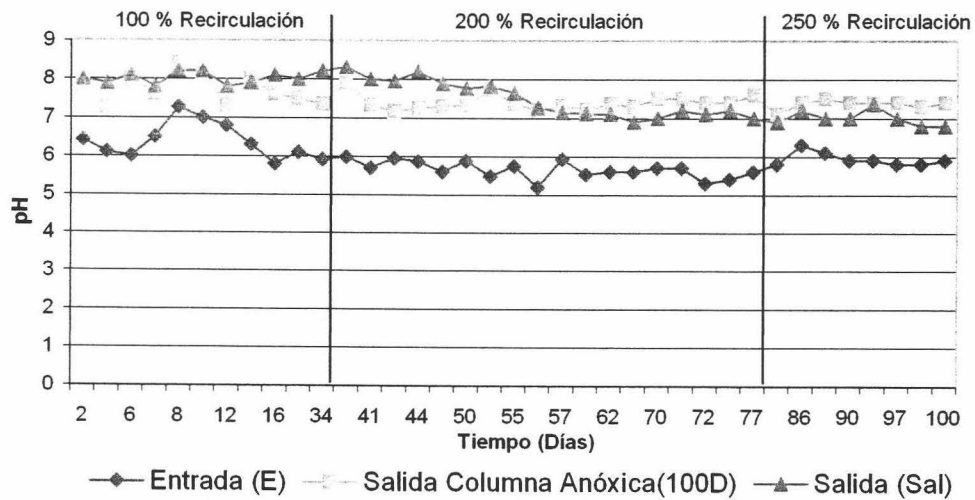
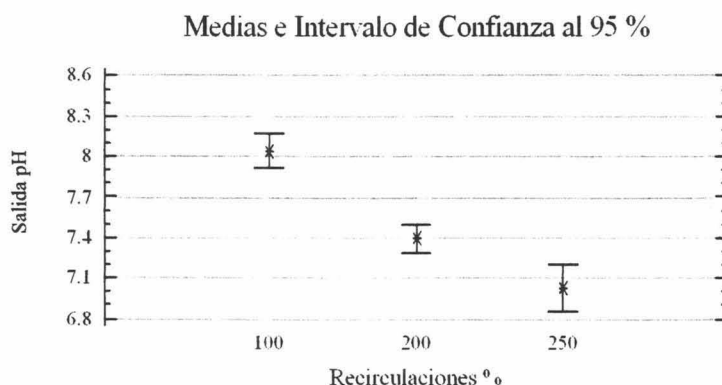


Figura 7.20.- Variación del pH en el sistema de lechos sumergidos para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Tabla 7.5.- Análisis estadístico realizado para la variación de pH de salida para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
pH salida del sistema	2	5.23143	2.61571	25.91	0.0000



Los valores medios de pH para la columna óxica como anóxica se mantuvieron en 7.5 ± 0.2 y 7.5 ± 0.4 respectivamente para el total de los días ensayados no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.5754$). Valores que favorecen tanto la nitrificación como la desnitrificación. Jones (1982) y Painter (1983) estiman que para el proceso de nitrificación el óptimo de pH se encuentra en el rango comprendido entre 7.0 y 8.0 mientras que el pH óptimo para la desnitrificación está próximo a la neutralidad, ligeramente alcalinos (7.0-8.5) aunque el valor varía con la especie (Thomas *et al.*, 1994).

Otro de los parámetros controlados en el proceso fue la concentración de oxígeno disuelto en cada una de las columnas del reactor biológico.

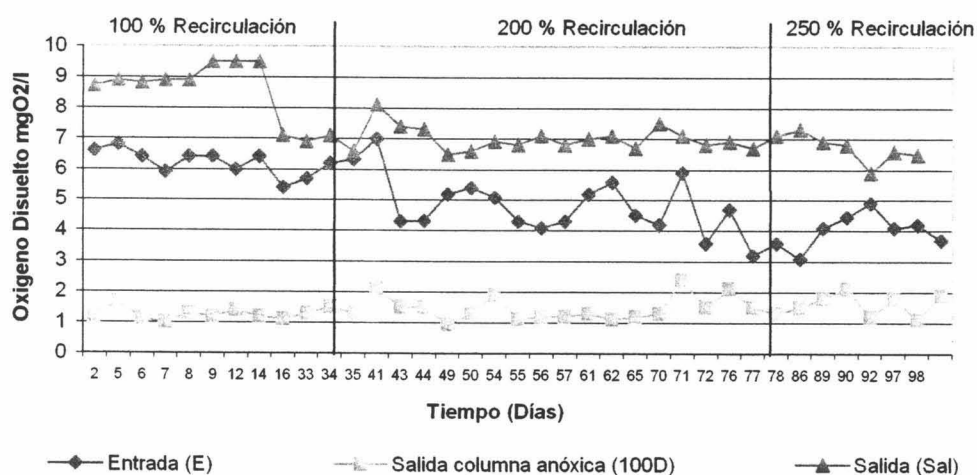


Figura 7.21.- Variación del oxígeno en el sistema de lechos sumergidos para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

El oxígeno disuelto en la entrada fue muy alto con valores medios de 4.8 ± 1.5 mgO_2/l , debido principalmente a la captación de oxígeno en los bombes y por la agitación del influente. Esta circunstancia provocó como se observa en la figura 7.21 una alta concentración de oxígeno en la salida de la zona anóxica con valores medios de 1.5 ± 0.7 mgO_2/l , sin embargo el principal aporte de oxígeno a la columna anóxica procedió del aporte de agua recirculada, cuyos valores medios fueron de 7.4 ± 1.0 mgO_2/l . Estas concentraciones de oxígeno disuelto dificultaron la eliminación de nitrógeno, vía desnitrificación (Thauer *et al.*, 1977; Davies, 1989; Braun and Zumft, 1992, etc), por lo que el rendimiento del proceso no fue del todo satisfactorio. Si se observa la figura 7.21 el oxígeno disuelto es consumido en gran parte en columna anóxica, con toda probabilidad por la oxidación de la DQO (figura 7.23). La posterior inyección de aire a través de la columna aireada volvió a incrementar la concentración de oxígeno disuelto permitiendo el proceso de nitrificación como refleja la figura 7.25.

La alta concentración de oxígeno disuelto en el agua recirculada se vió favorecida por la posición que el tubo de recogida de esta agua tenía en la columna aireada. Su posición justo en el límite superior de la lámina de agua, allí donde las burbujas de aire de proceso “rompían”. Se observó que esta circunstancia provocaba la entrada de aire en el conducto destinado a transportar el agua de recirculación, y de esta manera provocó un mayor aporte de oxígeno a la columna anóxica.

La figura 7.22 muestra los valores de concentración de nitrógeno total en los distintos puntos de muestreo así como los rendimientos para las recirculaciones ensayadas.

La concentración media de entrada de nitrógeno se situó en 260.0 ± 33.6 mg/l , manteniendo una relación $\text{DQO}/\text{N}_{\text{total}}$ de 6.2 ± 0.3 , valor aceptable para eliminar nitrógeno mediante procesos de nitrificación-desnitrificación. Tseng *et al.*, (1997) obtuvieron la desnitrificación casi completa a partir de relaciones entre la $\text{DQO}/\text{N}_{\text{total}}$ superiores a 5.3 utilizando como sistema el tratamiento de fangos activos. Para otros autores (Rogalla and Bourbigot, 1990; Chiu *et al.*, 1996) la relación mínima requerida para una desnitrificación

efectiva en procesos de biofiltros anóxica-óxica está entre 5 y 6. Otros autores como Punzaba *et al.*, (2001), consideran que la desnitrificación mediante procesos simultáneos de nitrificación-desnitrificación en biofiltros es mas dependiente de la concentración oxígeno disuelto que de la relación C/N.

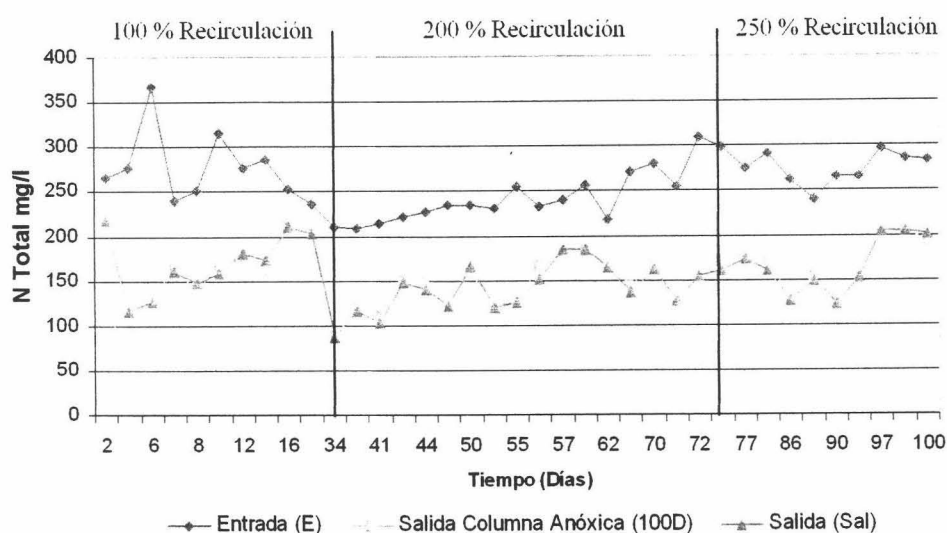


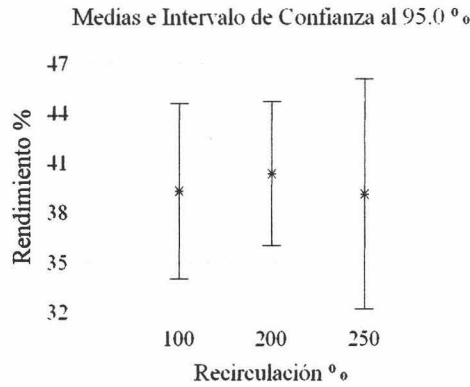
Figura 7.22.- Variación del nitrógeno total en el sistema de lechos sumergidos para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Como muestra la tabla 7.6, los rendimientos de eliminación de nitrógeno fueron semejantes no existiendo diferencias estadísticamente significativas para las recirculaciones ensayadas, oscilando en torno al 40%, valor muy por debajo de los rendimientos esperados. Los valores alcanzados en el agua de salida siempre superaron los 100 mg/l. Estos bajos rendimientos pudieron ser atribuidos por un lado a la alta oxigenación existente en la columna anóxica causada por la elevada concentración de oxígeno disuelto en la recirculación e influente y que afectó considerablemente a la desnitrificación. De todos es bien conocido que la mayoría de las bacterias desnitrificantes en presencia de oxígeno prefieren recurrir a este aceptor de electrones en lugar de nitrato como aceptor último. Distintos trabajos realizados (Wild *et al.*, 1995; Kornaros and Lyberatos, 1998; Oh and Silverstein, 1999, etc) demuestran una disminución en los ratios de desnitrificación incluso a muy bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Esencialmente en estos trabajos todas las etapas de la desnitrificación se vieron afectadas incluso a diferentes extensiones.

Investigación de Choque

Tabla 7.6.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en nitrógeno total del sistema para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Rendimiento Nitrógeno Total	2	11.8741	5.93704	0.04	0.9639



La figura 7.23 muestra los valores de D.Q.O. a lo largo del lecho inundado, reflejando que la eliminación principal de la materia reductora se produjo en el lecho anóxico con diferencias estadísticamente significativa (Tabla 7.7) con relación a la columna aireada, con valores medios de reducción del 42% y 19% respectivamente con respecto a la concentración en la zona de mezcla. Esa mayor reducción de la DQO en la columna anóxica se vio favorecida por las altas concentraciones de oxígeno disuelto. En contrapartida este oxígeno disuelto influyó negativamente en el proceso de eliminación de nitrógeno por desnitrificación.

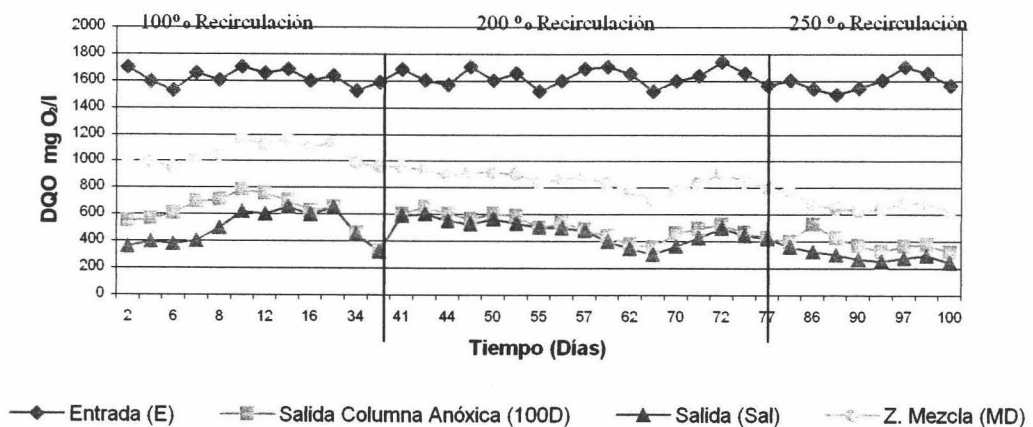


Figura.7.23.- Variación de la DQO en el sistema de lechos sumergidos para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Tabla 7.7.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en DQO en las columnas anóxica y óxica para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rendimiento para ambas columnas del sistema	DQO 1	9018.88	9018.18	13.83	0.0004

El análisis estadístico (Tabla 7.8) refleja que las recirculaciones ensayadas influyen estadísticamente en el rendimiento en eliminación de la DQO del sistema, ajustándose perfectamente ($r^2=0.999$) a un comportamiento polinomial (Figura 7.24). Mayores recirculaciones internas suponen aumentar la eliminación de la DQO del influente tratado, debido al aumento del tiempo de contacto del contaminante con la biopelícula.

Tabla 7.8.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en DQO del sistema para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rendimiento DQO	2	786.229	293.115	12.02	0.0001

Medias e Intervalo de Confianza al 95%

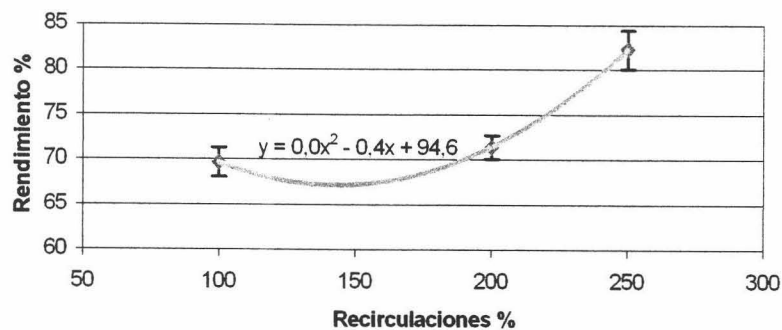


Figura 7.24.- Ajuste del rendimiento de la DQO en relación a las recirculaciones ensayadas.

Investigación de Choque

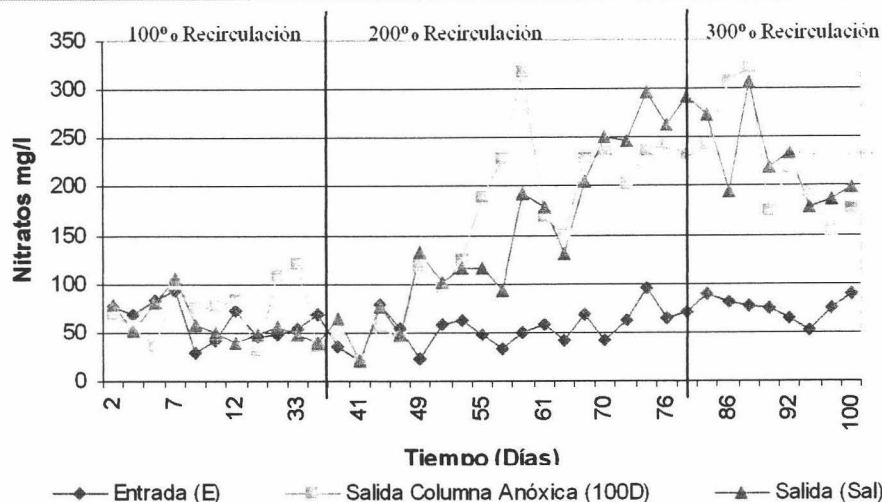


Figura. 7.25.- Variación del nitrato en el sistema de lechos sumergidos para las recirculaciones ensayadas: 100, 200 y 250%.

La baja concentración de DQO en la entrada de la columna aireada, concentración que fue disminuyendo de forma inversa a la concentración de nitrato a la salida de la columna aireada, y la alta concentración de oxígeno disuelto pudo favorecer el proceso de la nitrificación: la formación de nitrato en la columna aireada superó la concentración media de 200 mg/l como se refleja en la figura 7.25. Como se puede observar en el Test de mínimas diferencias significativas (Figura 7.26), el aumento de la recirculación favoreció la formación de nitrato en la columna aireada con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las recirculaciones ensayadas. La concentración de nitrato formado se mantuvo e incluso aumentó a la salida de la columna no aireada corroborando los resultados anteriores que indicaron la baja actividad desnitrificante en dicha columna y la alta concentración de oxígeno disuelto.

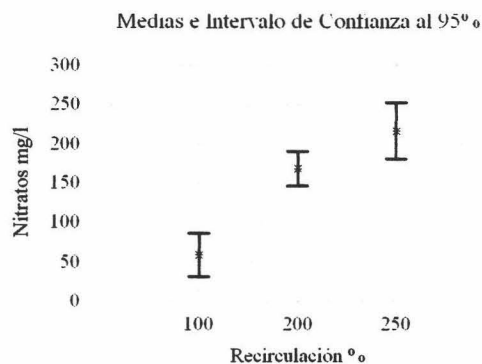


Figura 7.26.- Test de mínimas diferencias significativas para la formación de nitratos en la columna aireada con relación a las recirculaciones ensayadas.

Para comprobar la hipótesis repetida de que los bajos rendimientos en la eliminación de nitrógeno del sistema pudieron ser atribuidos a la alta oxigenación, y con el fin de minimizar dicha oxigenación principalmente en la columna no aireada, se realizaron diferentes cambios en el sistema de agitación para homogeneizar la entrada del influente y en la recirculación interna del filtro sumergido, que consistieron en:

1. Se colocó la toma de agua de la recirculación a 5cm del nivel de salida de la columna aireada para impedir, como ya se ha comentado, la entrada de aire al “romper la burbuja” justo en la posición del tubo de toma de agua de recirculación. El agua se pasó directamente a recircularla sin pasar por ningún depósito. Con esta medida se impidió también introducir aire y así aumentar el oxígeno disuelto en el conducto del agua de recirculación.
2. Se pasó de la agitación mediante hélice, que daba lugar a valores de oxígeno disuelto de 4.8 ± 1.4 mg O₂/l. a una agitación mediante un bombeo interno que mantenía el agua sin aportar oxígeno disuelto.

Hay que indicar en este punto de la investigación que las características del efluente suministrado por la empresa DSM Deretil sufrieron variaciones de concentraciones debido a los cambios que se produjeron en los procesos de la planta de Villaricos. En esta parte de la fase y con el nuevo efluente de Deretil la concentración media de los valores de entrada del influente fueron: 3800 ± 500 mg O₂/l para la DQO, 360 ± 30 mg/l de N_{Total} y 840 ± 140 mg/l de fenol. Estas concentraciones más elevadas permitieron observar el comportamiento del sistema frente aumentos de cargas contaminantes.

Una vez realizadas la pertinentes modificaciones, se comenzó a trabajar aumentando el caudal de recirculación del agua de salida hasta 300% para observar mejor las diferencias estadísticas y seguir estudiando la influencia de la variable recirculación interna sobre el sistema. Los análisis estadísticos comparativos se harán con referencia a la recirculación 250%

Como refleja la figura 7.27 las modificaciones realizadas a la planta permitió disminuir la concentración media oxígeno disuelto del agua de recirculación de 7.4 ± 1.0 mgO_2/l a 4.6 ± 0.2 mgO_2/l , la concentración media de oxígeno disuelto del influente se redujo de 4.8 ± 0.2 mgO_2/l a 2.5 ± 0.3 mgO_2/l , consiguiéndose de esta manera pasar a una concentración media final en la salida de la columna anóxica de 1.5 ± 0.7 mgO_2/l a 0.2 ± 0.05 mgO_2/l .

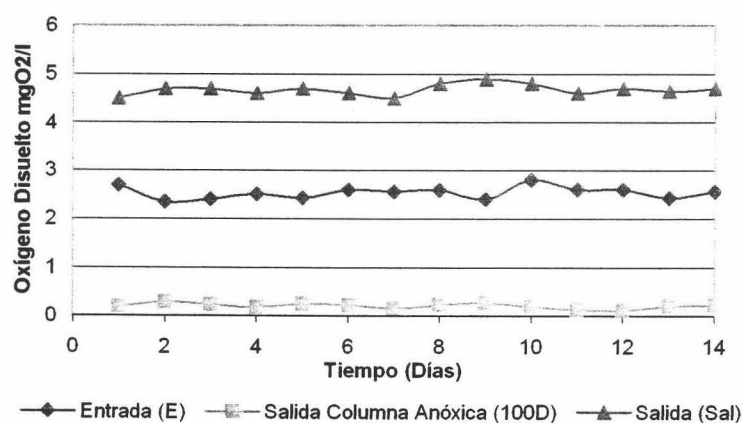


Figura 7.27.- Variación del oxígeno disuelto en el lecho inundado para la recirculación de 300%.

Con estas reducciones de concentración de oxígeno a lo largo de la columna se obtuvieron los siguientes resultados:

El rendimiento medio de eliminación obtenido para la DQO fue del 86.4%, con un valor medio de salida 519 ± 167 mgO_2/l . Este porcentaje fue superior al obtenido en los ensayos anteriores, sin embargo la concentración media en el agua tratada fue superior pudiendo ser atribuido principalmente al incremento en la carga contaminante, que para este ensayo fue superior al doble de la ensayada con el anterior efluente.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7.9) en el comportamiento en eliminación de DQO para la columna anóxica y óxica, con rendimientos del 29 ± 9.6 y 44 ± 8.7 respectivamente. Esto supuso una concentración media de salida de la columna anóxica de 990 ± 220 mgO_2/l (figura 7.28).

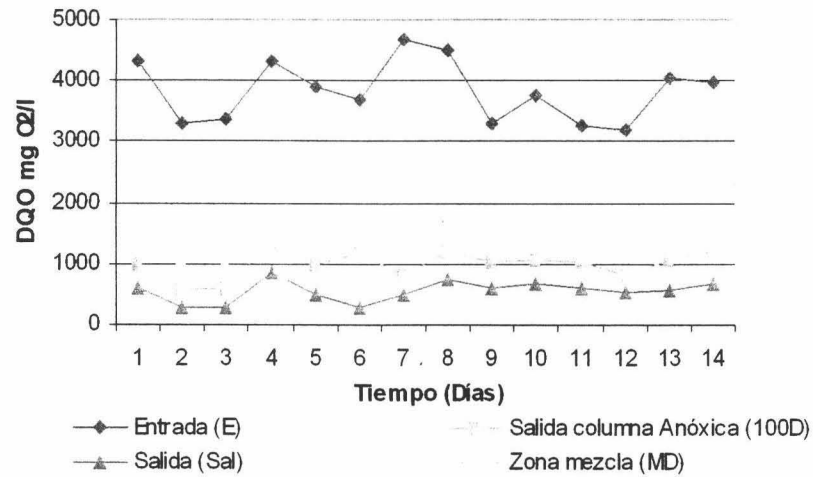


Figura 7.28.- Variación de la DQO en el lecho sumergido para la recirculación ensayada de 300%.

Consecuencia de este comportamiento fue una alta concentración de DQO en la columna aireada que *dificultó el proceso de nitrificación*, como se puede apreciar en la figura 7.30, una considerable concentración media de amonio de 110 mg/l. Altas concentraciones de DQO afectan potencialmente a la nitrificación, al estimular el crecimiento heterótrofo de las bacterias las cuales compiten con las bacterias nitrificantes quimilitotróficas por sus substratos básicos, amonio y oxígeno (Sharma and Ahlert, 1977). Hanaki *et al.*, (1989) investigando la nitrificación en fangos activos observaron una *disminución moderada en la nitrificación para concentraciones de DQO entre 160 y 500 mgO₂/l.* encontrando para concentraciones superiores a 1000 mgO₂/l de DQO una *paralización de la nitrificación casi completa.*

Tabla 7.9.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en DQO con respecto las columna anóxica y óxica para la recirculaciones de 300%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.L	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. DQO	1	1966.37	1966.37	23.24	0.0000

Hay que indicar que la alta concentración de DQO a la entrada de la columna aireada unido a la presencia de oxígeno favoreció en la parte inferior de dicha columna un

fuerte atasco producido por un crecimiento considerable de la biopelícula, que dificultó los flujos de agua en el sistema. La incorporación de agua y aire de forma individualizada en el sistema de lavado y las pautas de lavado consiguieron mejoras considerables: reducir y romper la oclusión de la biopelícula en la zona inferior de la columna aireada y aumentar los ciclos de lavado que pasaron de 2-3 días a 4-5 días. La utilización conjunta de aire de lavado y agua tratada, puede reducir en un 20 % aproximadamente el consumo de agua con relación al lavado sólo con agua (Metcalf and Eddy, 1995).

La figura 7.29 muestra los rendimientos en eliminación de nitrógeno total, los cuales alcanzaron un valor medio del 51.2%, registrándose en la salida valores medios de 176 ± 28 mg/l (165 ± 27 mg/l de NO_3^- , 53 ± 37 mg/l de NO_2^- , 109 ± 19 mg/l de NH_4^+). Este rendimiento superó al obtenido en fases anteriores, sin embargo la concentración en el agua tratada fue superior, consecuencia del aumento de concentraciones en el nuevo influente.

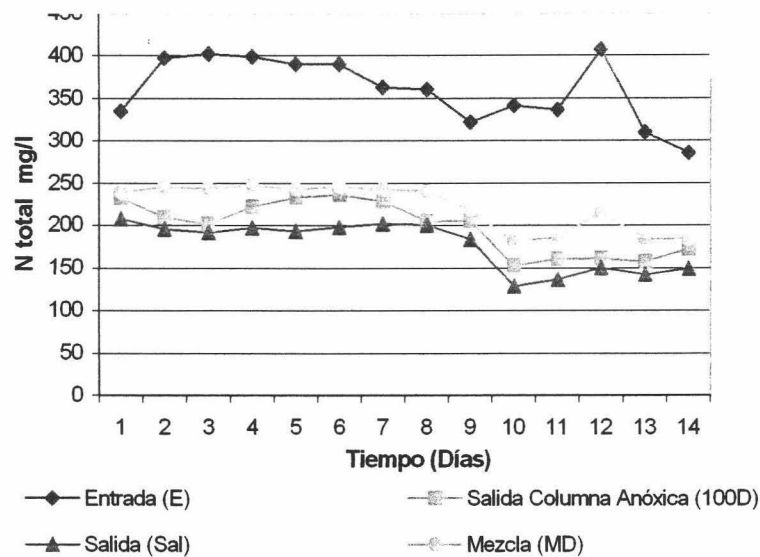


Figura 7.29.- Variación del nitrógeno total en el lecho sumergido para la recirculación ensayada de 300%.

Tabla 7.10.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en nitrógeno total del sistema para las recirculaciones ensayadas: 250 y 300%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. Nitrógeno Total	1	624.857	624.857	8.85	0.0078

En este ensayo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el rendimiento en nitrógeno total del sistema para las recirculaciones ensayadas: 250 y 300%, mejorándose el rendimiento conforme se aumentó el caudal de recirculación (Tabla 7.10). La mejora en la oxigenación del sistema y principalmente en la columna anóxica y el aumento en la recirculación permitieron esta diferencia significativa. Se puede considerar que un incremento en el tiempo de retención en la columna anóxica mejora los rendimientos en eliminación de nitrógeno. Ahora bien, como refleja la tabla 7.11, no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la eliminación de nitrógeno para las columna anóxica y óxica, lo que indicó que dicha reducción en nitrógeno se debió principalmente a la vía asimilativa, e indudablemente en la columna aireada.

Tabla 7.11.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en nitrógeno total con respecto a las columnas del sistema para la recirculación de 300%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. Nitrógeno Total	1	0.657472	0.657472	0.02	0.8864

Los resultados obtenidos en la figura 7.30 mostraron como en la columna anóxica todo el nitrito desaparecía mientras la concentración de nitratos a la salida de la columna siguió siendo elevada pudiendo ser atribuido este hecho a la presencia de oxígeno disuelto a lo largo de la columna. Mientras en la columna aireada la concentración de nitritos aumentó significativamente pudiendo indicar una nitrificación incompleta afectada por la entrada excesiva de DQO. Igualmente se observa en la misma figura que la concentración de amonio en la salida del sistema siguió siendo elevada con valores medios de 110 mg/l

muy por encima del cumplimiento de la legislación, mostrando también una nitrificación parcial.

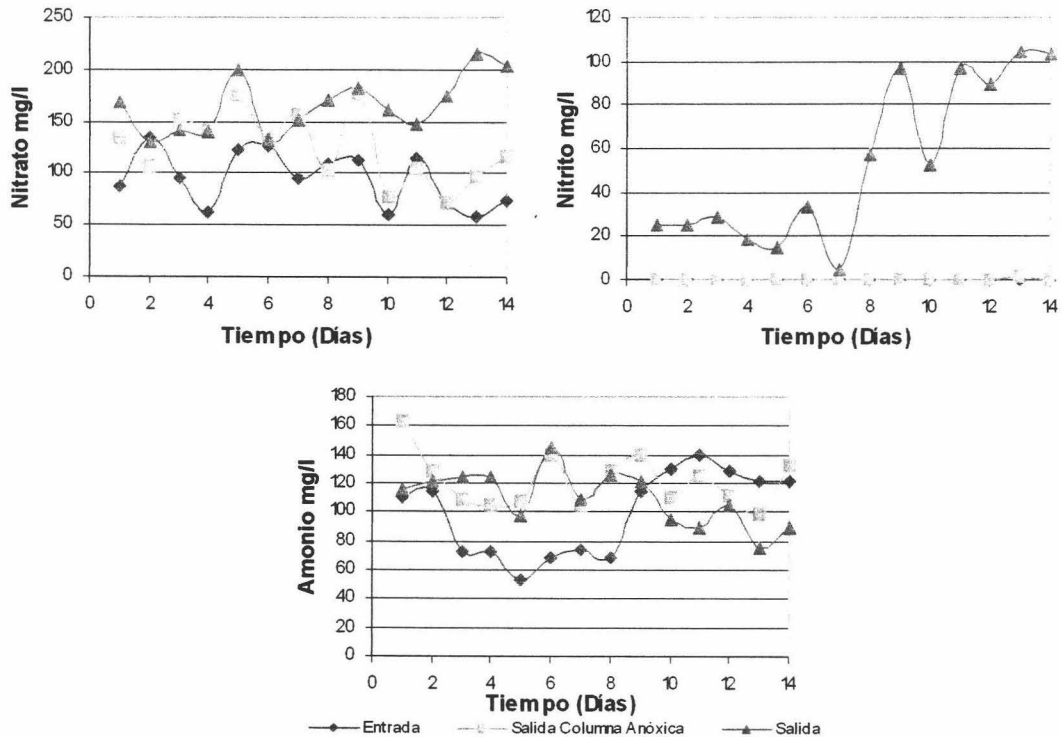


Figura 7.30.- Variación del nitrato, nitrito y amonio en el lecho sumergido para la recirculación ensayada de 300%.

Como muestra la figura 7.31, los compuestos fenólicos presentes en el influente mostraron una concentración media de entrada de 837 ± 137 mg/l descendiendo a su salida hasta 120 ± 50 mg/l., suponiendo unos rendimientos globales del 85% aproximadamente. En este caso, fue la columna anóxica donde se apreció el mejor rendimiento en eliminación de estos compuestos con diferencias estadísticamente significativas con respecto a la columna aireada (Tabla 7.12), lográndose descender hasta una concentración media de 129 ± 63 mg/l, con un rendimiento medio del 46%, minimizando así su efecto tóxico en la nitrificación. Los valores de salida siguieron siendo elevados si lo comparamos con los límites recogidos en la normativa vigente.

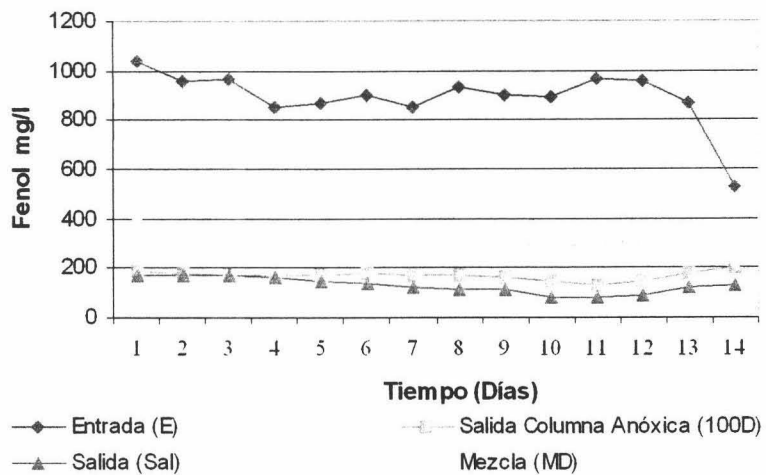


Figura 7.31- Variación de la concentración de fenol y rendimientos en el lecho inundado para la recirculación ensayada de 300%.

Tabla 7.12.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en fenol con respecto a las columnas del sistema para la recirculación de 300%.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. Nitrógeno Total	1	3477.92	3477.92	20.32	0.0001

7.3.4.- Conclusiones.

En esta segunda fase las conclusiones previas obtenidas son las siguientes:

1. Las recirculaciones ensayadas influyeron en la eliminación de DQO y nitrógeno total del sistema, de forma proporcional; un aumento en la recirculación implica mejorar los rendimientos del sistema en la reducción de dichos parámetros.
2. Con el nuevo efluente de Deretil las concentraciones tanto en DQO como en nitratos siguieron siendo elevadas a la salida de la columna anóxica.

3. La concentración de fenol, DQO, amonio y nitrato en la salida del sistema seguían siendo elevadas para lo que se podía esperar teóricamente, siendo necesario mejorar el proceso y el sistema.

7.4.- 3ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO.

Con el fin de comprobar la hipótesis del bajo tiempo de retención hidráulico en la columna anóxica que afectó tanto al rendimiento del sistema en la eliminación de DQO como de nitrógeno se cambió la estructura de esta columna, inicialmente igualando el diámetro con el de la columna aireada para conseguir mayor volumen y consecuentemente para un mismo caudal un aumento en el tiempo de retención hidráulico y disminución de la carga hidráulica. Además se modificó el material constructivo de ambas columnas, empleando metacrilato en lugar de PVC. Esto permitió ver el interior de las columnas pudiendo observar el crecimiento de la biopelícula. De esta manera se consiguió una relación entre el volumen de la columna anóxica y aireada de 0.8, superior a lo especificado por Hernández (1997) para procesos de nitrificación-desnitrificación en fangos activos. Con estas consideraciones se inició una 3ª fase de la investigación de choque.

7.4.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio.

A la vez que se consideró el aumento de volumen de la columna anóxica se planteó la posibilidad de seguir reduciendo el oxígeno disuelto procedente del agua de recirculación y favorecer así la desnitrificación. Para reducir el oxígeno disuelto puede utilizarse sustancias químicas como sulfito sódico, hidracina, tanato sódico. El más utilizado es el sulfito sódico, necesiándose 7.88 gramos por gramo de oxígeno disuelto (Degremont, 1979). Para la escala en la que se trabajó la investigación en esta fase, supondría adicionar una cantidad tan pequeña de sulfito que implicaría problemas técnicos que dificultaría el manejo del sistema, sin olvidar con vistas a mayores escalas de planta un mayor coste de explotación.

Otra posibilidad que se consideró fue aumentar la altura del relleno en la columna, consiguiéndose de esta manera poner parte del lecho en contacto con el oxígeno disuelto para que sea consumido por los microorganismos y por la oxidación de parte de la materia reductora existente en el influente, quedando el resto del lecho en condiciones anóxicas que favorecen la desnitrificación. Condiciones estas que pueden favorecer el proceso de desnitrificación en dicha columna conforme a Lie y Welander (1994) que consideran que se obtiene una desnitrificación completa en ausencia de oxígeno disuelto. Esta alternativa introduce menos variables al conjunto del manejo del sistema con respecto a la anterior iniciativa. Si supondría inicialmente un aumento en los costes de primera inversión.

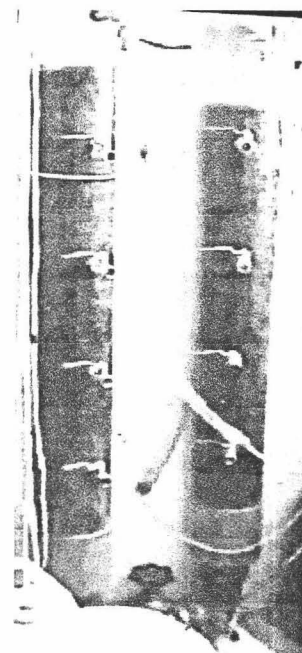


Figura 7.32.- Aspecto de las nuevas columnas fabricadas en metacrilato.

De esta manera la modificación estructural de la planta y más concretamente de la columna anóxica consistió en aumentar la altura de relleno a 1.2 metros y el diámetro interno a 15 cm, es decir, una columna idéntica a la columna aireada, de esa misma manera todos los equipos, piezas, etc son idénticas con el consiguiente ahorro y flexibilidad de funcionamiento. Con esta nueva configuración y teniendo en cuenta que el aumento de altura sería una prolongación de la fase nitrificante (presencia de oxígeno y formas nitrogenadas reducidas) el volumen dedicado a la nitrificación representaría el 60% y el 40% para la desnitrificación. Esta misma relación entre nitrificación y desnitrificación fue ensayada por Grum *et al.*, (1999) en sistemas de biofiltros. La figura 7.32 refleja el nuevo aspecto de las columnas y sistema. Todo el sistema se ajustó al esquema de la figura 7.33.

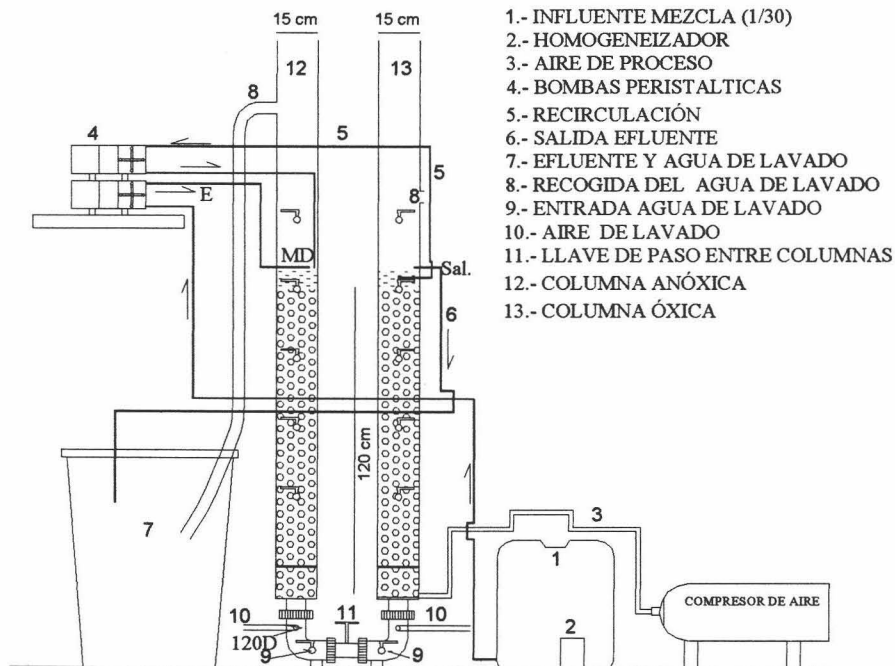


Figura 7.33.- Esquema de la planta a escala de laboratorio tras las modificaciones de utilizada en la fase 3.

Se siguieron tomando las muestras de los mismos puntos y con las mismas frecuencias. Bajo este contexto se comprobó con relación a la fase anterior el comportamiento del sistema a variaciones de carga hidráulica y tiempo de retención.

7.4.2. Variables y parámetros.

Las variables que se fijaron y controlaron en el sistema fueron:

Carga hidráulica referida a la superficie de la columna anóxica, cargas volúmicas y tiempo de retención hidráulico teniendo en cuenta el volumen de ambas columnas, caudal de aire de proceso y caudal de recirculación. Con estas variables se comprobó si un aumento en el tiempo de retención hidráulico aumenta de forma significativa los rendimientos totales de los parámetros ensayados del sistema utilizado para el tratamiento del influente industrial.

Los parámetros a los cuales se les hizo un seguimiento fueron:

Sobre el influente de entrada (E), entendiéndose como tal la dilución 1/30 entre el efluente de DERETIL S.A. y el agua de mar tras pasar por la bomba peristáltica, se analizaron:

Las concentración en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ así como pH y oxígeno disuelto, que informaron de las cargas contaminantes que el sistema tuvo que soportar, de la homogeneización de la mezcla y referencia para determinar los rendimientos totales de los parámetros analizados.

Sobre el agua residual industrial tras pasar por el lecho no aireado (120D) se analizaron:

La concentración en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ para determinar la participación de la microbiota presente en dicho lecho en la eliminación de estos parámetros y como indicadores de la transformación en las formas de oxidación del nitrógeno y control del proceso de desnitrificación. Se midieron el pH y oxígeno disuelto que influyen en el proceso biológico de nitrificación.

Sobre el agua residual industrial tratada (SAL) se analizó:

Las concentraciones en nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ para obtener los rendimientos totales del sistema de éstos parámetros y comprobar el grado de cumplimiento normativo. También se midieron el pH y oxígeno disuelto para controlarlos en el agua tratada de recirculación que influyen de forma importante en el proceso biológico de desnitrificación.

Sobre la zona mezcla (MD), es decir, zona donde se mezclan el influente y agua de recirculación que coincide con la parte superior de la columna no aireada se analizaron:

Todos los parámetros anteriores, nitrógeno total, DQO, fenol, NO_3 y NH_4^+ , para conocer las concentraciones y cargas contaminantes reales que soportó la columna anóxica y poder determinar los rendimientos en dicho columna.

7.4.3.- Resultados y Discusión.

Las condiciones de trabajo para esta fase fueron las siguientes: un caudal de entrada de 12 l/día (Carga hidráulica = $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{día}$), carga contaminante de nitrógeno de $0.2 \text{ Kg}/\text{m}^3\text{día}$, tiempo de retención hidráulico de aproximadamente 36 horas divididas en 18 horas para cada columna, y se mantuvo la recirculación interna en 300 % así como las concentraciones de los distintos parámetros.

Con las modificaciones realizadas en la planta y principalmente sobre la columna anóxica, aumento de la altura y volumen, con objeto de favorecer las condiciones anóxicas y consecuentemente la desnitrificación, se muestreo en función de la altura la concentración de oxígeno disuelto. Se observó que a partir de los primeros 25 cm de la columna anóxica la concentración de oxígeno disuelto fue de $0.1 \pm 0.05 \text{ mgO}_2/\text{l}$, y bajo estas condiciones se obtuvieron los siguientes resultados.

Los rendimientos en DQO (figura 7.34) sufrieron un incremento estadísticamente significativo (Tabla 7.13) en relación a la fase anterior ($p < 0.05$) incrementándose hasta un valor medio de $90 \pm 1.2\%$ con concentraciones medias de salida de $330 \pm 37 \text{ mg/l}$, valor que se enmarca por debajo de los límites permitidos por la legislación para su vertido en zona litoral andaluza. La eliminación de la DQO se produjo aproximadamente por igual en ambas columnas del sistema, sin existir diferencias significativas y siguiendo un comportamiento similar a la fase anterior. Como se observa en la figura 7.34 la concentración en DQO de salida de la columna anóxica descendió, debido al aumento en el tiempo de retención conseguido por los cambios realizados al sistema, a saber, el aumento de volumen de relleno de dicha columna y disminución de carga hidráulica.

Investigación de Choque

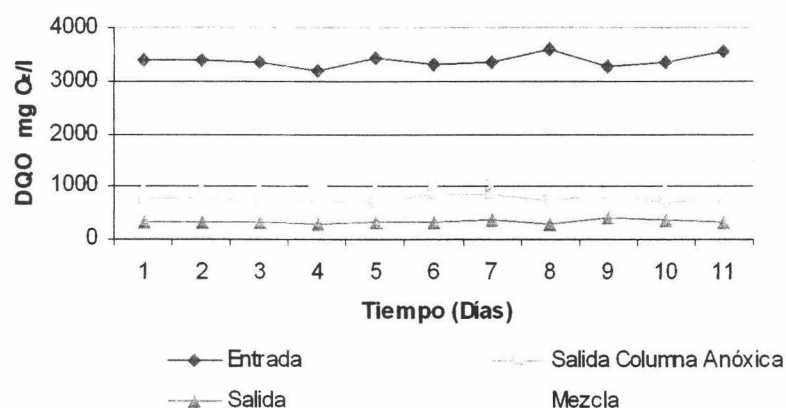


Figura 7.34.- Variación de la DQO en el lecho sumergido para las condiciones de trabajo de la 3ª fase de investigación.

Tabla 7.13.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en DQO del sistema para la recirculación ensayada de 300% en la fase 2ª y 3ª.

Análisis de la Varianza						
Fuente de variación	g.L	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05	
Rendimiento para Fase 2ª y 3ª	DQO 1	124.021	124.021	12.59	0.0017	

El rendimiento en nitrógeno total también se vió favorecido (figura 7.35), alcanzando el 78% con valores medios de salida de 75.9±7 mg/l (211.6 mg/l de NO₃⁻, 4.6 mg/l de NO₂⁻, 20.2 mg/l de NH₄⁺).

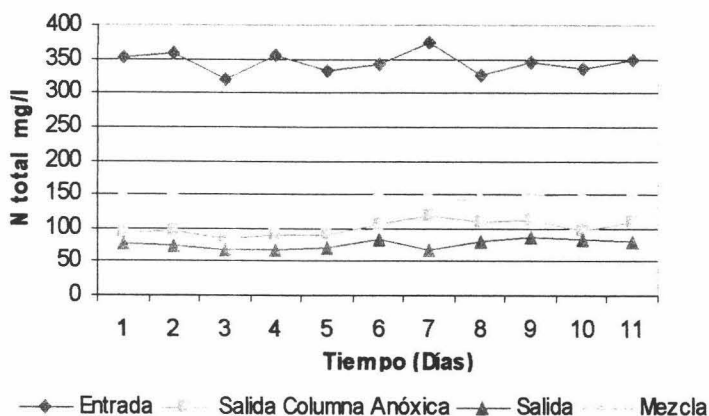


Figura 7.35.- Variación del nitrógeno total en el lecho sumergido para las condiciones de trabajo de la 3ª fase de investigación.

Tabla 7.14.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento del nitrógeno total del sistema para la recirculación ensayada de 300% en la fase 2ª y 3ª.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rendimiento N total para Fase 2ª y 3ª	1	4586.18	4586.18	140.86	0.0000

Como se especifica en la tabla 7.14 existieron diferencias estadísticamente significativas para el rendimiento de nitrógeno total para la fase 2 y 3 para una recirculación del 300%. Es mas, se consiguió un rendimiento global por encima del rendimiento teórico para la eliminación de nitrógeno mediante un proceso de nitrificación-desnitrificación siguiendo un esquema de pre-desnitrificación. Ese elevado rendimiento puede ser atribuido a la asimilación del nitrógeno por parte de la biomasa nueva que debió formarse en el relleno que se añadió para aumentar el volumen de la nueva columna anóxica. Otras posibles causas de estos valores en el rendimiento global de eliminación de nitrógeno puede ser la volatilización del amonio (Liang *et al.*, 2000), la adsorción en la biopelícula debida a la presencia de diferentes grupos polares (Nielsen, 1996) o mediante una nitrificación-desnitrificación simultanea en la columna aireada (Menoud *et al.*, 1999). Ninguna de estas posibles causas se corrobora en estos estudios, asumiendo una eliminación de nitrógeno por procesos diferentes a los establecidos en el sistema propuesto.

Como se puede apreciar en las figuras 7.36, donde se representan las variaciones de las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio, el principal compuesto de nitrógeno analizado presente en el agua tratada fue el nitrato, con concentraciones medias de 211 ± 16 mg/l, mientras que el amonio tuvo valores inferiores a 20 mg/l con unos rendimientos medios de eliminación de amonio del 81%. Rosa *et al.*, (1998) con un tiempo de retención de 15 horas, obtuvieron la eliminación de amonio en un 94% para una agua sintética con una concentración en NaCl del 50% mediante filtros sumergidos aireados.

Investigación de Choque

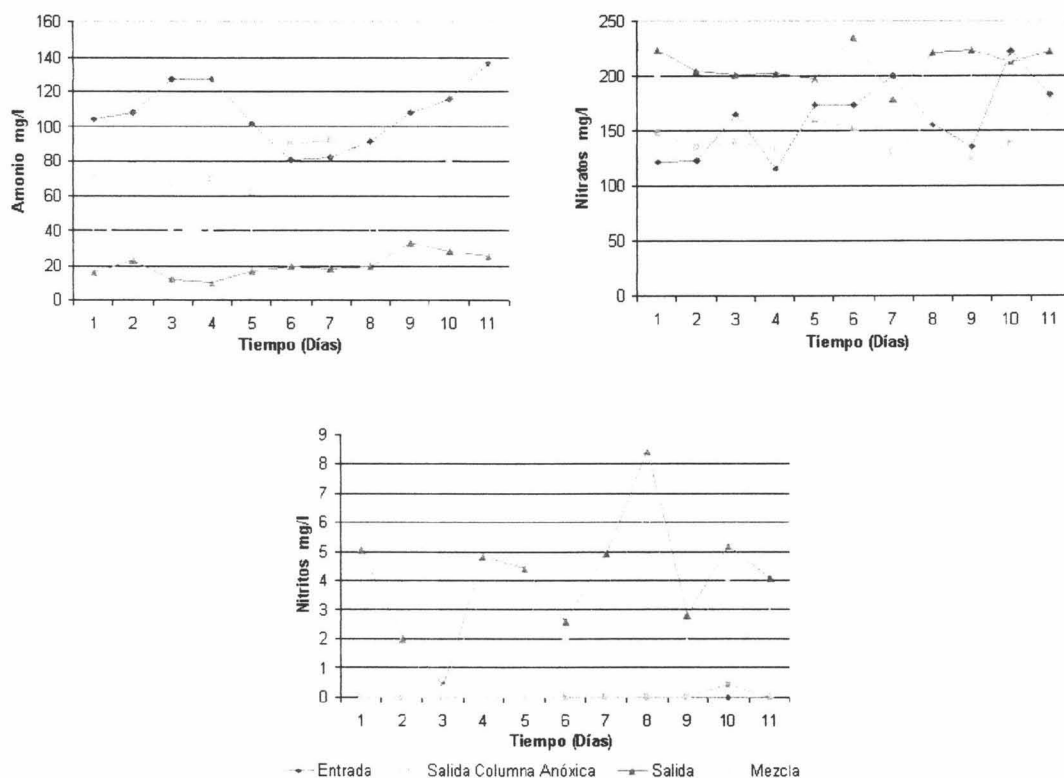


Figura 7.36.- Variación del nitrato, nitrito y amonio en el lecho sumergido para la recirculación ensayada de 300% en la fase 3ª de la investigación.

Las altas concentraciones de nitrato y baja concentración de amonio, acompañado con la escasa presencia de nitrito pusieron de manifiesto una buena fase de amonificación y nitrificación en la columna aireada. En cambio, la concentración de nitrato a la salida de la columna anóxica indicó que la desnitrificación seguía sin ser completa. No obstante cierta concentración de DQO fue detectado en la salida de la columna anóxica, valores medios de $767 \pm 67 \text{ mgO}_2/\text{l}$. Valor éste que pareció ser insuficiente para conseguir una eliminación completa del nitrato procedente de la nitrificación. Se puede atribuir a la presencia de materia reductora de difícil degradación o bien por falta de tiempo de contacto entre la DQO y la microbiota.

Asumiendo que la relación DQO/Fenol es de 2.38, obtenida de forma experimental, indicaría que para la concentración media de fenol en la salida de la columna anóxica que fue de 292 mg/l (figura 7.37) la DQO estimativa es de $694 \text{ mgO}_2/\text{l}$, muy próxima a la DQO de salida de dicha columna. Esto puede corroborar, lo

anteriormente comentado, que parte de la DQO es debida a presencia de polifenoles de difícil degradabilidad, implicando una proporción de DQO que difícilmente aportará materia orgánica necesaria para la desnitrificación.

Con respecto al amonio, éste se incrementó en la fase anóxica indicando la existencia de procesos de amonificación, mientras que en la columna aireada fue ampliamente oxidado (nitrificación), dando lugar a altas concentraciones de nitrato y bajas de nitrito, lo que confirmó un buen proceso nitrificante, ya descrito, a pesar de la considerable concentración de DQO en la columna aireada que pudo afectar a la nitrificación. Se puede volver a plantear la dificultad de oxidación del remanente de DQO que pudo favorecer la actividad de los nitrificantes quimiolitotróficos con respecto a la microbiota heterotrófica (Sharma and Ahlert, 1977).

La concentración de fenol, descendió en este ensayo hasta un 90% (figura 7.37), quedando en la salida 78 ± 12 mg/l de media, con diferencias estadísticamente significativas con relación a la fase anterior, como se indica en la tabla 7.15 justificando la influencia de las variables ensayadas sobre la eliminación de los fenoles del sistema, es decir, una disminución en la carga hidráulica y aumento del tiempo de retención hidráulico favorece la eliminación de los compuestos fenólicos. Esto permitió disminuir a 292 ± 30 mg/l la concentración de fenol aportada a la fase anóxica, en la que apenas se eliminaba, mientras que en la fase óxica sí descendió de forma considerable. Comportamiento éste diferente al ocurrido en la fase anterior. Posiblemente atribuido a las mejoras en la oxigenación del sistema, más concretamente a la disminución de la concentración de oxígeno disuelto conseguida en la columna anóxica.

La degradación de compuestos polifenólicos e hidrocarburos aromáticos presentan mejores rendimientos en condiciones óxicas que si se realizan en condiciones anóxicas (Heider *et al.*, 1999; Widdel, 2001). A pesar de estos buenos rendimientos obtenidos, se precisaba descender aun más el valor de los polifenoles para ajustarlos a las exigencias legislativas.

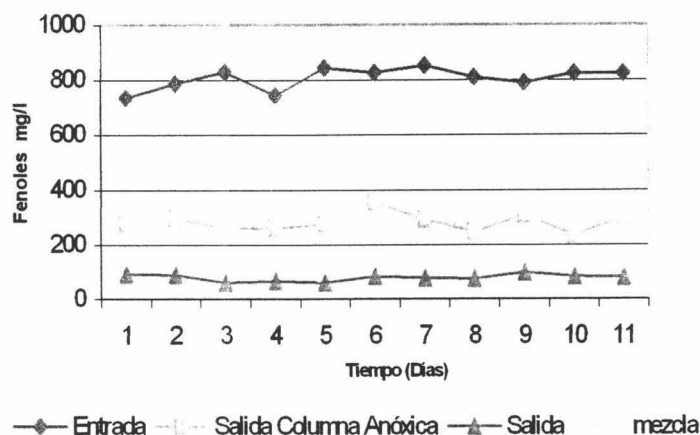


Figura 7.37.- Variación del fenol en el lecho sumergido para la recirculación ensayada de 300% en la fase 3ª de la investigación.

Tabla 7.15.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento del fenol del sistema para la recirculación ensayada de 300% en la fase 2ª y 3ª.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rendimiento en fenol para Fase 2ª y 3ª	1	227.557	227.557	23.64	0.0001

Los lavados en esta fase se realizaron cada 5-6 días. El aumento en días de los ciclos de lavado fue muy considerable con respecto a la anterior fase, esto fue posible gracias a la mejoras en el sistema de lavado y a la disminución de la carga contaminante o carga hidráulica que pasó de 3.1 m³/m² día a 0.7 m³/m² día.

7.4.4.- Conclusiones.

Tras el análisis de los resultados se obtuvieron para esta fase las siguientes conclusiones:

1. La menor carga hidráulica con respecto a la fase anterior y por consiguiente el aumento en el tiempo de retención hidráulico influyó en los rendimientos del sistema conseguido mejorarlos de forma significativa con relación a la anterior fase, sobre todo en eliminación de nitrógeno.

2. De igual modo, bajo estas condiciones se mejoraron de forma significativa los rendimientos medios en eliminación de DQO y compuestos fenólicos.
3. Los procesos de amonificación y nitrificación en la columna aireada fue casi completa; un 5% del nitrógeno total de salida del sistema no se analizó en su estado de oxidación máxima, nitrato. En cambio, en la columna anóxica el proceso de desnitrificación se mejoró con respecto a la fase anterior pero siguió siendo incompleta.
4. La planta y en consecuencia el sistema comenzó a permitir el control de las variables y así influir en los rendimientos del proceso de nitrificación-desnitrificación.

7.5.- 4ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

En esta fase se comprobó como el sistema se vió afectado al cambiar la carga hidráulica por el aumento del caudal hasta 18 l/día, por lo que la carga hidráulica pasó de 0.7 a 1 m³/m² día y por consiguiente la carga contaminante de nitrógeno pasó de 0.2 a 0.3 Kg/m³día. El tiempo de retención hidráulico teórico quedó en 24 horas divididas en 12 horas para cada columna. La planta y sistema no sufrió ningún cambio al igual que la recirculación interna que se mantuvo a 300 % y las concentraciones de los distintos parámetros.

7.5.1.- Descripción de la planta a escala de laboratorio.

Puesto que la planta y sus dispositivos permitieron en la fase anterior el control del proceso llevado a cabo en el sistema obteniéndose rendimientos acordes con lo esperado, en esta fase se utilizó la planta a escala de laboratorio sin modificación alguna a la descrita en el ensayo precedente a esta 4ª fase.

De igual manera los puntos de muestreo y frecuencia de los mismos quedaron fijos con relación a la fase anterior.

7.5.2. Variables y parámetros.

Las variables y parámetros controlados se mantuvieron en relación a la fase 3ª de esta investigación. La única modificación fue la variación de la carga hidráulica pasando de 0.7 a 1 m³/m² día.

7.5.3.- Resultados y Discusión.

En este caso los rendimientos en DQO (figura 7.38) fue semejante a la fase anterior (90%) con valores medios de salida de 328±65 mgO₂/l, pudiendo indicar la presencia de una cantidad de materia reductora de difícil degradabilidad para los tiempos de retención hidráulica ensayadas en las distintas fases. En el test Anova el valor obtenido para el p-valor fue de 0.9698 corroborando la igualdad entre los rendimientos, sin existir diferencias estadísticamente significativas para ambas fases. Como muestra la tabla 7.16 existió diferencias estadísticamente significativa en la reducción para este parámetro en función de las columnas del sistema, siendo la columna aireada donde se obtuvo los mejores rendimientos con valores medios del 60%. Siguió siendo importante la concentración de DQO de salida en la columna anóxica.

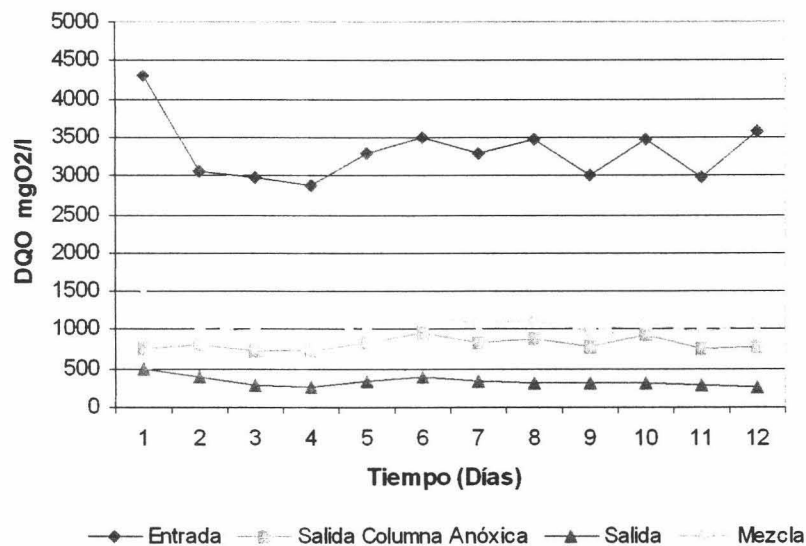


Figura 7.38.- Variación de la concentración de DQO y rendimientos en el lecho sumergido para la carga hidráulica ensayada en la fase 4ª de la investigación.

Investigación de Choque

Tabla 7.16.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de la DQO para las columnas del sistema para la recirculación ensayada de 300% en la fase 4ª.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rendimiento en DQO para ambas columnas.	1	7478.67	7478.67	100.69	0.0000

En el caso de la eliminación de nitrógeno total, no sucedió lo mismo, el rendimiento medio descendió hasta el 62% (figura 7.39) registrándose en la salida valores de 148 ± 27 mg/l.

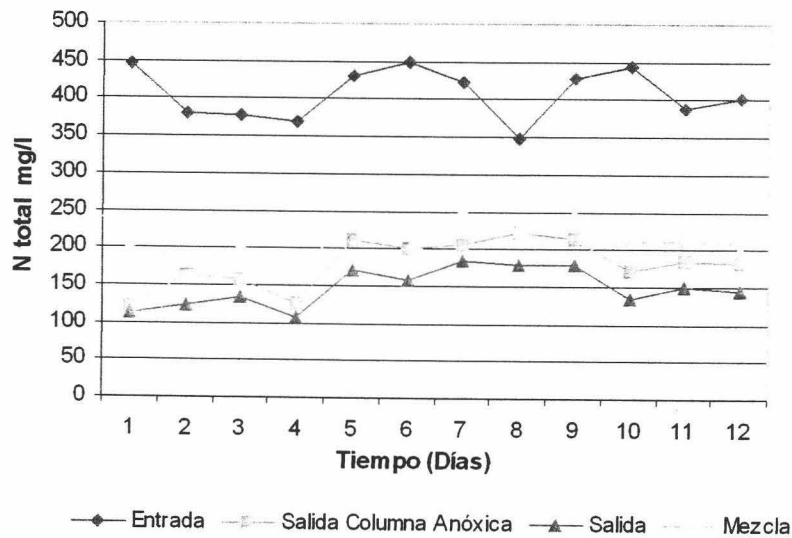
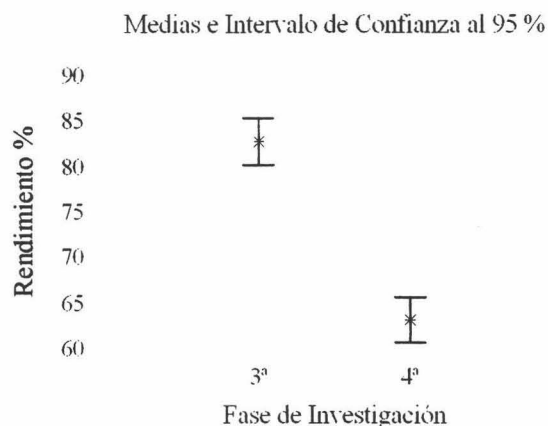


Figura 7.39.- Variación de la concentración de nitrógeno total y rendimientos en el lecho sumergido para la carga hidráulica ensayada en la fase 4ª de la investigación.

Tabla 7.17.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de nitrógeno total del sistema para las fases 3ª y 4ª.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. del nitrógeno total para fase 3ª y 4ª	1	2199.29	2199.29	65.46	0.0000



Como refleja la tabla 7.17 existen diferencias estadísticamente significativas para los rendimientos en nitrógeno total para la fase 3ª y fase 4ª de la investigación, siguiendo con un comportamiento negativo es decir, el aumento de la carga hidráulica y por consiguiente descenso del tiempo de retención implicó una disminución significativa en la eliminación de nitrógeno por parte del sistema.

La presencia de nitrito (Figura 7.40) y nitrógeno orgánico fue casi despreciable con alta concentración de nitrato, lo que indicó una buena amonificación y nitrificación, completa en su fase I y II, en la columna aireada. La concentración media de amonio en dicha columna fue de 54 ± 20 mg/l superior a la obtenida en la fase anterior que fue de 20 ± 6 mg/l.

En cambio, como refleja la figura 7.40, la eliminación de nitrato en la columna anóxica fue inferior a la fase anterior a pesar del remanente de la DQO a la salida de dicha columna, posiblemente afectada por la disminución en el tiempo de retención hidráulico en cerca de 6 horas, un 30% menos. Todo ello, implicó que en la columna no aireada el proceso de desnitrificación fuese incompleta confirmando con la fase anterior la fuerte influencia del tiempo de retención hidráulico sobre el proceso de desnitrificación para el efluente que se trató.

Investigación de Choque

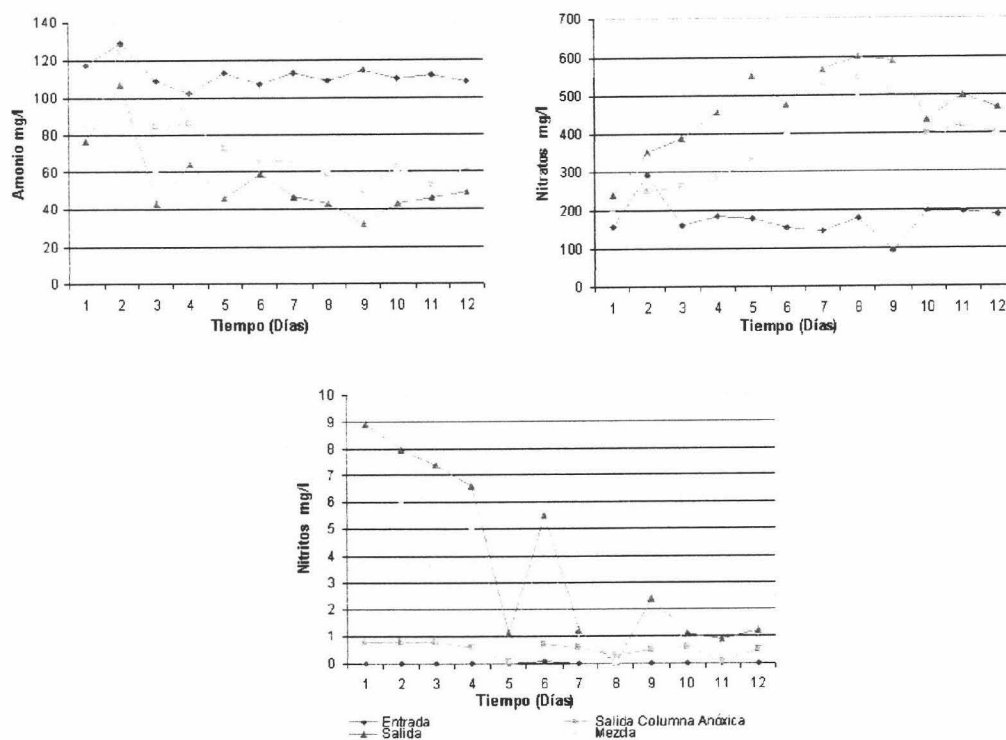


Figura 7.40.- Variación de las concentraciones de amonio, nitrato y nitrito en el lecho sumergido para la carga hidráulica ensayada en la fase 4^a de la investigación.

El rendimiento en eliminación de fenol también fue irregular, sufriendo un descenso en su valor medio, no siendo éste estadísticamente significativa (Tabla 7.18) con respecto a los rendimientos obtenidos en la fase 3 de esta investigación. Como se observa en la figura 7.41 el descenso fue considerable en los primeros días (64%), volviendo a incrementarse hasta el 92% (figura 7.41) para obtenerse un valor medio del 84 ± 14 mg/l. Bajo esta circunstancia los valores de salida siguieron excediéndose de los límites permitidos. El comportamiento de eliminación fue similar a la fase anterior donde la mayor reducción de polifenoles se consiguió en la columna aireada, confirmando la hipótesis esgrimida, la eliminación de polifenoles se ve favorecida en condiciones óxicas.

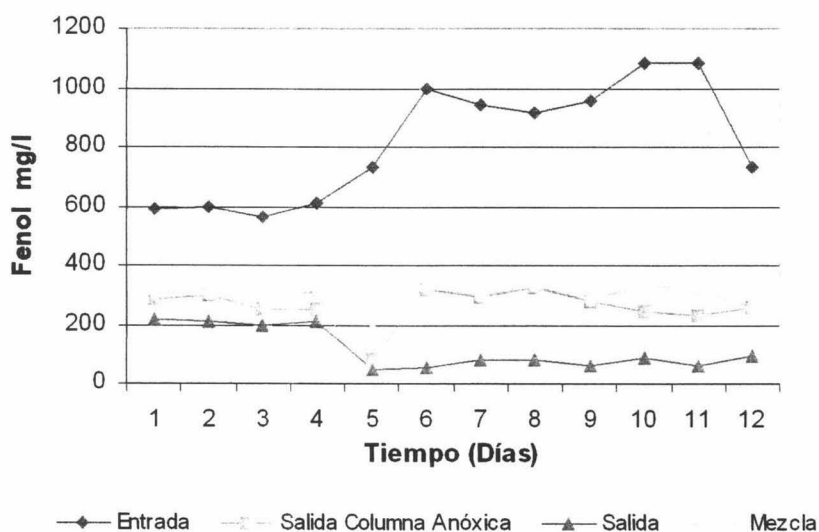


Figura 7.41.- Variación de la concentración de fenol y rendimientos en el lecho sumergido para la carga hidráulica ensayada en la fase 4ª de la investigación.

Tabla 7.18.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de fenol en el sistema para las fases 3ª y 4ª.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.L	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. del fenol para fase 3ª y 4ª	1	311.194	311.194	3.06	0.0948

En esta fase con el aumento de la carga hidráulica se redujo el tiempo entre lavados, teniéndose que realizarse éstos cada 4-5 días. Estos datos corroboraron la relación existente entre la carga contaminante y los ciclos de lavado.

7.5.4.- Conclusiones.

Una vez obtenidos los resultados y comparados con la fase anterior, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Reducir el tiempo de retención hidráulico de 18 horas a 12 horas por columna o aumentar la carga hidráulica de 0.7 a 1 m³/m² día supuso una disminución de la

eliminación de nitrógeno de aproximadamente el 20 %, comprobándose como esta variable afecta de forma significativa al sistema.

2. La eliminación de nitrógeno fue el proceso más afectado por los incrementos de carga hidráulica, mientras que la eliminación en DQO y polifenoles no se afectaron de forma destacable.
3. A pesar de una completa nitrificación y la presencia de una concentración adecuada de DQO, la desnitrificación de este efluente en un sistema de pre-desnitrificación, no fue completa.

La planta y consecuentemente el sistema en conjunto, en este punto de la investigación, responde a las variables ensayadas, a saber, carga hidráulica y recirculación, de forma y manera que se pudo comenzar a realizar un estudio más profundo para conseguir el resto de objetivos marcados, estudio que se describe en la investigación de fondo.

Investigación de Fondo

8.-INVESTIGACIÓN DE FONDO

Los resultados obtenidos en la fase anterior reflejaron por un lado la dificultad técnica de poner en marcha una planta de investigación a escala de laboratorio y por otro lado la demostración que conforme se fueron realizando las modificaciones físicas del sistema, se aumentó la eficacia del proceso biológico y en consecuencia la descontaminación del efluente proporcionado por Deretil S.A con una alta carga en compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino.

Ahora bien, esos mismos resultados demandaron profundizar en el conocimiento del sistema de tratamiento y proceso biológico encargado de reducir las concentraciones de los contaminantes del influente para determinar y acotar los rangos de las variables del sistema.

De manera, y con la planta en funcionamiento se procedió y continuó en determinar la

“Adaptabilidad de los lechos inundados para la eliminación de compuestos nitrogenados y fenólicos procedentes de un efluente salino industrial”

y en la consecución de unos objetivos secundarios que a continuación se enumeran:

- ✓ Determinación de los rangos de la carga hidráulica, recirculación, caudal de aire de proceso del sistema, en la eliminación de los compuestos nitrogenados y fenólicos del influente.

- ✓ Efecto de las variables carga hidráulica, recirculación, caudal de aire de proceso del sistema en los procesos de nitrificación y desnitrificación en medio salino.

- ✓ Estudio del comportamiento y seguimiento de la capacidad del material soporte en la regulación del pH en un proceso de nitrificación-desnitrificación mediante lechos inundados en medio salino para el tratamiento del efluente industrial en cuestión.

- ✓ Estudio de las características físicas, químicas y biológicas de la biopelícula responsable del proceso de depuración, así como conocimiento de la biodiversidad de la biopelícula tanto de la columna óxica como de la anóxica.

- ✓ Establecimiento de las variables que participan en el proceso de lavado de los lechos inundados: tiempos de aporte de aire- y agua, caudal de agua de lavado en las distintas etapas utilizadas en la fase anterior.

8.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA A ESCALA DE LABORATORIO DEFINITIVA.

Tras la experiencia obtenida en la anterior fase, la planta piloto quedó como sigue: dos filtros sumergidos formados por cilindros de metacrilato, lo que permitió ver el interior de las columnas, conectados en “U” a modo de vasos comunicantes. Ambos cilindros con un diámetro 15 cm, una columna adecuada para trabajar aireada y la otra columna como anóxica. La columna anóxica funcionó en flujo descendente y la columna óxica en flujo ascendente. Las alturas del material de relleno empleado fueron de 1.2 m para ambas columnas. Se continúa con el mismo material arcilloso como soporte de la biopelícula, con una granulometría entre 5-7 mm y una densidad de 1.74 g/cm³.

Para el funcionamiento de la planta se utilizaron dos bombas peristálticas Watson Marlow[®] 505 S, una para la entrada del influente y la otra para las recirculaciones del sistema, siendo los conductos o tubos de conexión de silicona.

Las columnas estuvieron individualizadas por una llave de paso, y así mismo las entradas de agua y aire para su lavado. El influente partió de un depósito de 50 l, donde se mantenía homogeneizado por una bomba sumergida. El agua de salida se recogió en un

depósito de 250 l. Para recogida del agua de lavado, ambas columnas contaron con una salida colocada a 40 cm de la lámina de agua. El agua de recirculación siguió tomándose a 5cm. por debajo del nivel del agua de salida del sistema.

Como único cambio se instaló un manoreductor que permitió medir y controlar el aire de proceso. Todo ello como se indica en la figura 8.1 y esquema 8.1.

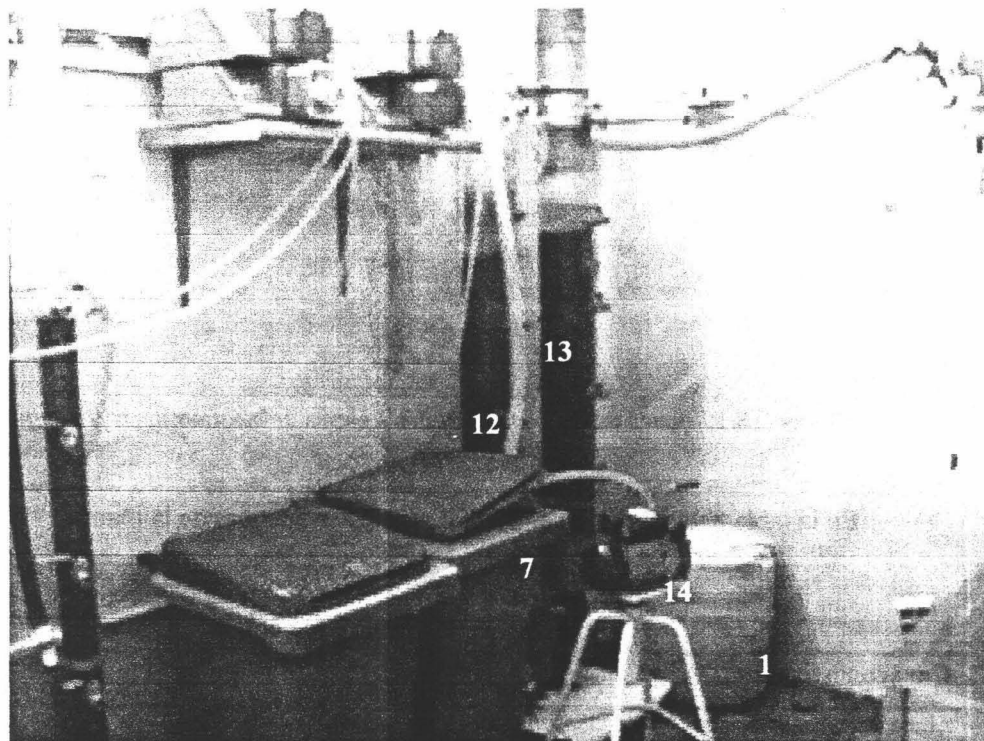
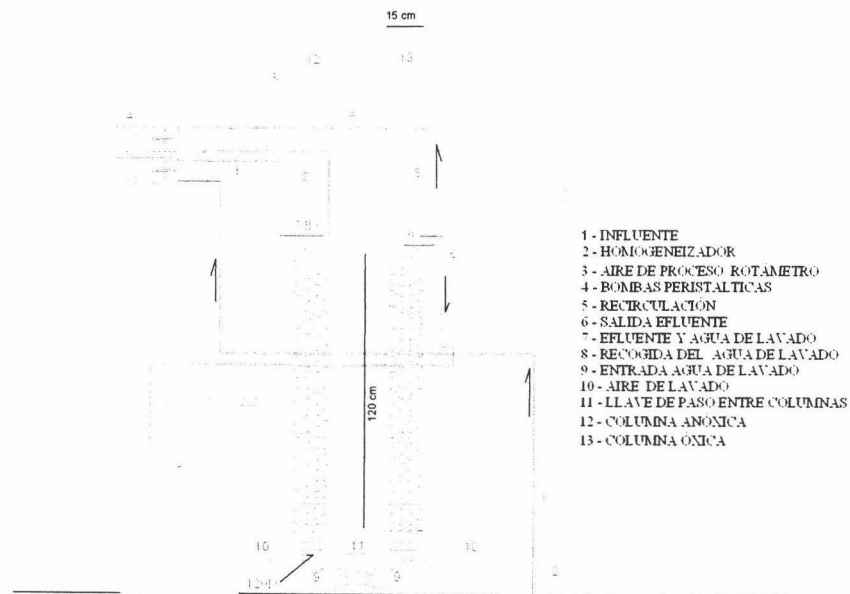


Figura 8.1.- Fotografía de la planta. La enumeración coincide con la del esquema 8.1, pero solo de las partes que se ven. El nº 14 pertenece a la bomba de lavado.



Esquema 8.1.- Planta de filtros sumergidos a escala de laboratorio en pre-desnitrificación.

En la tabla 8.1. se resume algunas de las características de la planta:

Tabla 8.1.- Características de la planta.

Características:	
Altura de ambos lechos	1.2 m
Superficie de los lechos	0.0176 m ²
Volumen ocupado por el material soporte	0.0212 m ³
Densidad del material soporte	1.74 g/cm ³
Diámetro del material soporte	5-7 mm
Porosidad dejado por el material soporte colocado en la columna.	0.4323

8.2.- MODIFICACIÓN DE VARIABLES Y PARÁMETROS

Las variables y parámetros variaron con respecto a la investigación de choque al tener que determinar más concretamente la adaptabilidad del sistema de lechos inundados al tratamiento del efluente de Deretil S.A.

Con relación a las **Variables** que se controlaron en el proceso fueron las que se enumeran a continuación:

❖ **Carga Hidráulica (m^3/m^2 día), Carga contaminante (kg /m^3 día), Recirculación (%) y etapas en el proceso de lavado.** Con estas variables se determinaron los límites máximos tanto en los caudales de influente, cargas de los distintos contaminantes (DQO, Nitrógeno y polifenoles principalmente), caudales de agua de recirculación interna y pautas seguidas en el proceso de lavado, todas ellas en términos de estudio de procesos, intuyendo en términos de diseño para plantas de mayor escala.

❖ **Caudal de aire de Proceso (m^3/m^2 día).**

La nitrificación es un proceso que es realizado por bacterias aerobias estrictas, lo que hace necesario el aporte de oxígeno. El caudal de aire que se introdujo en la columna óxica permitió el aporte de oxígeno necesario para el desarrollo de las bacterias nitrificantes. Su determinación permitió conocer y optimizar los caudales de aire que suponen un *gasto energético importante* en estos procesos.

Los **Parámetros** que se controlaron en el proceso sobre el influente, sobre el agua de la zona de mezcla, salida de la columna anóxica y no aireada fueron los siguientes, excepto la V_{30} que se realizó solo al agua de lavado:

❖ **Oxígeno disuelto.** Para determinar, fijar y controlar el oxígeno disuelto disponible o necesario para que se realice una correcta nitrificación. O bien para controlar el oxígeno disuelto residual que puede afectar al proceso de desnitrificación.

❖ **pH.** Con el se pudo controlar las variaciones de pH provocadas por la actividad biológica de la microbiota del sistema así como de la capacidad reguladora del material soporte sobre el pH del mismo.

- ❖ **Demanda Química de Oxígeno (DQO).** Para conocer el rendimiento en eliminación de materia reductora y cumplimiento de la vigente normativa, controlar y estimar la fuente de carbono y energía disponible para los microorganismos desnitrificantes.
- ❖ **Nitrógeno Total. Nitrato. Nitrito. Amonio.** Para comprobar tanto el rendimiento y cumplimiento en la eliminación de nitrógeno del sistema así como para hacer un seguimiento de los procesos de nitrificación y desnitrificación.
- ❖ **Fenol.** El seguimiento de este parámetro reflejó el rendimiento y grado de cumplimiento de la legislación actual sobre vertidos al litoral.
- ❖ **V30**

Definido como el volumen (ml) ocupado por la biopelícula en suspensión en el agua de lavado, tras dejarlo sedimentar durante 30 min. Éste parámetro asesoró de la capacidad de sedimentación de la biopelícula o material recogido en el agua de lavado orientando del tipo de instalación o tratamiento físico necesario para concentrar, retirar y gestionar la materia sedimentable.

Para la **biopelícula**, los parámetros que se analizaron fueron:

- ❖ La composición poblacional de la microbiota, y el EPS (Substancias Poliméricas Extracelulares) al cual se le analizó: contenido en carbohidratos, proteínas, carbono orgánico (TOC) e inorgánico total.

8.3.- PLAN DE TRABAJO.

Para realizar la determinación y seguimiento de parámetros y variables que intervinieron en el sistema se siguió un plan de trabajo resumido en la tabla 8.2. Para ello, se fijaron tres cargas hidráulicas distintas, en el rango entre la carga hidráulica máxima y mínima ensayadas en la fase anterior que obtuvieron resultados con diferencias estadísticamente significativas en rendimiento en eliminación de nitrógeno. Para la

variable recirculación interna, se fijaron también tres recirculaciones ascendentes en función del valor último utilizado en la investigación de choque. Además en esta fase se introdujo la variable caudal de aireación de proceso fijándose para ésta dos caudales. El modelo de trabajo fue ensayar combinadamente las tres variables de estudio.

Para realizar la caracterización química y biodiversidad de la biopelícula se fijó como condiciones de trabajo: una carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora, y una recirculación interna de 600%.

Tabla 8.2.- Resumen del plan de trabajo durante la fase de Investigación de Fondo.

Altura de lecho (m)		Carga Hidráulica (m^3/m^2 día)	Aireación (m^3/m^2 hora)	Recirculación %	Descripción	Tiempo Real
Anóxica	Óxica					
1.2	1.2	0.6, 0.7, 0.9	6.8, 13.6	300, 400, 600	Análisis de parámetros	10 meses
1.2	1.2	0.7	13.6	600	Estudio de biopelícula	2 meses

La duración temporal de cada combinación de variables se fijó en dos ciclos de 6 días cada uno, tiempo transcurrido entre lavado y lavado del sistema. La elección de 6 días de duración fue determinado por los resultados obtenidos en la fase 3 de la investigación de choque donde se obtuvieron los mejores rendimientos del sistema.

Al igual que en la investigación de choque el influente industrial se mezcló con agua de mar con una dilución para la investigación de fondo de 1/20, consiguiendo las siguientes concentraciones medias de entrada:

- $400 \pm 25 \text{ mg/l}$ de N_{total} .
- $1000 \pm 150 \text{ mg/l}$ de Fenol.
- $2800 \pm 360 \text{ mgO}_2/\text{l}$ de D.Q.O.

Como ya se comentó en la investigación de choque el influente proporcionado por la Empresa DSM Deretil S.A fue cambiando en concentraciones pero manteniendo las mismas características fisico-químicas.

La frecuencia de preparación del influente fue diaria para impedir que en el depósito se desarrollen microorganismos y con ellos procesos degradativos del influente. El pH del mismo se procuró mantener entre 7-7.5 añadiendo hidróxido sódico una vez realizada la dilución.

La frecuencia de muestreo se llevó a cabo como se indica en la tabla 8.3. Los puntos de toma de muestra fueron: agua de entrada tras pasar por la bomba peristáltica de alimentación (E), salida de la columna anóxica (120D), salida de la columna aireada (S) y la zona de mezcla entre el agua de entrada y el agua procedente de la recirculación (MD), siguiendo los protocolos de recogidas de muestras.

Tabla 8.3.- Resumen de puntos de muestreo, determinación analítica y su periodicidad.

Punto de muestreo	Análisis	Periodicidad
E, MD,120D, S	pH	Diario
E, MD,120D, S	Oxígeno Disuelto	Diario
Eliminación de los compuestos nitrogenados		
E, MD,120D, S	Nitrógeno Total	Diario
E, MD,120D, S	Amonio	Diario
E, MD,120D, S	Nitrito	Diario
E, MD,120D, S	Nitrato	Diario
Eliminación de materia reductora		
E, MD,120D, S	DQO	Diario
E, MD,120D, S	Fenol	Diario
Sedimentalidad de la biopelícula		
Agua de lavado	V30, Sólidos en Suspensión	Cada 6 días

Las toma de muestras dedicadas al estudio de la biopelícula fueron realizadas de forma puntual, bajo condiciones de carga hidráulica de 0.7 m³/m² día, aireación 13.6 m³/m² día y una recirculación de 600%, según se recoge en el apartado de material y métodos analíticos.

N8.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.4.1.- Eliminación de la DQO del sistema.

La mejora del espacio litoral es para la Comunidad Andaluza un objetivo primordial de interés económico y ambiental, constituyendo, por tanto, la mejora de la calidad de las aguas litorales un elemento primordial de control y protección. En el Decreto sobre la calidad de las aguas del litoral especifica, que de forma general no podrán autorizarse vertidos cuya carga contaminante supere los límites de emisión establecidos en las tablas del anexo I de dicho reglamento y que se han recogido en la introducción de esta investigación. En este sentido, y como referencia las concentraciones máximas de vertido son las siguientes:

PARÁMETRO	Media Mensual	Media diaria	Valor Puntual
DQO mgO ₂ /l	450	600	750

En este sentido, las figuras 8.2 y 8.3 se representan la variación de la concentración de la DQO entre la entrada y salida del sistema en relación a las variables ensayadas: carga hidráulica y recirculación interna para los diferentes caudales de aireación de proceso. Como se puede observar, para todas las combinaciones posibles, la concentración de salida de DQO se encontró por debajo de los límites establecidos en la legislación vigente.

A continuación se realiza un análisis del sistema global con respecto a la influencia de las variables ensayadas en el rendimiento de eliminación de la DQO.

Los resultados derivados del funcionamiento del sistema mostraron la influencia de las distintas variables propuestas en la eliminación de la DQO, existiendo una relación directa entre el aumento en la recirculación interna y caudal de aireación de proceso en el aumento de rendimiento en la reducción de la DQO.

Investigación de Fondo

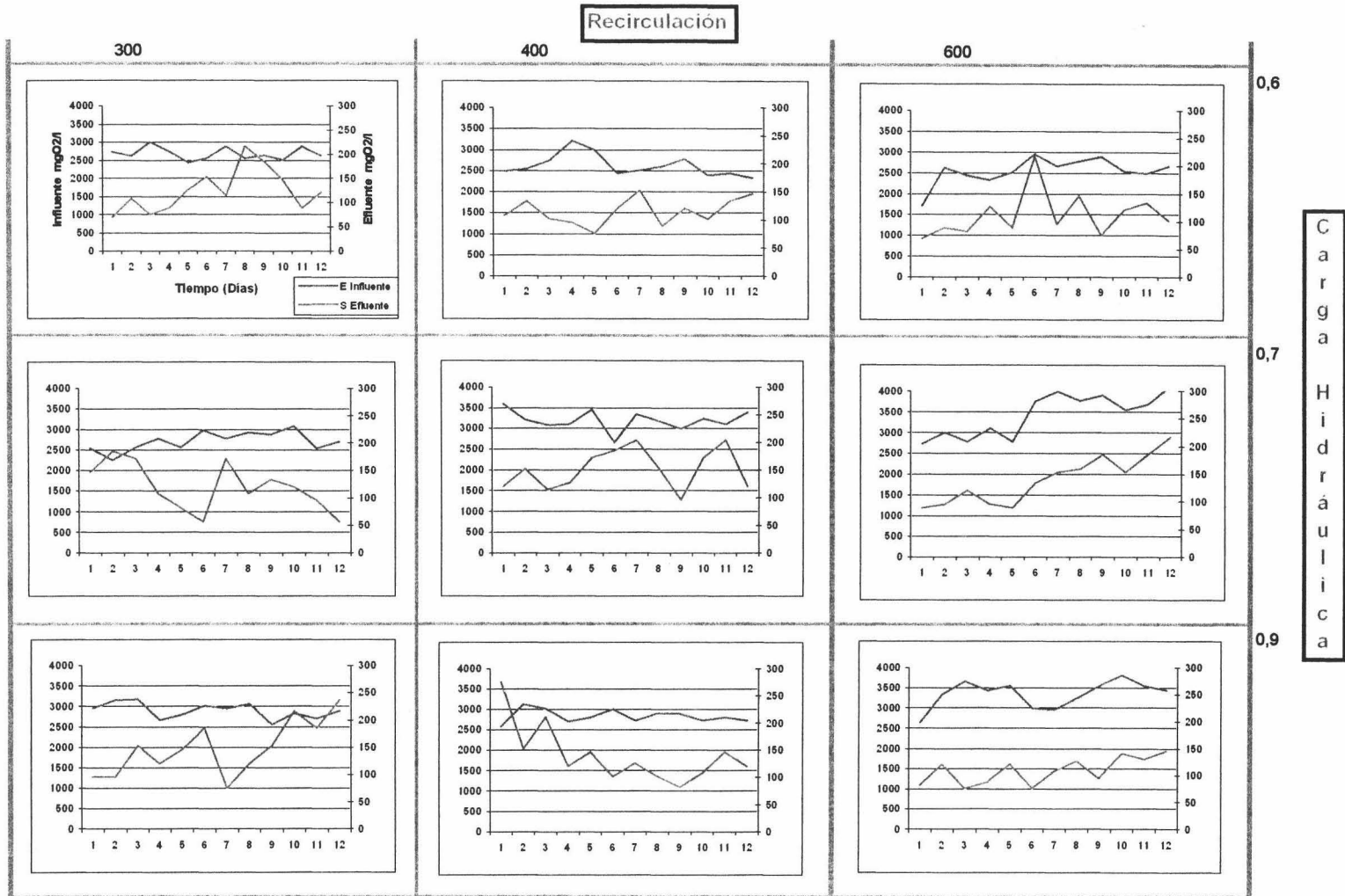


Figura 8.2.- Variación de las concentraciones de DQO del influente y efluente del sistema expresado en mgO₂/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

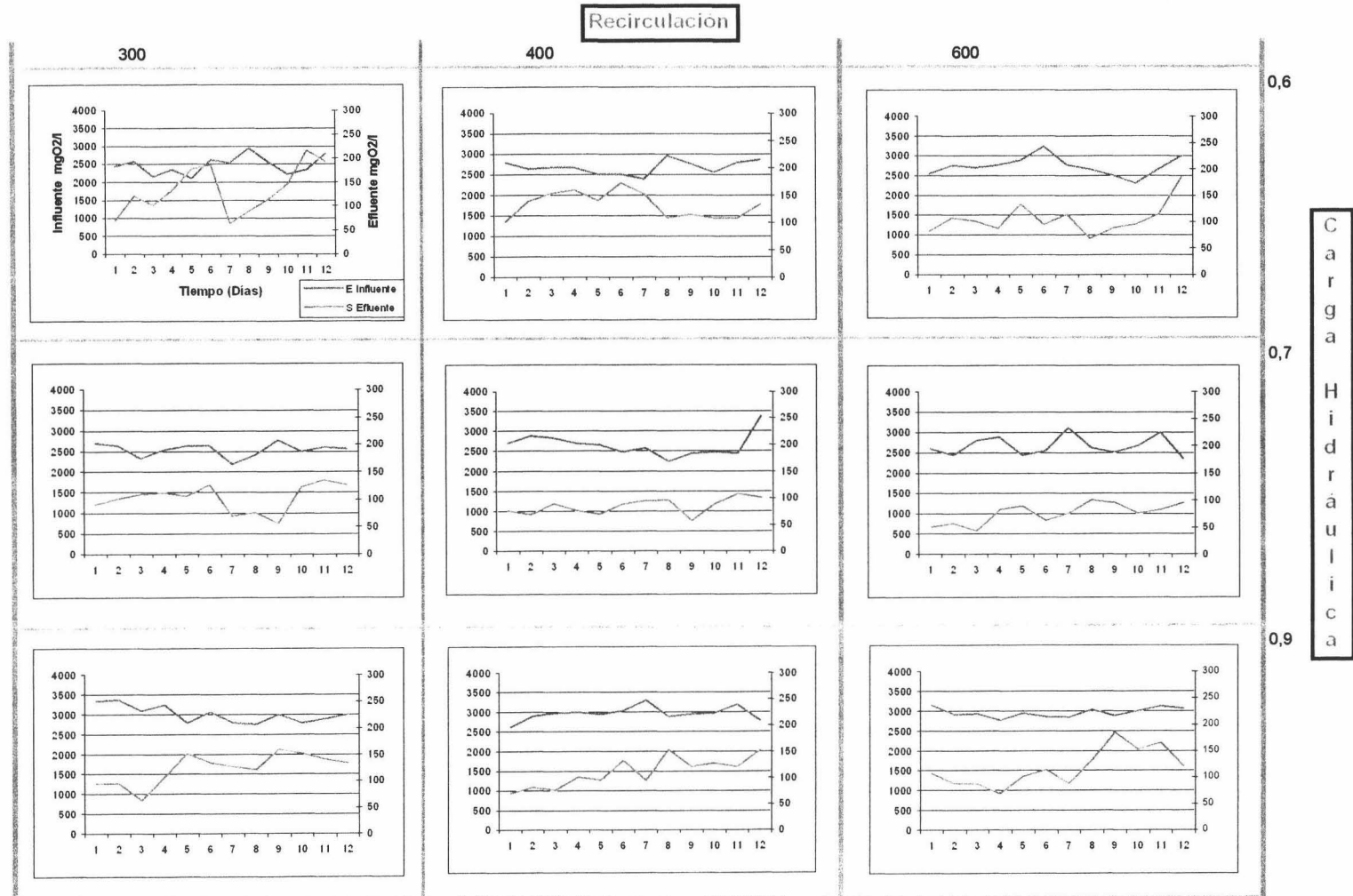


Figura 8.3.- Variación de las concentraciones de DQO del influente y efluente del sistema expresado en mgO₂/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 13.6 m³/m² hora.

Como muestra la figura 8.4a. la recirculación interna sigue una tendencia lineal ($y=0.0027x + 94.64$) con una correlación de $r^2=0.9689$, indicando la fuerte influencia de esta variable sobre la eliminación de la materia reductora con diferencias estadísticamente significativa (Tabla 8.4), obteniendo para la recirculación de 600 %, independientemente de las demás variables, un rendimiento medio del 96.3 %. Un aumento de la recirculación implica aumentar el tiempo de contacto entre el contaminante y la microbiota responsable de su degradación, así como un incremento en la velocidad de flujo que puede mejorar la transferencia entre la fase líquida y la biopelícula (De Beer, 1997).

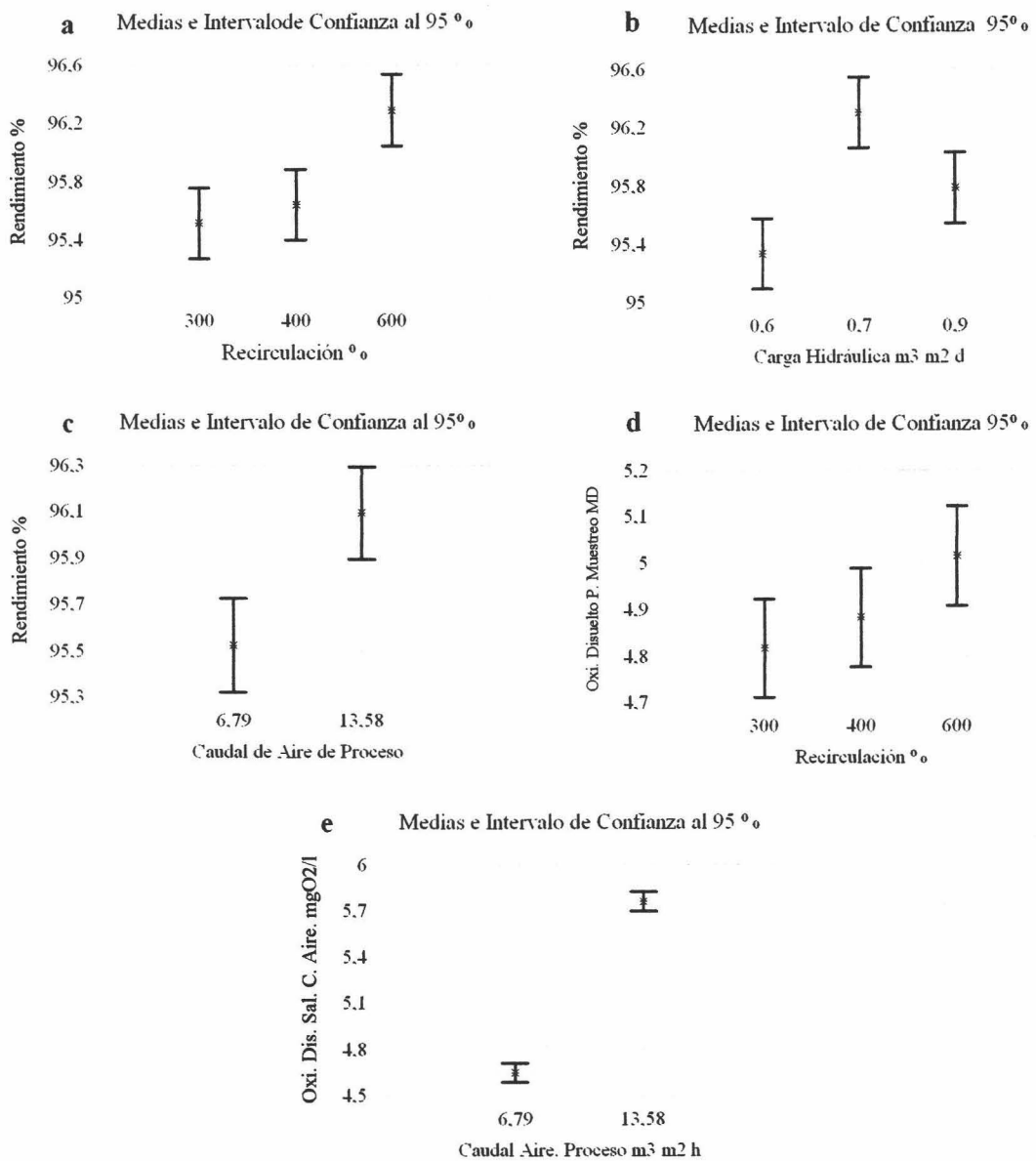


Figura 8.4.- Test de las mínimas diferencias significativas para diversas variables del sistema.

Tabla 8.4.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de eliminación de la DQO para variables C. Hidráulica, Caudal de Aireación y Recirculación.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
A: C. Hidráulica	2	33.0371	16.5186	8.34	0.0003
B: Aireación	1	16.1828	16.1828	8.17	0.0047
C: Recirculación	2	24.2981	12.149	6.14	0.0026

El comportamiento de la variable caudal de aireación reflejó (Figura 8.2, 8.3 y 8.4c) un efecto importante sobre la eliminación de la DQO de manera que para caudales de aire de 13.6 m³/m² hora se consiguieron rendimientos medios del 96.1 % independiente del resto de variables ensayadas, con diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) (Tabla 8.4) en relación al otro caudal de aire ensayado de 6.8 m³/m² hora.

Como se puede observar en la figura 8.4e., a mayor caudal de aireación mayor concentración de oxígeno disuelto disponible en el sistema para oxidar la materia reductora, favorecida la dispersión de oxígeno disuelto sobre el sistema por la recirculación interna (figura 8.4d.) al incorporarlo a la columna anóxica. La figura 8.4d. recoge las concentraciones medias de oxígeno disuelto a la entrada de la columna anóxica procedente principalmente del oxígeno disuelto del agua de recirculación, aunque no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (p = 0.1803), independientemente del resto de variables, para este comportamiento de aumento de oxígeno disuelto a la entrada de la columna anóxica para las recirculaciones ensayadas.

En cambio los resultados (figura 8.4b) de la carga hidráulica mostraron un comportamiento diferente a las otras dos variables, al seguir una función polinómica cóncava ($y = -41,667x^2 + 64,167x + 71,800$) con un factor de correlación de $r^2 = 0.999$, consiguiéndose el máximo de rendimiento entre las cargas hidráulicas probadas para 0.7 m³/m² día, con diferencias estadísticamente significativas (tabla 8.4). Un mayor tiempo de retención hidráulico no siempre implica mejorar los rendimientos. Según Peladan *et al.*, (1997) a mayor flujo de agua, dentro de unos límites, mayor será la transferencia de

substrato hacia la biopelícula, la distribución del flujo y de la biomasa a través del biofiltro. De Beer (1997) demostró desde el punto de vista microscópico como el incremento en velocidad de flujo mejora la transferencia entre la fase líquida y la biopelícula. Este fenómeno se ha observado a pesar de que se reduce el tiempo de contacto, el incremento de la velocidad del agua tiene un efecto positivo sobre el índice global de transferencia y por consiguiente sobre la capacidad máxima del biofiltro. Ello puede explicar el comportamiento de la carga hidráulica en la eliminación de la DQO.

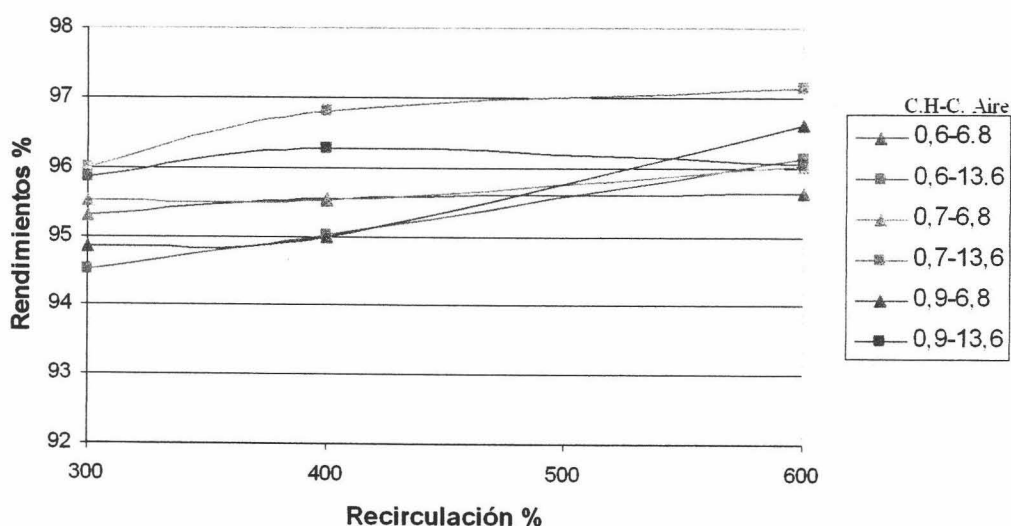


Figura 8.5.- Variación de los valores medios en eliminación de la DQO en función de la recirculación del sistema, caudal de aire de proceso y carga hidráulica para el sistema.

La figura 8.5 refleja las medias para todas las combinaciones posibles de las variables ensayadas. Como se puede observar en la figura, con una carga hidráulica de 0.7 m³/m² día y un caudal de aire de proceso de 13.6 m³/m² hora se obtuvo, en sus posibles combinaciones con la recirculación, los mejores rendimientos en eliminación de la DQO existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a las demás cargas hidráulicas probadas y aireación. Este comportamiento se aproxima a una ecuación logarítmica con la siguiente expresión $y = 1.589 \ln(x) + 87.05$ ($r^2 = 0.897$). Para esta carga hidráulica y aireación se observaron mejoras estadísticamente significativas entre las recirculaciones de 300 y 400% (Tabla 8.5), pero no existieron mejoras significativas (Tabla 8.5) en los rendimientos al aumentar la recirculación a 600% (figura 8.6)

($p=0.2781$), implicando que este aumento de recirculación solo supondría elevar los costes sin conseguir mejorar en los rendimientos de forma apreciable. Para la mayoría de combinaciones el aumento en recirculación de 400 a 600% no supuso aumentar el rendimiento de eliminación de DQO, pudiendo indicar la existencia de sustancias de difícil biodegradación.

De manera que las condiciones que proporcionaron mejores resultados en los rendimientos de eliminación de la DQO, con diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) fueron aplicando una carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, una recirculación interna de 400% y un caudal de aire de proceso de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora, consiguiéndose un rendimiento medio del $96.8 \pm 0.7 \%$.

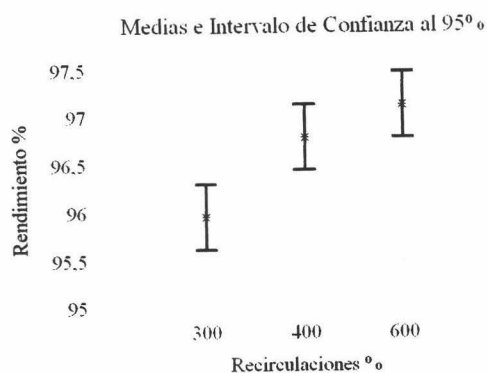


Figura 8.6.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento de la DQO respecto a las recirculaciones ensayadas con carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día y de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora.

Tabla 8.5.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de la DQO con la carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día y aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora para las recirculaciones indicadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p<0.05$
Recirculación 300-400%	2	8.7240	4.3620	6.42	0.0044
Recirculación 400-600%	2	52.2631	26.1315	8.35	0.2781

Chui *et al* (2001) en el tratamiento de un agua preparada en laboratorio trabajó con dos lechos inundados conectados en serie y con un lecho inundado ambos diseñados para la eliminación de nitrógeno mediante nitrificación-desnitrificación. En estos ensayos obtuvieron rendimientos, para concentraciones de DQO próximos a 5000 mg O₂/l con una carga volúmica de 5 Kg DQO/ m³ día, entre el 98 % para la primera configuración y 90% para la segunda configuración. El tiempo de retención medio empleado en esta investigación se aproximó a las 24 horas, en comparación a las 36 horas aproximadamente empleadas en nuestro estudio para una carga volúmica media de 1.5 Kg DQO/ m³ día con un rendimiento medio en eliminación de DQO del 96.8±0.7 %. Algo menor, pero con una diferencia a tener en cuenta, el agua utilizada para el tratamiento fue un efluente bruto procedente de la empresa Deretil S.A, más complejo que el preparado en laboratorio para dicha investigación de Chui *et al.* (2001). Lacalle *et al.*, (2001) para un agua procedente de una industria petroquímica con concentraciones de DQO de 10 gO₂/l y 790 mg/l de nitrógeno total consiguieron rendimientos del 98 % en eliminación de la DQO, utilizando para ello un fango activo en condiciones anóxicas y un lecho sumergido aireado conectados en serie, con tiempos de retención hidráulico de 3.3 y 1.3 días respectivamente y con una relación en recirculación interna de 6.7. En este caso la recirculación fue menor y mucho menor el tiempo de recirculación, si es verdad que también la carga contaminante fue tres veces menor con respecto al trabajo de Lacalle *et al.*, (2001).

Las figuras 8.7 y 8.8 representan la variación de la DQO en las columnas del sistema en función de las variables probadas con el fin de observar el comportamiento de dichas columnas en la eliminación de la DQO. Como refleja la serie de graficas existe un comportamiento definido en la reducción de la DQO por parte de ambas columnas, presentando la columna aireada para el global de los ensayos un mejor rendimiento en la eliminación de la DQO.

Investigación de Fondo

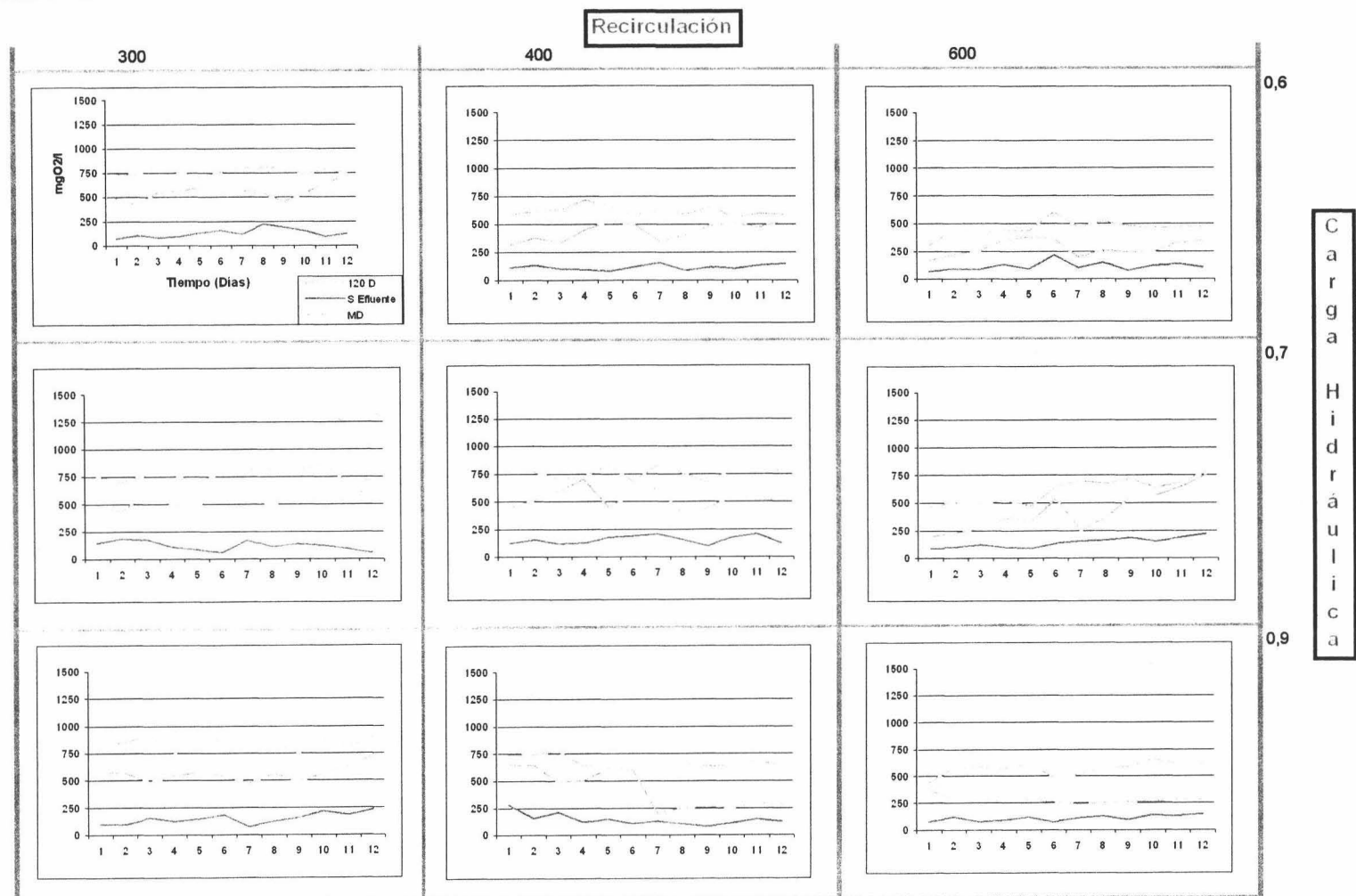


Figura 8.7.- Variación de las concentraciones de **DQO** con respecto a la entrada y salida de las columnas del sistema expresado en mgO₂/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

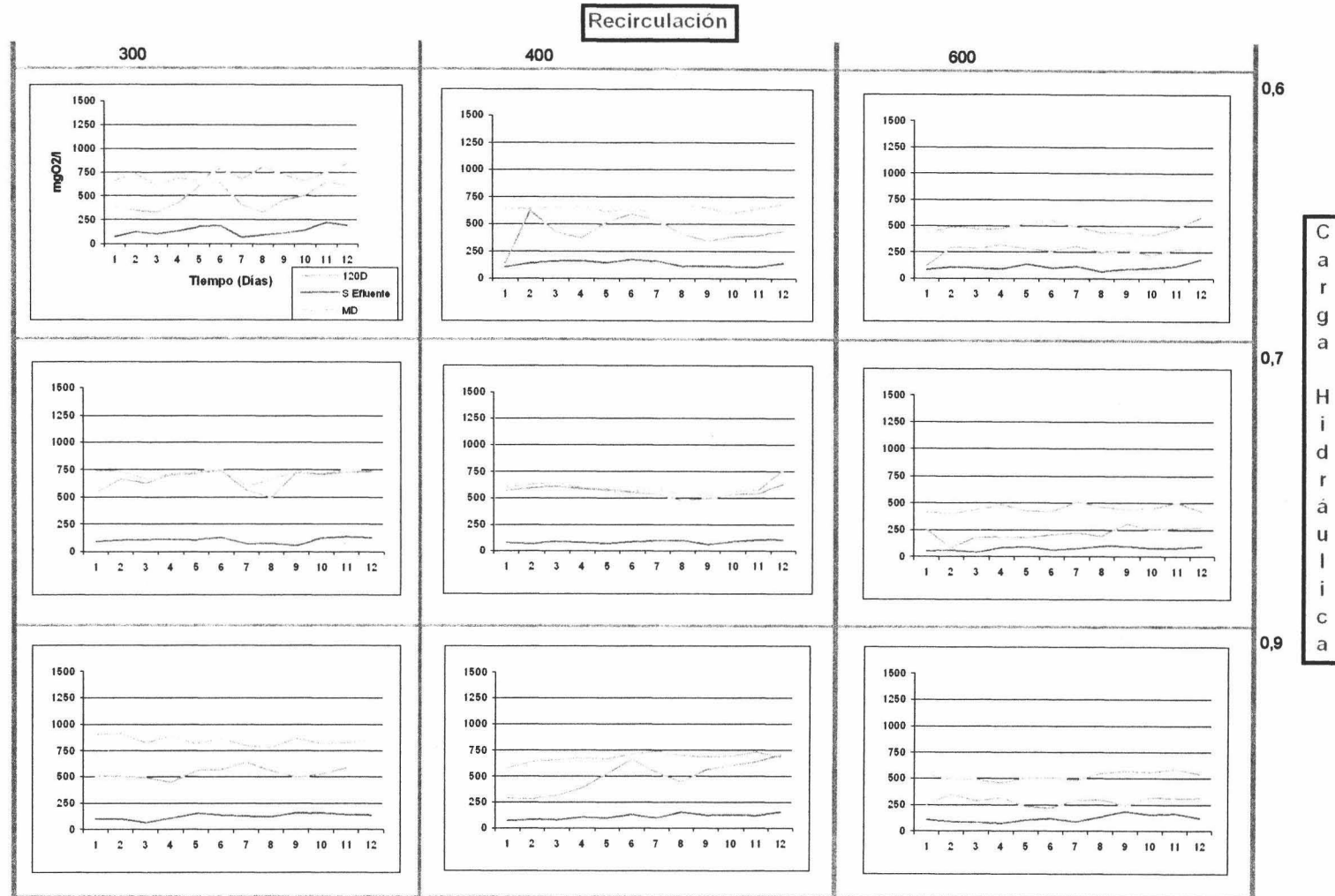


Figura 8.8. - Variación de las concentraciones de **DQO** con respecto a las entradas y salidas de las columnas del sistema expresado en mgO_2/l durante 12 días, en relación a la **recirculación interna (%)** y **carga hidráulica (m^3/m^2 día)** para una aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora

Según el análisis estadístico (Tabla 8.6), se observó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las columnas del sistema en la eliminación de la DQO. Como muestra la figura 8.9 la columna aireada influyó de forma más decisiva con una media de eliminación del 51.6 ± 18.3 % que la columna no aireada con tan solo un 30.2 ± 16.1 % de media, independientemente de las variables probadas. Esta afirmación junto a la obtenida con la figura 8.4c, corrobora la importancia de la presencia de oxígeno disuelto para la eliminación de la materia reductora que caracteriza el influente a tratar.

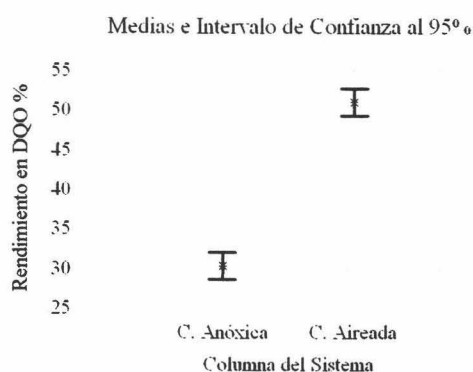


Figura 8.9.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento de la DQO respecto a las columnas del sistema.

Tabla 8.6.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de la DQO del sistema para las columnas del sistema.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.L	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Columnas del sistema	1	45630.0	45630.0	141.0	0.0000

8.4.2.- Eliminación de los compuestos fenólicos del sistema.

El fenol y compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que parecen frecuentemente en efluentes de muchas industrias químicas, petroquímicas y refinerías. Debido a su gran toxicidad tanto humana como para la vida acuática, se ha impuesto en diversos países fuertes restricciones en la concentración de estos compuestos en aguas de vertido buscando la protección y seguridad humana y ecológica. En Andalucía, el límite específico de autorización para vertido, utilizado como referencia para este estudio, de estas sustancias en el medio acuático marino se indica en la siguiente tabla:

PARÁMETRO		Media Mensual	Media diaria	Valor Puntual
Fenoles	mg/l	3	15	15

Utilizándola como referente, a continuación se realiza un análisis de resultados comenzando por la capacidad de eliminación de los compuestos fenólicos por parte de las columnas que componen el sistema. Como muestra la figura 8.10 y 8.11 donde se representan todas las variaciones de las concentraciones de los compuestos fenólicos para ambas columnas (de MD a 120 D variación en la columna anóxica y de 120 D a S la variación en la columna aireada) en relación a las combinaciones posibles para las variables ensayadas, en la mayor parte de los casos la reducción en la concentración de estas sustancias se produce en la columna aireada.

La figura 8.12 refleja el rendimiento medio en eliminación del fenol para cada columna, independientemente del resto de variables, siendo para la columna anóxica del $24 \pm 16.9\%$ y para la columna aireada del $60 \pm 17.9\%$. Realizando el análisis de la varianza las condiciones de trabajo de las columnas influyeron ($p < 0.05$) en la capacidad de eliminar los compuestos fenólicos con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8.7). La única diferencia entre ambas columnas fue la aireación y consecuentemente el aporte oxígeno disuelto que facilita el ataque biológico de los compuestos fenólicos. Esta afirmación viene a corroborar el comportamiento de las columnas en la fase final de la investigación de choque. Rittman y McCarty (2001) consideran que las tasas de degradación tienden a ser más lentas en condiciones anóxicas que en condiciones óxicas y que los organismos que llevan a cabo las reacciones no parecen ser tan frecuentes en el ambiente como sus homólogos aerobios.

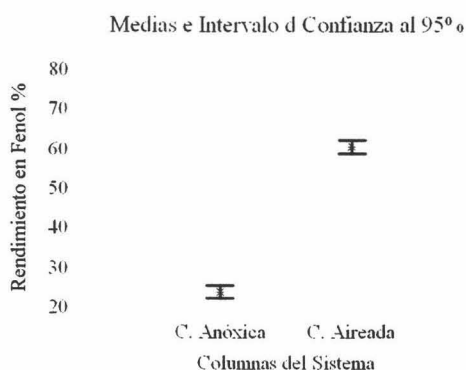


Figura 8.12.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento de eliminación del fenol con respecto a las columnas del sistema.

Tabla 8.7.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de eliminación del fenol para las columnas del sistema.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Columnas del sistema	1	141950.0	141950.0	457.47	0.0000

En la siguiente figura 8.13, se recoge la influencia de las distintas variables de forma independiente en la reducción conjunta de ambas columnas, es decir del sistema. Esta figura junto con tabla 8.8 reflejan como la carga hidráulica y la carga de aire de proceso tuvieron un comportamiento influyente en el rendimiento global del sistema con diferencias significativas para ambas de forma individual (Tabla 8.8). Así con un aumento en el caudal de aireación se consiguió aumentar los rendimientos de reducción de dichas sustancias, siendo directamente proporcional corroborando la importancia de la columna aireada en la eliminación de estos compuestos. No así, la carga hidráulica que a pesar de existir diferencias estadísticamente significativas para las tres cargas ensayadas, aumentar de $0.6 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ a $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ implicó un aumento en el rendimiento de eliminación de compuestos fenólicos, mientras que al aumentar a $0.9 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ supuso una disminución en tal rendimiento. Este comportamiento sigue una función polinómica de 2 grado ($y= 54.16x^2+76.91 x+70.1$) con un factor de correlación $r^2= 1$, reflejando un comportamiento similar al de la DQO, ya comentado.

Investigación de Fondo

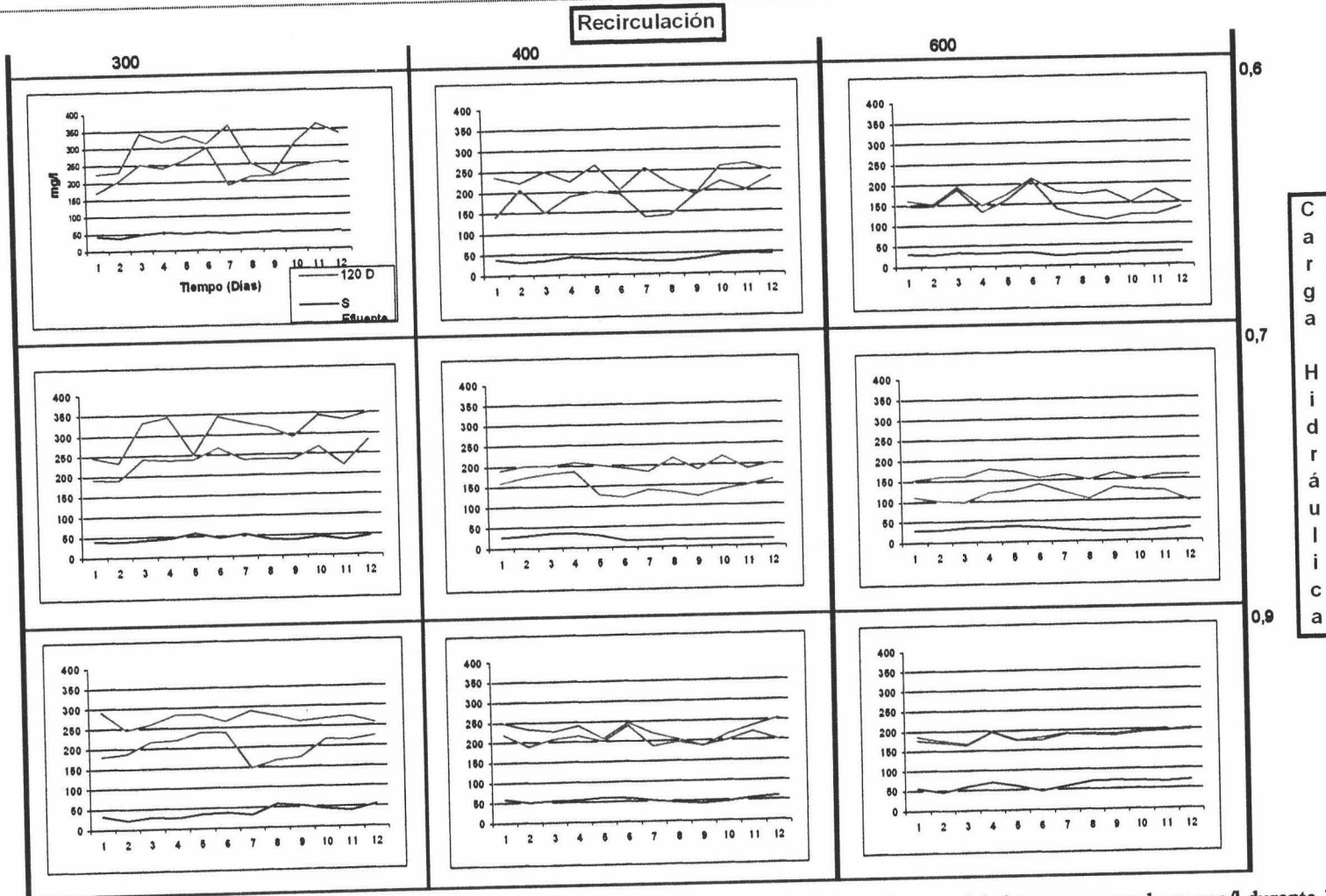


Figura 8.10.- Variación de las concentraciones del fenol con respecto a la entrada y salida de las columnas del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

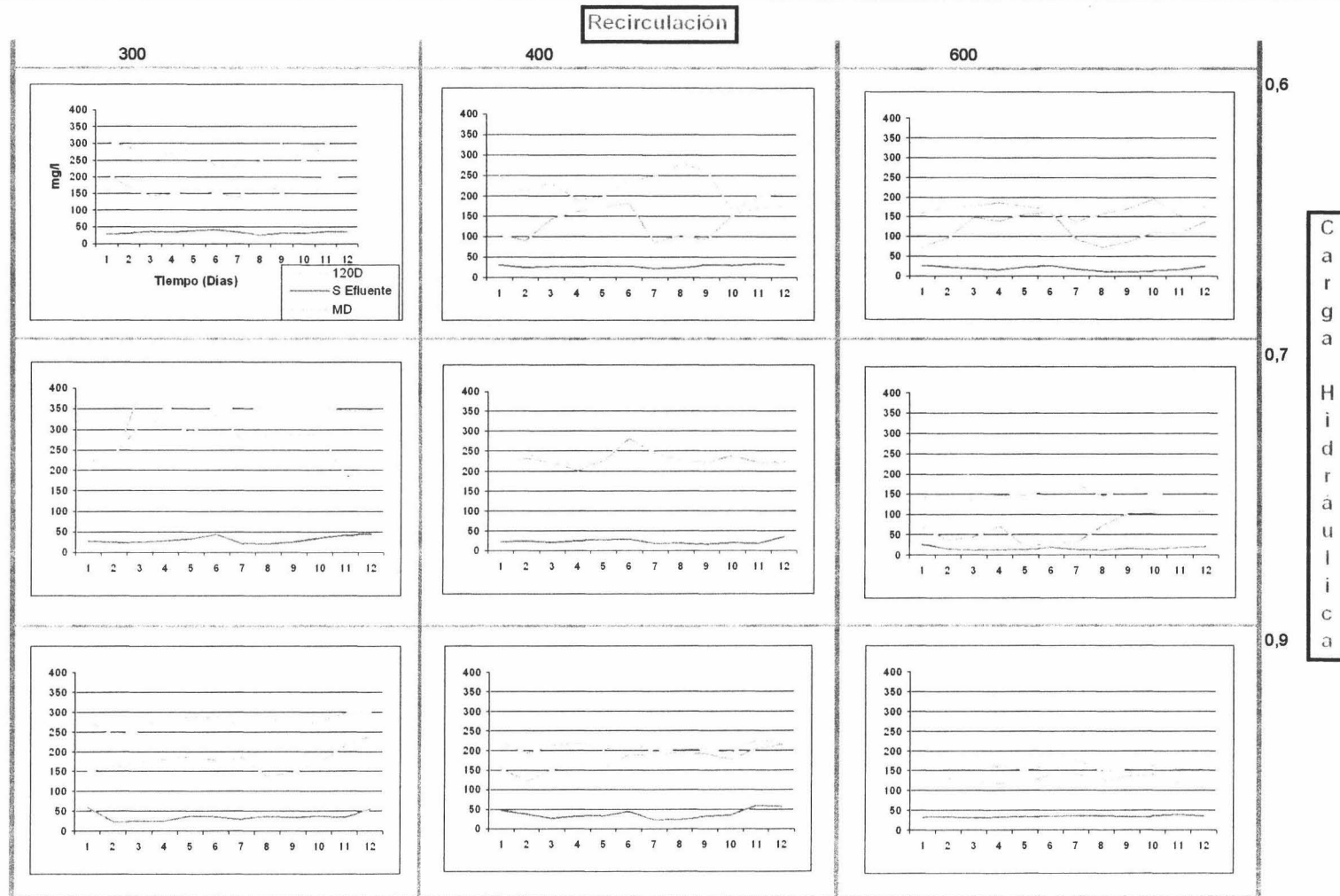


Figura 8.11.- Variación de las concentraciones del **fenol** con respecto a la entrada y salida de las columnas del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 13.6 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

En cambio, la recirculación a pesar de observarse (figura 8.13) un incremento en el rendimiento de eliminación del fenol o compuestos fenólicos este no fue lo suficiente como para detectarse diferencias significativas ($p= 0.1533$) al aplicarle el test anova con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 8.8).

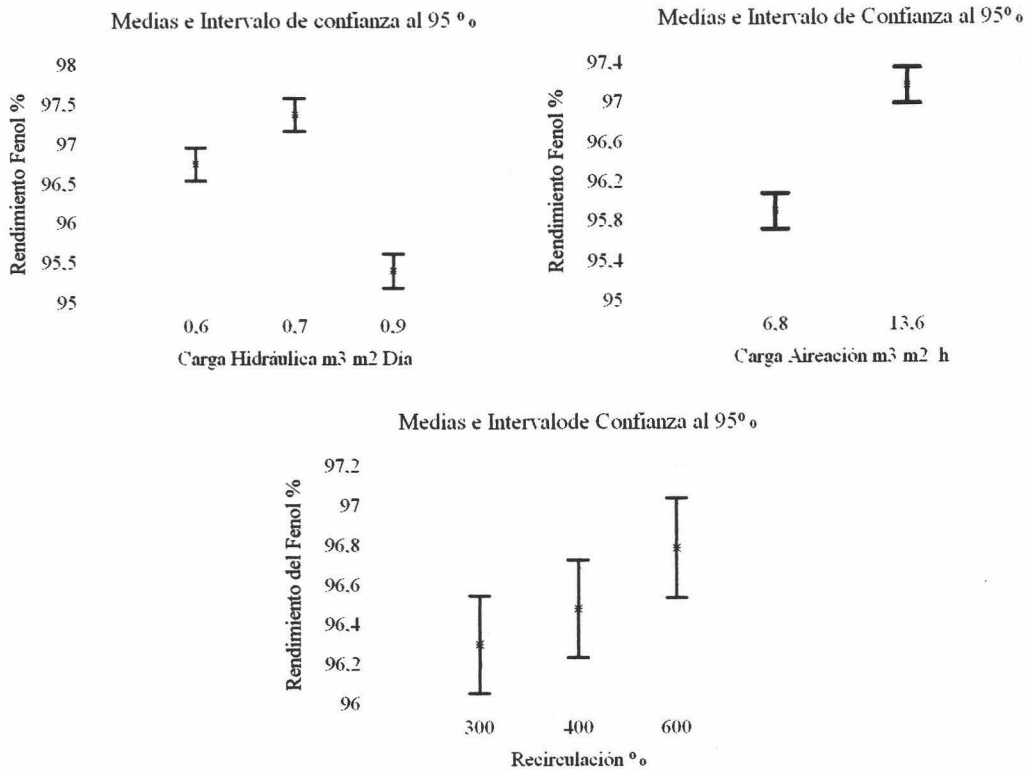


Figura 8.13. Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento de eliminación del fenol con respecto a las variables ensayadas.

Tabla 8.8.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento en eliminación del fenol para las variables ensayadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Carga Hidráulica	2	143.424	71.7122	44.33	0.0000
Carga Aireación	1	84.9245	84.9245	46.61	0.0000
Recirculación	2	8.54056	4.27028	1.89	0.1533

La figura 8.14, donde se muestra los valores medios en el rendimiento de eliminación de los compuestos fenólicos en función de las tres variables, se observó que a partir de la recirculación de 300% los rendimientos aumentan para las cargas hidráulicas de 0.6 y 0.7 m³/m² día mientras que para 0.9 m³/m² día disminuyen independientemente la carga de aireación utilizada. Esto explicaría que la carga hidráulica presentó una mayor influencia en la eliminación de compuestos fenólicos del sistema que la recirculación interna. Alemzadeh *et al.*, (2002) concluyeron en su estudio de eliminación de fenol para un agua sintética con biocilindros, que un aumento en la carga hidráulica en el sistema causaba una disminución en la eficiencia del tratamiento. Las figuras 8.15 y 8.16 que representan todas las variaciones de las concentraciones de los compuestos fenólicos entre la entrada del influente y la salida del sistema en relación a las combinaciones posibles para las variables ensayadas, reflejan como a partir de la recirculación 300 % las concentraciones no disminuyen significativamente.

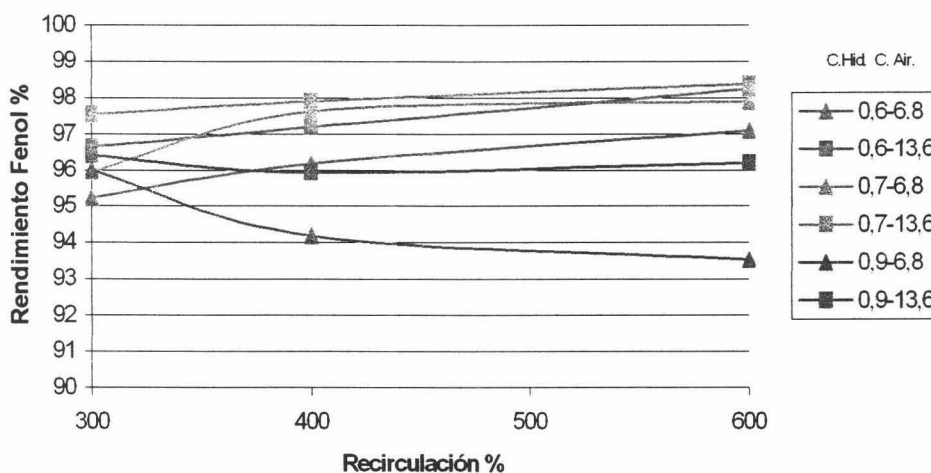


Figura 8.14.- Variación de los valores medios en el rendimiento de eliminación del fenol en función de la recirculación del sistema, caudal de aire de proceso y carga hidráulica.

Hay que indicar que solo bajo las condiciones de cargas hidráulicas de 0.6 y 0.7 m³/m² día, carga de aire de proceso de 13.6 m³/m² hora y una recirculación del 600% se aproximó al cumplimiento de normativa vigente de vertidos al litoral (media puntual y diaria), con unos valores medios de concentración de fenol de 18.4±5.8 y 15.5 ±4.3 mg/l respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones (p= 0.1542).

Investigación de Fondo

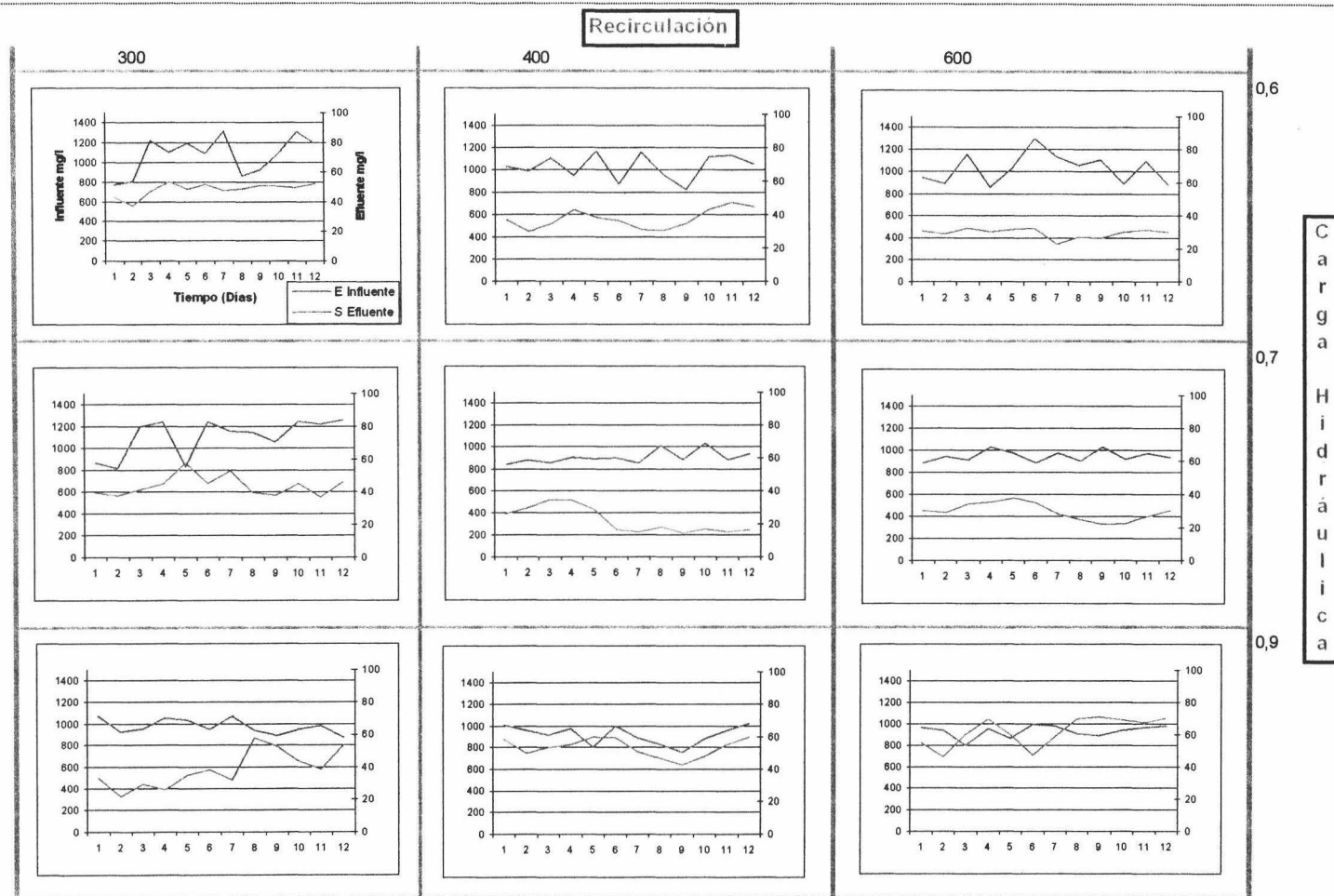


Figura 8.15.- Variación de las concentraciones del fenol del influente y efluente del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

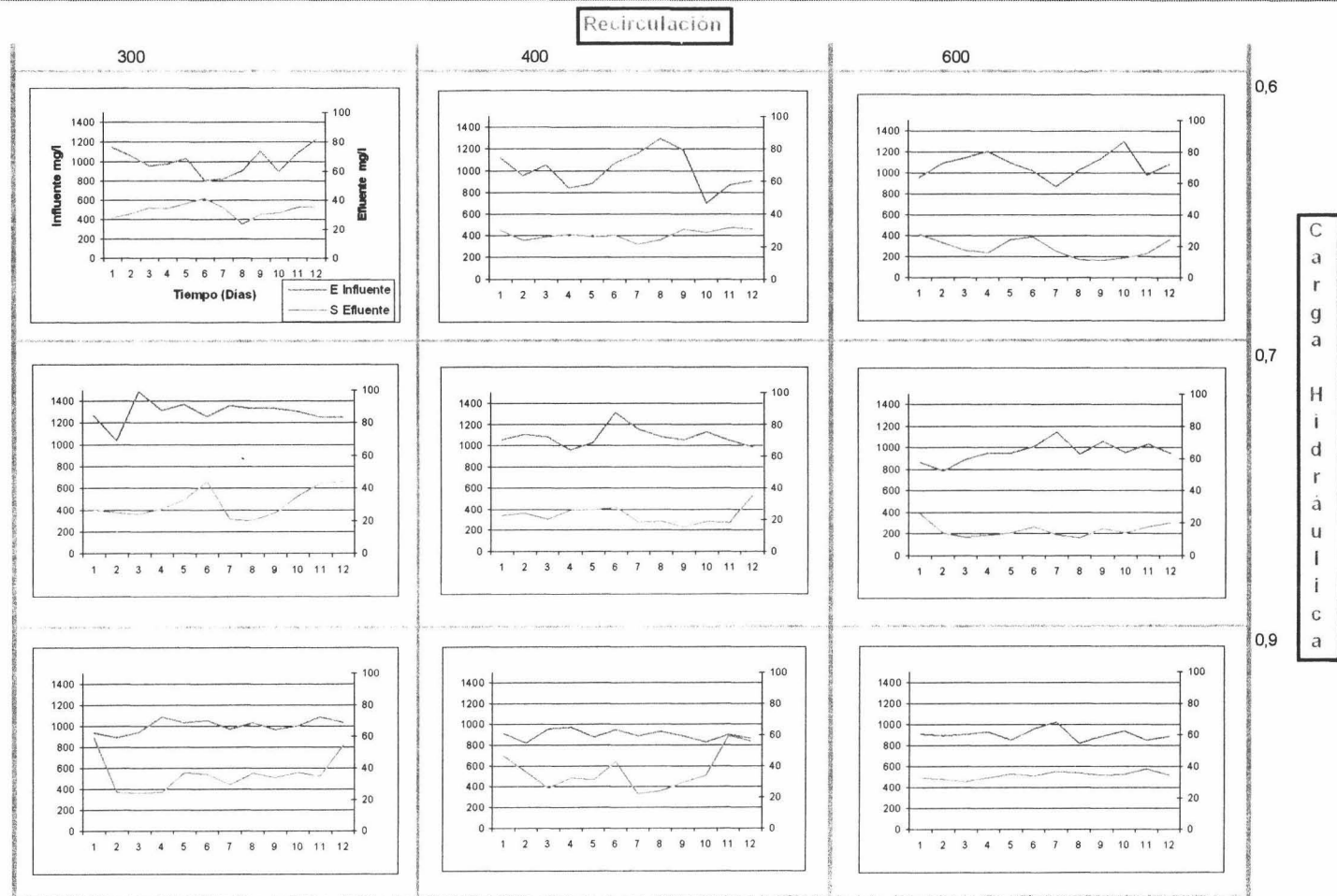


Figura 8.16.- Variación de las concentraciones del fenol del influente y efluente del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m^3/m^2 día) para una aireación de $13.6 m^3/m^2$ hora.

Además como refleja la figura 8.17 bajo las condiciones de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, carga de aire de proceso de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora un aumento en la recirculaciones ensayadas influyeron de forma significativa (tabla 8.9) en el rendimiento de eliminación de los compuestos fenólicos, de manera que mayores recirculaciones implicaron aumentos en el rendimiento. De esta manera las condiciones con las que se obtuvieron mejores rendimientos fueron con: carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, recirculación de 600% y un caudal de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora, consiguiéndose un rendimiento del $98.4 \pm 0.5 \%$, con valores inferiores a los límites de vertido en media puntual y diaria. En ningún caso se cumplió con el límite recogido para la media mensual.

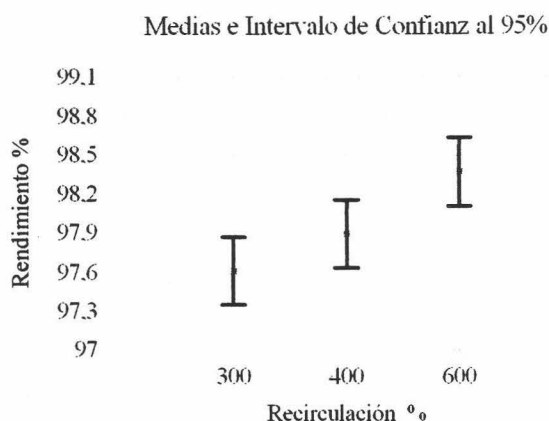


Figura 8.17.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento del fenol respecto a las recirculaciones ensayadas con carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día y de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora.

Tabla 8.9.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de la DQO con la carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día y aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora para las recirculaciones probadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
Recirculación	2	3.51112	1.75501	4.46	0.0194

La fluctuación de las medias de los rendimientos para todos los casos ensayados se encontraron entre el 95-98 %, implicando que el sistema posee una alta capacidad en eliminación de los compuestos fenólicos, aunque siempre se obtuvo una fracción no eliminada de fenol a la salida del sistema. Igualmente se obtuvo una cantidad difícil de eliminar de DQO independientemente de las combinaciones entre variables. Sá y

Boaventura (2001) encontraron que durante el proceso de biodegradación de fenol por *Pseudomona putida* se producían diferentes metabolitos de muy difícil degradación, obteniendo metabolitos carbonados en el efluente incluso con 60 días de tiempo de retención. Es más, observaron que a partir del 5º día en el tiempo de retención hidráulico la concentración del carbono orgánico total (TOC) no variaba para concentraciones menores de 10 mg/l. Esto puede explicar la dificultad para eliminar de forma completa tanto la DQO como los compuestos fenólicos presentes en el influente utilizado en esta investigación.

La buena capacidad del sistema en la eliminación de sustancias fenólicas posiblemente se vió favorecida por las condiciones de sinergia, de consorcios que se forman en las biopelículas para la transformación de sustancias complejas. Los metabolitos de unos microorganismos pueden ser sustrato para otros microorganismos presentes en la misma (Characklis and Wilderer, 1989). Zoh *et al.*, (1999) concluyen en su investigación que muchos compuestos orgánicos que no son biodegradables bajo condiciones aerobias o difícilmente biodegradables en condiciones anaerobias, pueden ser utilizados eficientemente por bacterias desnitrificantes como fuente de carbono.

Jou y Huang (2003), en el tratamiento de efluentes procedentes de una refinería (DQO, 510.0 ± 401.9 mgO₂/l; fenol 30.0 ± 6.3 mg/l) mediante lechos sumergidos obtuvieron un rendimiento cercano al 100% de eliminación del fenol. Según estos mismos autores, los factores que contribuyeron a esos resultados fueron: los MLSS por encima de 8.000 mg/l y la estructura física del material soporte de poliuretano, con una superficie específica de 700 m²/m³ que permitió una alta capacidad de difusión del oxígeno que mantuvo las condiciones aerobias del sistema. Viene a mostrarse la importancia de la presencia de oxígeno disuelto en la eliminación de los compuestos fenólicos, como ha quedado reflejado en esta investigación.

El comportamiento del sistema en la eliminación de fenol fue parecido e igualmente explicable que lo que sucedió con la DQO para las variables carga hidráulica y caudal de aireación de proceso pero no así para la variable recirculación. La similitud de comportamiento pudo ser debida a la relación existente entre la DQO y el fenol, pues

1g de fenol proporciona 2.21 gO₂/l. Sá y Boaventura (2001) recogen que la DBO₅ de una solución de fenol es aproximadamente de 1.5 gO₂ por gramo de fenol. Asumiendo estas equivalencias la concentración de fenol supuso aproximadamente entre el 65 y 50 % de la DQO o DBO₅ presente en el influente respectivamente.

8.4.3.- Eliminación del nitrógeno del sistema.

Al igual que el fenol y la DQO, distintos compuestos de nitrógeno están recogidos en el anexo de sustancias limitantes para su vertido en aguas litorales, y que sirvieron de referencia para estudiar el buen funcionamiento del proceso.

PARÁMETRO	Media Mensual	Media diaria	Valor Puntual
Amoniaco mg /l	60	80	100
Nitratos mg /l	75	100	150

A continuación se analiza como el tratamiento mediante lechos inundados siguiendo un proceso de nitrificación-desnitrificación en pre-desnitrificación se comportó en la descontaminación del efluente con alto contenido en compuestos nitrogenados en medio salino.

Todo el proceso global de eliminación del nitrógeno se basa en la capacidad del sistema de transformar el nitrógeno contenido en el agua a nitrógeno molecular mediante procesos de nitrificación-desnitrificación. Los resultados y transformaciones de los compuestos nitrogenados se reflejan y se obtienen de las figuras 8.18, 8.19, 8.20, 8.21.

En estos procesos la nitrificación es la fase limitante del sistema, los cuales transforman las formas reducidas de nitrógeno a sus formas más oxidadas (nitritos y nitratos); de manera que en orden a la eliminación se activa los procesos de desnitrificación. A continuación se comienza el análisis de resultados por orden de transformación, por la nitrificación o en su caso por la columna aireada.

Las figura 8.20 y 8.21 se muestran las variaciones de las concentraciones de N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ para la distintas combinaciones, en relación a la recirculación

interna(%), carga hidráulica (m^3/m^2 día) y aireaciones probadas (m^3/m^2 hora) en distintos puntos de muestreo del sistema, que coinciden con las entradas y salidas de las dos columnas que componen el sistema. Como se puede observar, en la columna aireada (del punto 120D al punto S) se produjo la oxidación del amonio y la formación de nitrato siendo estas mayores conforme se aumentó la aireación y la recirculación.

Mientras que en la columna anóxica (del punto MD al punto 120D) lo que se produjo de forma general fue la amonificación y la eliminación del nitrato.

Entrando más en detalle, como se refleja en la siguiente figura 8.22, el rendimiento en eliminación de amonio en la columna aireada se vió influenciado fuertemente por la aireación independientemente de las demás variables, coincidiendo de forma paralela este comportamiento con la formación de nitrato en la misma columna. Esto justifica la dependencia de la fase II de la nitrificación a la fase I de la nitrificación, y ambas a la presencia de oxígeno disuelto (Hsieh *et al.*, 2003). Con un caudal de aireación de $13.6 m^3/m^2 h$ se consiguieron valores medios de oxígeno disuelto en la columna aireada de $5.8 mgO_2/l$ con rendimientos medios de reducción de amonio de 68 %. Para el caudal de aire de $6.8 m^3/m^2 h$ de la concentración media de oxígeno disuelto fue de $4.7 mgO_2/l$ con una reducción media del 58 % de amonio. Para ambos caudales de aireación existiendo diferencias estadísticamente significativa (Tabla 8.10) para la reducción de amonio.

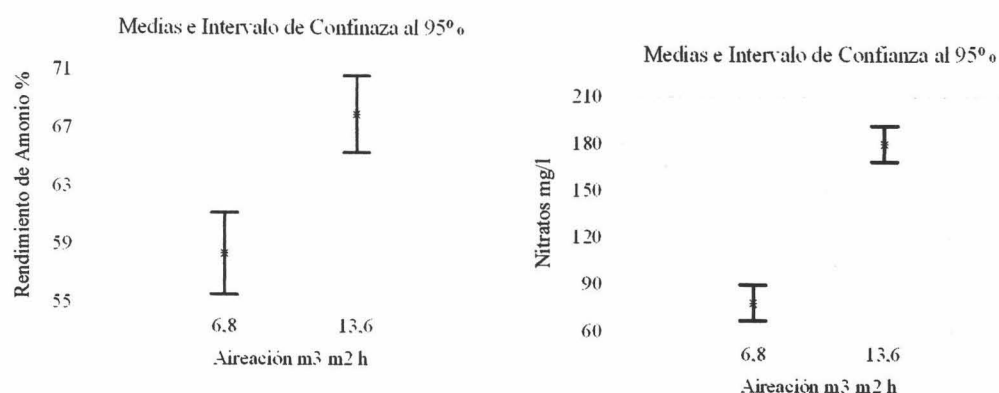


Figura 8.22.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento del amonio y formación de nitratos en la columna aireada con respecto a la aireación de proceso.

Investigación de Fondo

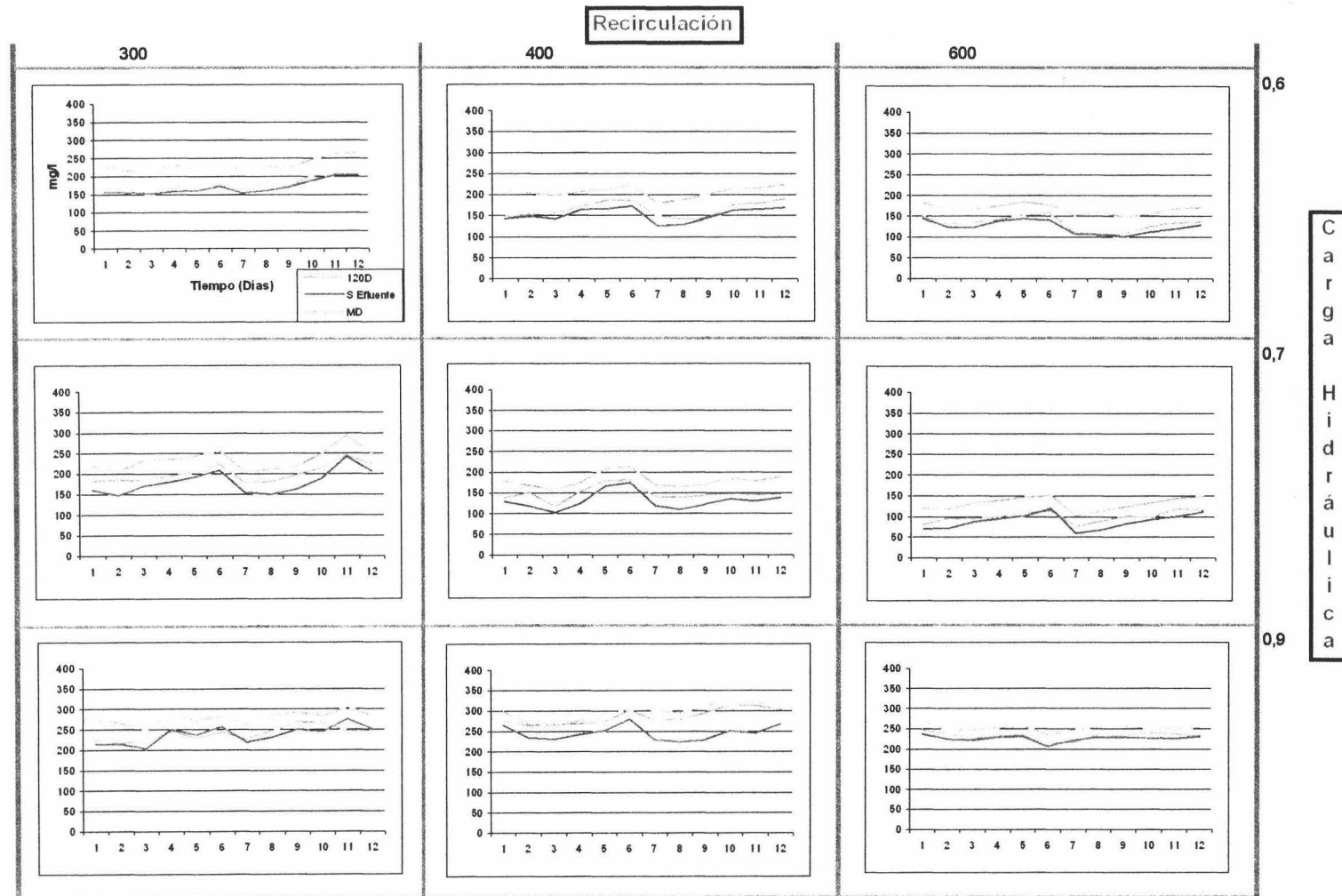


Figura 8.18.- Variación de las concentraciones de **Nitrógeno Total** con respecto a la entrada y salida de las columnas del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la **recirculación interna (%)** y **carga hidráulica (m³/m² día)** para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

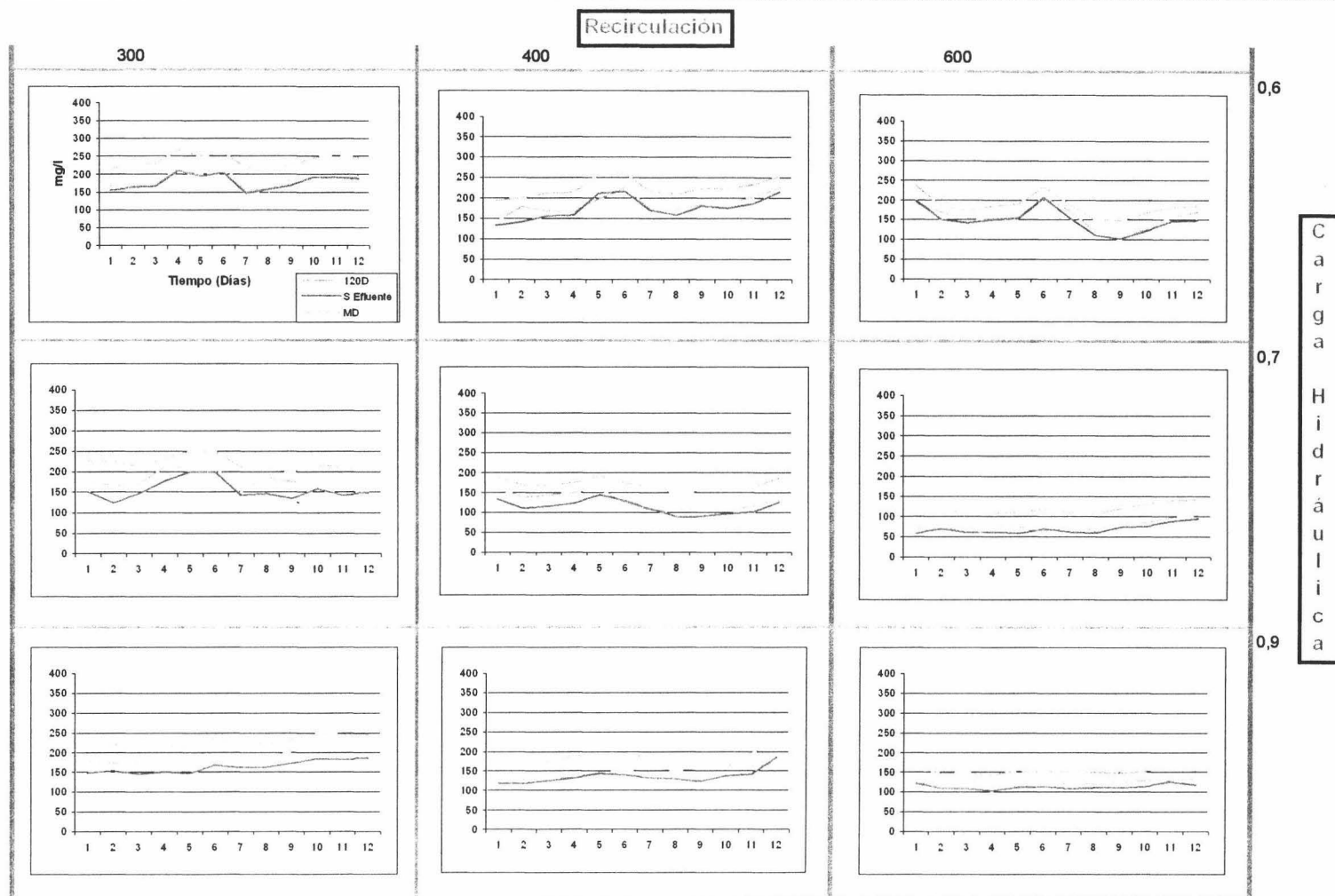


Figura 8.19.- Variación de las concentraciones de **Nitrógeno Total** con respecto a la entrada y salida de las columnas del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la **recirculación interna (%)** y **carga hidráulica (m³/m² día)** para una aireación de 13.6 m³/m² hora.

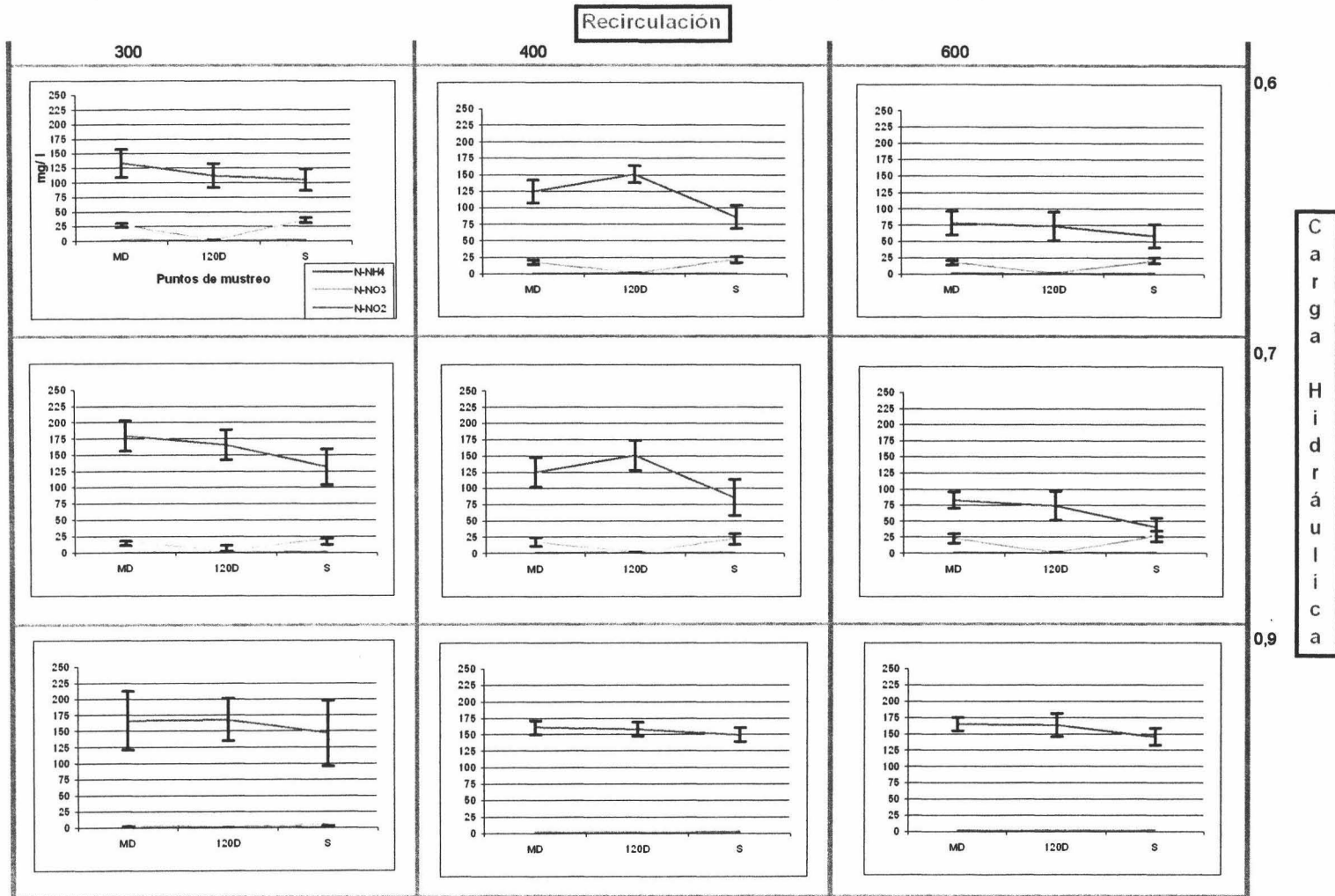


Figura 8.20.- Variación de las concentraciones de $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m^3/m^2 día) en distintos puntos de muestreo del sistema para una aireación de $6.8 m^3/m^2$ hora.

Investigación de Fondo

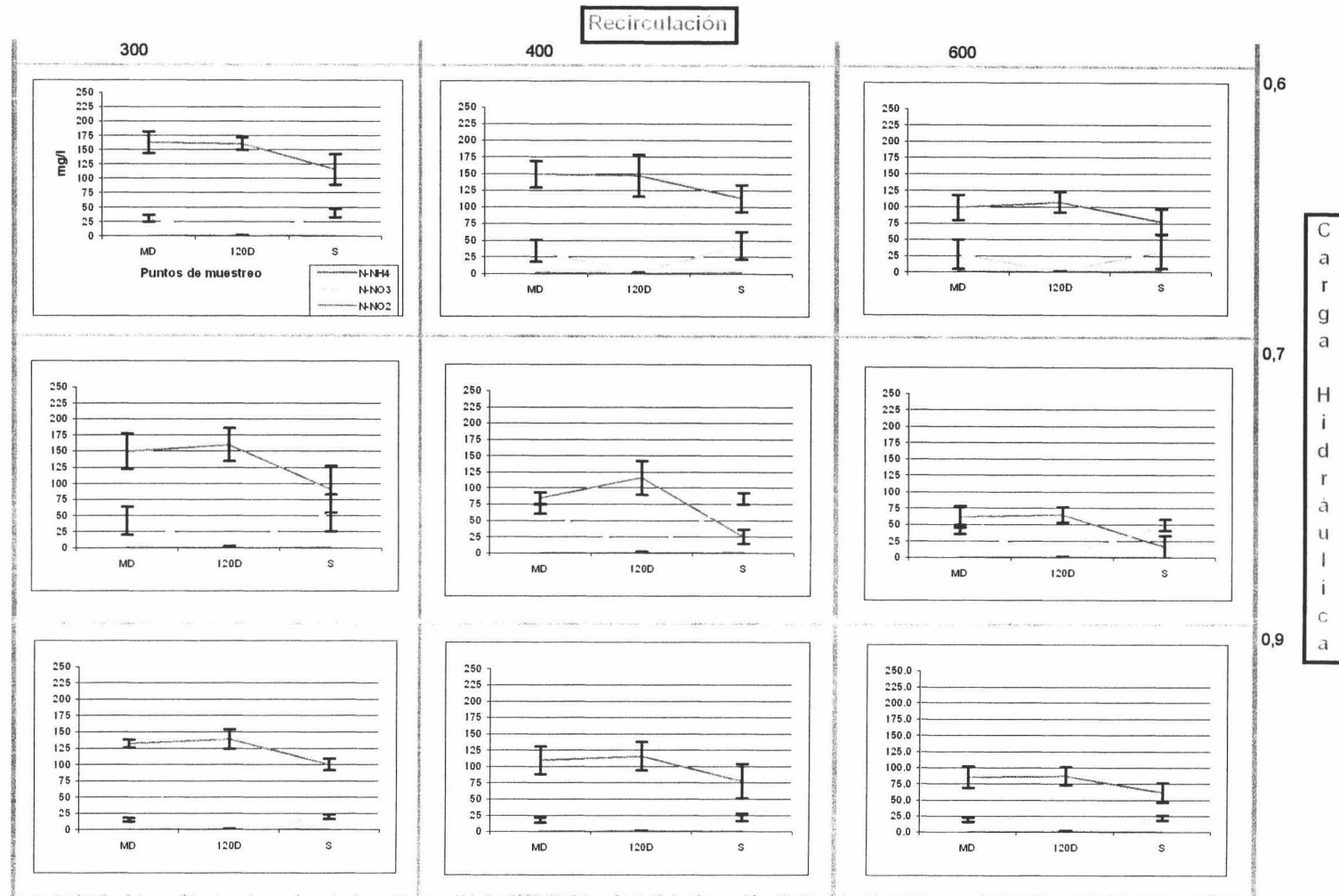


Figura 8.21.- Variación de las concentraciones de $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna(%) y carga hidráulica (m^3/m^2 día) en distintos puntos de muestreo del sistema para una aireación de $13.6 m^3/m^2$ hora.

Tabla 8.10.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de amonio y formación de nitratos en la columna aireada para la aireación de proceso.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. Elim. Amonio	1	4663.7	4663.7	12.02	0.0006
Nitratos	1	557427.0	557427.0	76.5	0.0000

De forma proporcional un aumento en la aireación supuso independientemente del resto de variables probadas una producción de nitrato demostrando la fuerte influencia de la aireación (tabla 8.10) y así presencia de oxígeno disuelto en el proceso de nitrificación, consiguiéndose casi triplicar la formación de nitrato al pasar de 6.8 a 13.6 m³/m² h el caudal de aireación de proceso.

En cambio, la influencia de la carga hidráulica en la oxidación del amonio y formación de nitrato siguió teniendo el mismo comportamiento ya analizado para la eliminación de DQO y Fenol. La variable influyó significativamente (Tabla 8.11) tanto en la oxidación del amonio como en la producción de nitrato pero no de forma proporcional. Con la carga hidráulica de 0.7 m³/m² día (figura 8.23) se obtuvieron los mejores resultados en la columna aireada para el proceso de nitrificación, independientemente del resto de variables.

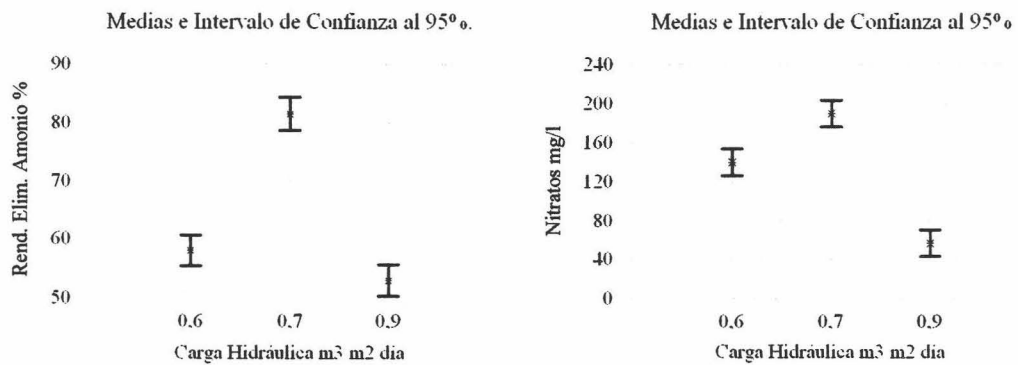


Figura 8.23.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento del amonio y formación de nitratos en la columna aireada con respecto a la carga hidráulica.

Tabla 8.11.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de amonio y formación de nitratos en la columna aireada para la carga hidráulica.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Rend. Elim. Amonio	2	30036.7	15018.4	59.92	0.0000
Nitratos	2	641138.0	320569.0	46.3	0.0000

Como muestra la figura 8.24, las menores concentraciones de amonio a la salida de la columna aireada, y así los mejores resultados en la nitrificación Fase I, se obtuvieron con la carga hidráulica $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ y $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ h}$ de aireación y con las recirculaciones internas de 400 y 600%. Como se observa en la figura 8.25, la variable recirculación afectó significativamente a la oxidación del amonio con diferencias estadísticas (Tabla 8.12) independientemente del resto de variables, siguiendo una tendencia lineal ($y=-0.2286x+2212.71$) con una $r^2= 0.9672$, al aumentar el tiempo de contacto con el oxígeno disuelto presente en la columna. Según Hanaki *et al.*, (1989) el aumento de tiempo de retención hidráulico descende la competencia por el oxígeno heterotrófica favoreciendo el crecimiento nitrificante y así la oxidación del amonio. El aumento en el caudal de aireación influyó significativamente en la oxidación del amonio bajo las mismas condiciones de ensayo. La línea morada indica las condiciones a partir de las cuales se cumplió con la limitación de vertido para el amonio.

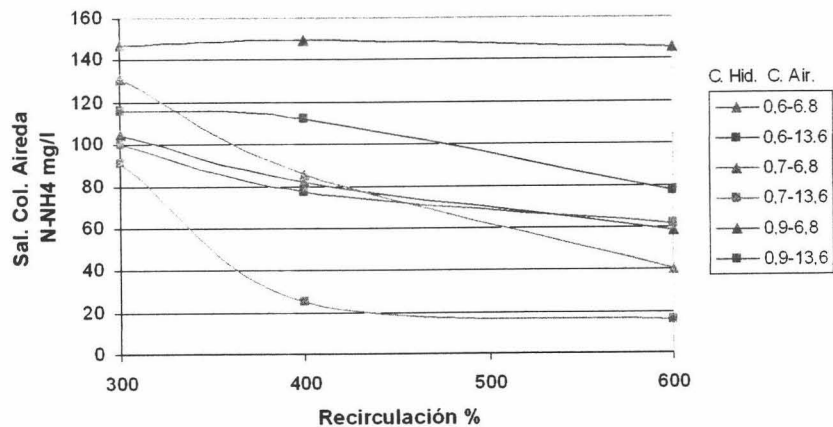


Figura 8.24.- Variación de las concentraciones medias de N-NH_4^+ a la salida de la columna aireada en relación a la recirculación, carga hidráulica y caudal de aire de proceso.

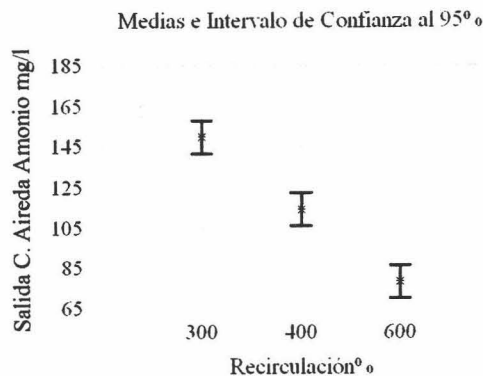


Figura 8.25.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando la concentración de salida de amonio de la columna aireada o sistema y la recirculación

Tabla 8.12.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de amonio y formación de nitratos en la columna aireada para la carga hidráulica.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Recirculación	2	182595.6	91297.5	36.67	0.0000

Las condiciones con las que se obtuvieron mejores resultados para la nitrificación fase II fueron semejantes que con la fase I, mostrando la interrelación de la oxidación de amonio (Fase I) con la oxidación de nitrito a nitrato (fase II) (Barber and Stuckey, 1999).

Bajo las condiciones de carga hidráulica 0.9 m³/m² día, carga de aireación de 6.8 m³/m² h la concentración de nitrato fueron menores con respecto a todas las recirculaciones ensayadas (figura 8.26), coincidiendo precisamente con las condiciones que dieron peores resultados en la nitrificación fase I, menor aireación y mayor carga hidráulica de las ensayadas.

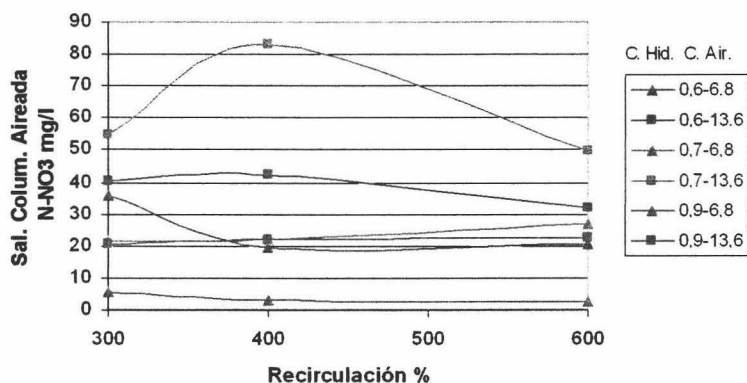


Figura 8.26. Concentraciones medias de N-NO₃⁻ a la salida de la columna aireada en relación a la recirculación, carga hidráulica y caudal de aire de proceso.

Como se ha podido reflejar la aireación y directamente el oxígeno disuelto influyeron de manera principal en la fase de nitrificación llevada a cabo en la columna aireada, el oxígeno es un elemento esencial para la nitrificación y crecimiento de las bacterias responsables (Bitton, 1994). Baber y Stuckey (1999a) determinaron en su investigación el efecto del oxígeno en la nitrificación manteniendo un caudal de oxigenación de 1,2 l/min. mientras la presión parcial del oxígeno se alteraba. Observaron una tendencia lineal que demostraba que la eliminación de amoníaco se había mejorado gracias al aumento en la concentración de oxígeno, como se muestra en la ecuación:

$$NH_{3\text{eliminado}}(\text{mg/l}) = 108,76 \times P_o + 75$$

Donde P_o es la presión parcial del oxígeno (atm). El equilibrio entre el gas y las fases acuosas se asumió debido a los experimentos de transferencia de oxígeno con *pellets* procedentes de biopelículas nitrificantes (Rostron, 1998).

Basándose en los cálculos de la producción de McCarty (1971) las bacterias del genero *Nitrosomonas* requieren 2,74 mg O_2 /mg de amoníaco, mientras que las bacterias del genero *Nitrobacter* sólo necesitan 0,94 mg O_2 /mg de nitrito. Pero los requisitos de oxígeno de los dos tipos de bacterias serán ligeramente inferiores a los calculados debido a la evolución del oxígeno por la fijación del dióxido de carbono. (Sharma y Ahlert, 1977). Esto viene a indicar la necesidad de concentraciones de oxígeno superiores inicialmente de 3.68 mg O_2 para oxidar un mg de amonio a nitrato. Por otro lado, la disponibilidad de oxígeno se ve normalmente limitada por el transporte de masa en la mayoría de las condiciones (Beccari et al., 1992), y normalmente tiene una distancia de penetración en la biopelícula de 0,1 a 0,2 mm con coeficientes de difusión de aproximadamente el 66% de los del agua para las células en suspensión libre (Lazarova et al., 1998). Furamai y Rittman (1994) describieron disminuciones en las poblaciones de nitrificantes y aumentos en las concentraciones en el efluente de $N-NH_4^+$ y $N-NO_2^-$ una vez que la concentración de oxígeno disuelto caía por debajo de aproximadamente de 3 mg/l en sistemas de biopelícula fija.

En la misma investigación Baber y Stuckey (1999a), cuando doblaron, como en nuestra investigación, las concentraciones de oxígeno en el reactor, el incremento paralelo en los niveles de nitrito y de nitrato fue indicativo. La respuesta a los niveles

incrementados de oxígeno fue muy rápida y sugirió que el oxígeno era un sustrato limitante para las bacterias *Nitrosomonas* quimiolitotróficas; esto es coherente con las limitaciones en la difusión de oxígeno en el *biopellet*. Beccari et al., (1992) mostraron que el factor de efectividad (eliminación actual/ eliminación intrínseca) era altamente dependiente de la profundidad del OD y del *pellet*. Según Baber y Stuckey (1999a) las limitaciones en la difusión, incrementaban claramente los valores de la constante de transferencia del oxígeno, que estimaron en el rango de los 3,5 a los 5,65 mg/l para los *pellets* utilizados en su investigación. Para nuestro caso, con rangos entorno a 5.8 mg O₂/l de oxígeno disuelto en el medio acuoso se obtuvieron condiciones de transferencia de oxígeno hacia el interior de la bipelícula que permitió una nitrificación casi completa, ya en función del resto de variables. Claramente el orden de magnitud fue mayor que los utilizados para las bacterias en suspensión libre (Hunik et al.,1994; Strenstrom and Song, 1991). Pero hay que tener en cuenta, en función de rangos de sistemas de tratamiento, que los lechos sumergidos requieren tres veces menos de volumen de aireación que los fangos activos, y 20 veces menos que los lechos bacterianos (Smith and Ardy, 1992). Por otro lado, las concentraciones medias de oxígeno disuelto (5.8 mg O₂/l) con las que se obtuvo rendimientos de nitrificación elevados se alcanzaron con un caudal de aireación de 13.6 m³/m²h. Pujol et al., (1998) demostró que la ventaja y posibilidad para incrementar los flujos de aire en los sistemas de filtros sumergidos hasta 35 m³/m² h. mejora la transferencia y la capacidad de tratamiento de estos sistemas.

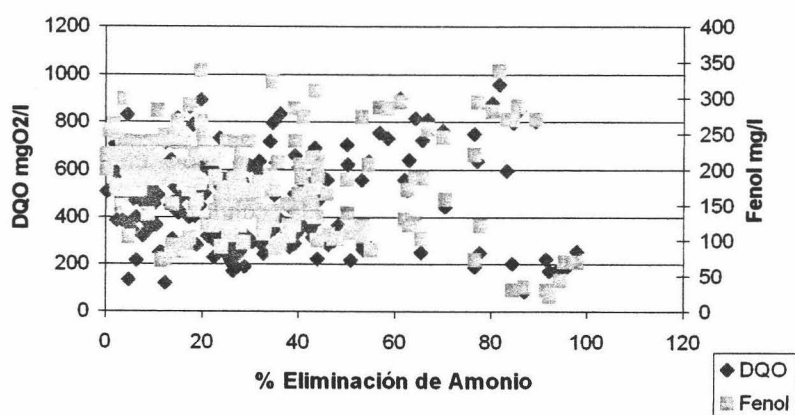


Figura 8.27.- Influencia de la DQO y fenol sobre el rendimiento en eliminación de amonio en la columna aireada.

Las altas concentraciones de DQO estimulan el crecimiento de bacterias heterotróficas compitiendo con los nitrificadores quimiolitotróficos por los sustratos

básicos, el amoníaco y el oxígeno (Sharma y Ahlert, 1977). En esta investigación la naturaleza de la DQO estuvo constituida como ya se ha comentado por los compuestos fenólicos, cuya presencia pueden inhibir la nitrificación (Yamagishi *et al.*, 2001). Como refleja la figura 8.27 no se pudo establecer una correlación, debido posiblemente a los numerosos cambios de variables que se veían alterados durante el periodo experimental, de manera que no se pudo observar la inhibición de la nitrificación con una DQO entre 60 y 1000 mg O₂/l aproximadamente (media de 160 mg O₂/l). Sin embargo, Hanaki *et al.*, (1989) descubrieron una inhibición moderada de la nitrificación con una concentración de DQO entre 160 y 500 mg O₂/l en fangos activos para tiempos de retención de menos de 7 días. Las discrepancias entre este trabajo y los hallazgos de Hanaki *et al.*, (1989), puede implicar que la inmovilización de los nitrificantes en biopelículas fijas proporcionó algún tipo de protección contra estas sustancias y bacterias heterotróficas. El aumento de tiempo de retención hidráulico ha sido utilizado con éxito para que descienda la competencia heterotrófica (Hanaki *et al.*, 1989). A pesar de ello, mantener el correcto estado de funcionamiento la columna anóxica es importante para la eficacia potencial de la fase de nitrificación. Si los compartimentos anaerobios fallaran, la eficiencia en la eliminación de DQO descendería dando lugar a la entrada de mayores concentraciones en la fase de nitrificación y posibles efectos sobre su actividad (Barberan Stuckey, 1999a).

Como se puede observar en las figura 8.18 y 8.19 en la columna aireada hubo eliminación de nitrógeno, con una media para todas las combinaciones posibles de 4±3.3 siguiendo una distribución de según frecuencias como indica la figura 8.28.

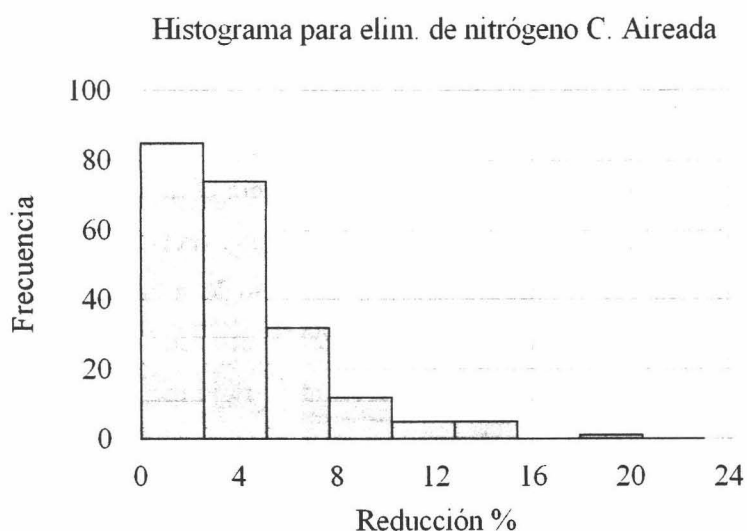


Figura 8.28.- Histograma para la eliminación de nitrógeno total en la columna aireada.

Las posibles justificaciones de dicha eliminación pudieron ser debidas a:

1. Por reducción asimilativa por parte de la microbiota presente en la biopelícula para la formación de estructuras celulares. Según Degremont (1991) 2-4 % de nitrógeno que entra en un sistema biológico es asimilado, y retirado del sistema de lechos sumergidos por medio de la biopelícula arrastrada en el lavado.
2. Debido a las características de la biopelícula y mas concretamente a su crecimiento, pueden coexistir zonas aeróbicas con anóxicas, donde se pueden llevar a cabo procesos de nitrificación-desnitrificación, ya que existen las condiciones necesarias para realizarse: presencia de nitratos, anoxia y fuente de carbono (Hyungseok, 1999). Con esta idea muchos autores (Kuenen and Robertson, 1994; Fuerhacker *et al.*, 2000; Chui *et al.*, 2001; Puznava *et al.*, 2001; etc) realizaron simultáneamente con una misma comunidad microbiana nitrificante-desnitrificante.
3. En las últimas décadas se ha aceptado que algunas bacterias son capaces de realizar simultáneamente respiración con oxígeno y nitrato, proceso llamado desnitrificación aeróbica (Anderson and Levine, 1986 y Lloyd *et al.*, 1987).
4. Por adsorción de iones de iones cargados positivamente, como el ion amonio hacia el biofilm (Wik, 1999). Aunque esta adsorción no afecta a la concentración del este ion cuando se alcanza condiciones estacionarias.

Aumentar la carga hidráulica y de esa manera el flujo, independientemente de el resto de variables, puede suponer mejorar la difusión (Peladan *et al.*, 1997) de la DQO entrante en la columna aireada mejorando el contacto de la fuente de carbono y nitrato en el interior de la biopelícula. De Beer (1997) demostró desde el punto de vista microscópico como el incremento en velocidad de flujo mejora la transferencia entre la fase líquida y la biopelícula. A baja carga hidráulica la DQO puede ser consumida rápidamente al principio de la columna aireada donde además no hay presencia de nitrato,

una mayor carga hidráulica aumenta el flujo pudiendo llevar la DQO a una altura mayor de la columna donde hay presencia de nitrato y anoxia en el interior de la biopelícula.

Como se puede observar en la figura 8.29, el aumento de la carga hidráulica aumenta la eliminación de nitrógeno en la columna aireada independientemente del resto de las variables y de una forma estadísticamente significativa (Tabla 8.13). Además este comportamiento de eliminación se ve favorecido con diferencias significativas pero de forma inversamente proporcional con el caudal de aire de proceso. Un menor caudal de aire de proceso disminuye la concentración de oxígeno favoreciendo las condiciones anóxicas en el interior de la biopelícula y así la desnitrificación.

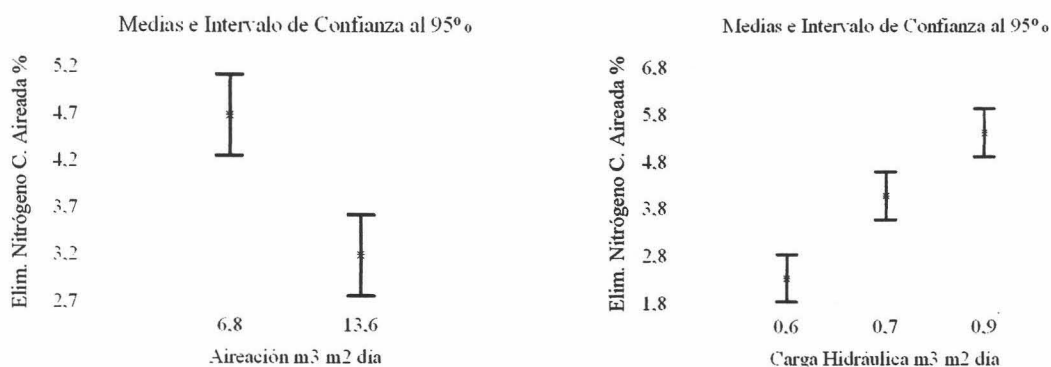


Figura 8.29.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento del nitrógeno total en la columna aireada con respecto a la aireación de proceso y carga hidráulica.

Tabla 8.13.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento del nitrógeno total en la columna aireada para la carga hidráulica y la aireación de proceso.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
Carga Hidráulica	2	339.451	169.726	18.04	0.0000
Aireación	1	119.748	119.748	11.52	0.0008

Por lo expuesto y según los resultados y porcentajes la eliminación del nitrógeno en la columna aireada puede corresponderse en la mayor parte de los casos por asimilación y el resto por asimilación-desnitrificación.

Una vez la fase de nitrificación ha sido analizada y discutida, a continuación se va a analizar y discutir el proceso de **desnitrificación**, o en su caso, lo que ocurrió desde el punto de vista de proceso en la columna anóxica.

En la siguiente figura 8.30 se refleja el comportamiento del rendimiento del proceso de desnitrificación, entendido como la capacidad de eliminación de nitrato y nitrito que entra en la columna anóxica, con respecto a las variables ensayadas de forma independiente.

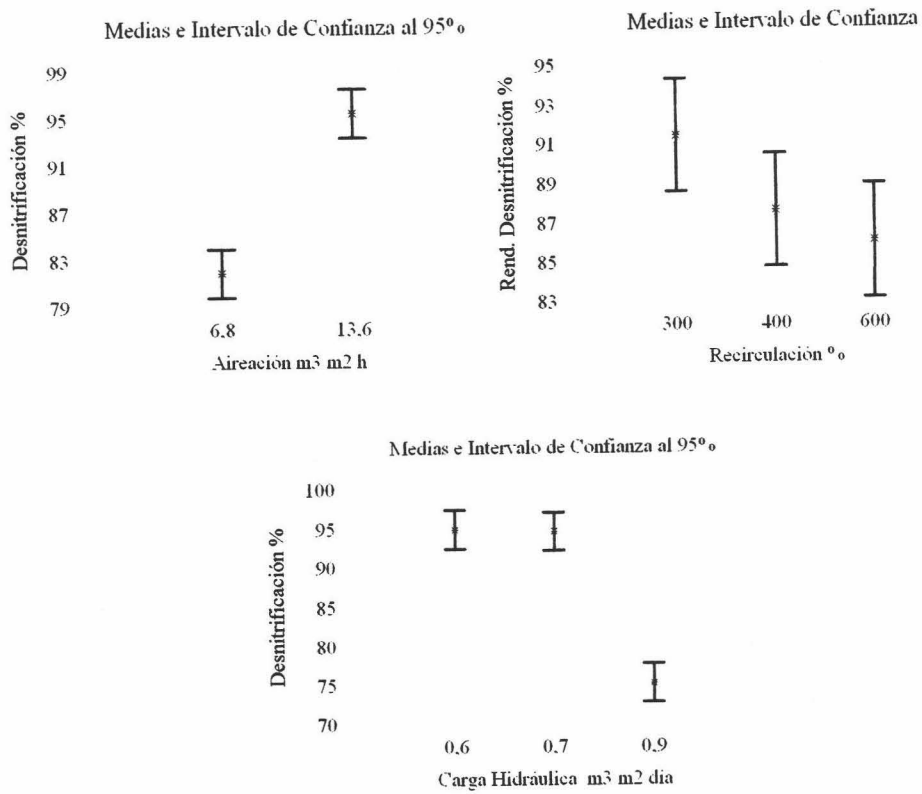


Figura 8.30.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento de la desnitrificación en la columna no aireada con respecto a las variables ensayadas.

Tabla 8.14.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento de la desnitrificación en la columna no aireada con respecto a las variables probadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
C. Hidráulica	2	18046.3	9023.17	40.60	0.0000
C. Aireación	1	9703.34	9703.34	41.22	0.0000
Recirculación	2	1110.92	555.461	1.84	0.1620

Aplicando el test de las mínimas diferencias significativas, al 95% de confianza a las variables ensayadas de forma independiente (tabla 8.14), se distingue:

1.- Que la aireación influyó de forma significativa sobre la capacidad de la columna anóxica en desnitrificar a través de la influencia que ejerce sobre la fase nitrificante, fase esta que debe proporcionar las formas oxidadas de nitrógeno necesario para el proceso de desnitrificación.

2.- Como se ha venido observando el comportamiento de la carga hidráulica repercute en la actividad desnitrificante, tal que al aumentar el flujo la capacidad se resiente y disminuye su rendimiento de forma considerable al abreviarse con esta acción el tiempo de contacto de las formas oxidadas con la microbiota responsable de su eliminación en el interior de la columna anóxica.

3.- El comportamiento de la recirculación interna, a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.1620$) (Tabla 8.14), si se observó que el aumento de la recirculación supone una disminución en el rendimiento de la desnitrificación, la cual puede deberse a un aumento en la carga hidráulica o a un aumento en la concentración de oxígeno disuelto residual.

En este sentido, según Karschunke y Sieker (1997) el óptimo de recirculación para procesos en pre-desnitrificación se limita a 400-500 % para impedir la inhibición de la desnitrificación causado por el oxígeno recirculado. Ronzano y Dapena (1995) sugieren que la recirculación auxiliar o interna no debe superar el 300%, ya que a mayor recirculación mayor es el riesgo de introducir "oxígeno residual" en el reactor previsto para la desnitrificación. La obtención de energía mediante la desnitrificación es menor que la respiración con oxígeno como aceptor último de electrones, por lo tanto, para las bacterias desnitrificantes si existe presencia de oxígeno disuelto en el medio lo utilizarán preferentemente (Lie and Welander, 1994), de ahí la importancia de eliminación del "oxígeno residual". Posiblemente, este efecto no ha sido tan influyente en esta investigación gracias al aumento en altura de relleno que se introdujo en la fase 3 de la investigación de choque en la columna anóxica con objeto de eliminar el oxígeno presente en el agua de recirculación e impedir su efecto inhibitorio en el proceso de desnitrificación.

Entre los factores que afecta a la desnitrificación biológica se encuentran: temperatura, oxígeno disuelto, relación DQO/Ntotal y la calidad y cantidad de la fuente de carbono. Desde un punto de vista de la cinética de proceso, la relación DQO/NO_x-N y calidad son muy importantes. Por lo tanto, uno de los factores principales a conocer para aplicar el proceso de pre-desnitrificación es determinar la cantidad de carbono orgánico fácilmente biodegradable presente en el influente, así como la capacidad de usar este carbono por el sistema biológico para desnitrificar en condiciones anóxicas.

Como se refleja en la figura 8.31 la influencia de la relación DQO/Nt observados en el ensayo en el rendimiento de eliminación de nitrógeno total del sistema. Para obtener la relación las concentraciones tanto de la DQO como el nitrógeno total se midieron en la zona de mezcla (MD) o parte superior de la columna anóxica. Tal influencia siguió un comportamiento de tipo logarítmico con un factor de correlación de 0.9939 y con diferencias para los grupos estadísticamente significativas (p<0.05) (Tabla. 8.15).

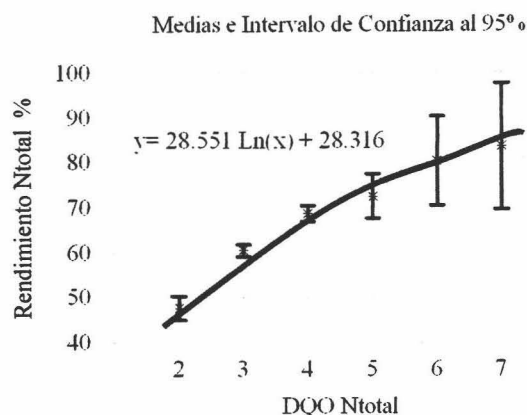


Figura 8.31.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el rendimiento en eliminación del nitrógeno total con respecto a la relación DQO/Nt

Tabla 8.15.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento del nitrógeno total del sistema para la relación DQO/Nt

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
DQO/Nt	5	10545.0	2109.01	20.77	0.0000

Ahora bien, como muestra la figura 8.32 mas del 80% de los ensayos se realizó bajo una condiciones de relación DQO/Nt entre 2 y 4, con una media global de 3.2±0.8.

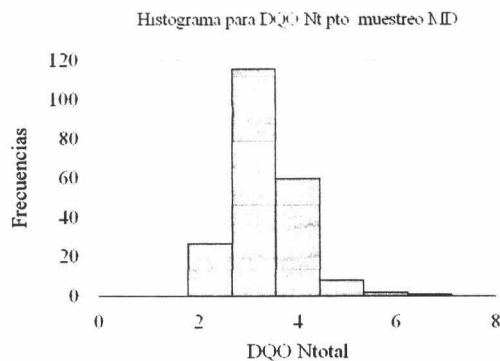


Figura 8.32.- Histograma para la eliminación de nitrógeno total en función de la relación DQO/Nt

En la figura 8.33 se recogen las condiciones de relación de DQO/Nt con que cada combinación entre las variables trabajó. Las relaciones más elevadas se obtuvieron con una carga hidráulica de 0.7 y 0.9 m³/m² día. La relación DQO/Nt en el influente fue de 7.0±1.1 y en ningún caso de los ensayos la relación del influente fue inferior a 5. Como refleja la figura 8.33 la recirculación afectó de forma inversamente proporcional a la relación DQO/Nt, confirmando el efecto dilución de dicha variable a la entrada de la columna anóxica.

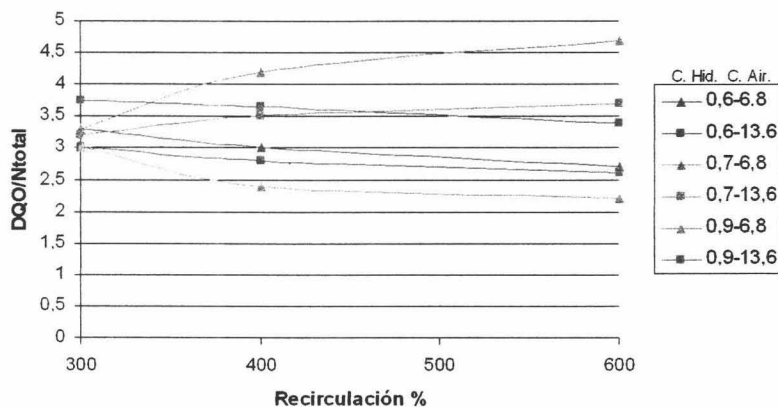


Figura 8.33.- Variación de los valores medios observados de la relación DQO/Nt en relación a la recirculación, carga hidráulica y caudal de aire de proceso

Tseng *et al.*, (1998) indican que para producirse una desnitrificación completa la relación de DQO/Nitrógeno total Kjeldahl del influente debe ser superior a 5.3, acumulándose nitratos y nitritos en el sistema cuando la relación estuvo por debajo de 5.1, con valores más bajos entre 3.7 y 4.3 obtuvieron que la desnitrificación fue incompleta. Hay autores que defienden que para sistemas donde se necesita baja concentración de DQO, la relación DQO/N_{total} debe ser superior a 3.4 para que se elimine

nitrate (Fang and Zhou, 1999). Chiu *et al.*, (1996) basándose en que aproximadamente el 10% del nitrógeno presente en el influente se pierde por asimilación por parte de la biomasa que compone el filtro anóxico, aconseja que la mínima relación de DQO/Nt requerida para una desnitrificación en filtros sumergidos (anóxica/oxica) debe estar entre 5 y 6. Asumiendo estas consideraciones y según la figura 8.32 la mayor parte de las combinaciones provocaron relaciones DQO/Nt en la entrada de la columna anóxica inferiores a las recogidas en otras investigaciones.

Como es sabido, tanto la actividad nitrificación como la desnitrificación modifican el pH del medio donde se realiza, esto es, la formación de nitrato (nitrificación) produce ácido que disminuye la reserva de alcalinidad generando una disminución del pH, mientras que durante la desnitrificación se origina alcalinidad, (Eckenfelder and Musterman, 1995). Ambas actividades se reflejan en la figura 8.34, que según el test anova o análisis de la varianza existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$ al 95% de confianza) para las actividades en relación a la variación de pH que producen dichas actividades en el medio (Tabla 8.16).

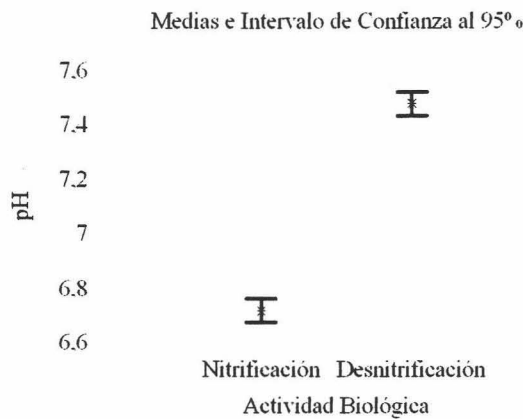


Figura 8.34.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando el pH con respecto a la actividad nitrificante y desnitrificante

Tabla 8.16.- Análisis estadístico realizado para el para la actividad nitrificante y desnitrificante en relación al pH.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
pH	1	61.7386	61.7386	20311.03	0.0000

Durante el tiempo de duración de la investigación tanto de choque como de fondo solo se tuvo que reponer el 10 % del material soporte de la columna aireada, ya que como

se observa en la figura 8.35, el pH de la columna aireada sufrió una disminución poco después de iniciar la fase bajando hasta valores inferiores a 6.0, que podía poner en peligro la actividad nitrificante del sistema (Gray, 1990). Ruiz *et al.*, (2003) en sus experimentos sobre el efecto del pH en el rango ácido de 7,85 a 6,45 no observaron ningún efecto en la nitrificación, pero cuando el pH estuvo por debajo de 6,35 se inhibía completamente la nitrificación. De manera que se procedió a cambiar y reponer el 10% del material soporte y en el mismo momento de añadir el material, el pH de la columna se reguló. Este fenómeno confirma la capacidad reguladora del árido sobre el pH del medio acuoso. Sobre la columna anóxica no se tuvo que tomar medidas al respecto, aunque si se observó un descenso del pH continuado en el tiempo, posiblemente amortiguado por el árido, que no afectó a la actividad desnitrificante.

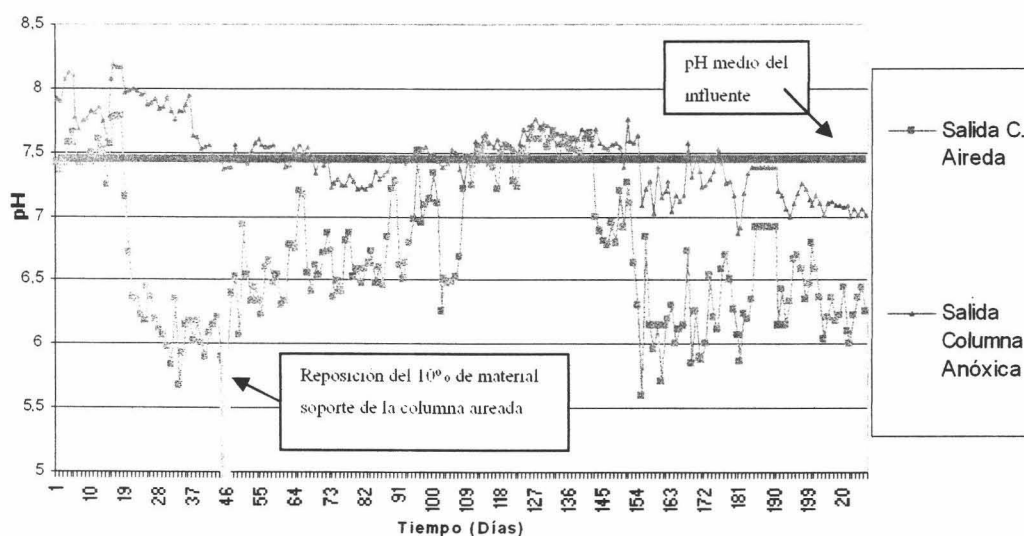


Figura 8.35.- Variación del pH en la columna aireada y columna anóxica durante el periodo de duración de la investigación de fondo.

Hsieh *et al.*, (2003) compararon las variaciones de pH trabajando con un reactor combinado para nitrificación-desnitrificación y otro donde las actividades se realizaron en reactores separadamente. Los resultados indicaron que los valores de pH en el reactor combinado fueron más estables para el proceso de nitrificación-desnitrificación que en el reactor de modo separativo, teniéndose en este último modo añadir carbonato cálcico para controlar la variación de pH. La explicación de la estabilidad del pH en el modo combinado es bien conocida, a saber, la nitrificación consume alcalinidad y reduce el pH en el medio acuoso mientras la desnitrificación hace lo contrario (Sharma and Ahlert, 1977). El modo de trabajo en esta investigación fue de modo separativo pero como se ha

reflejado en los resultados gracias a la capacidad del árido en regular la variación del pH los valores de pH fueron más estables. Trabajar en modo separativo permite una mayor flexibilidad y fiabilidad del proceso, y obtener un rendimiento óptimo de cada una de las actividades microbianas, al favorecer que se pueda eliminar problemas de toxicidad potencial; la materia orgánica biodegradable, puede resultar tóxica para las bacterias nitrificantes, de manera que se puede eliminar en la etapa de oxidación del carbono en la desnitrificación (Metcalf and Eddy, 1995), o reducir el oxígeno disuelto necesario para la nitrificación. Para Hsieh *et al.*, (2003) la interferencia de sustratos entre la nitrificación y desnitrificación generalmente reduce la eficacia en eliminación de nitrógeno durante el tratamiento del agua.

Durante todo el tiempo de la investigación y hasta el momento de cambiar el 10% del árido, se pudo evaluar la capacidad reguladora sobre el pH del árido utilizado como soporte de la biopelícula, en un volumen de agua tratada de 250 veces el volumen de relleno.

La confirmación de la capacidad reguladora del material soporte sobre la variación del pH del medio provocado por la actividad desnitrificante y nitrificante principalmente, permite pensar, inicialmente, sin un estudio económico que lo avale, en la considerable disminución de costes de primera inversión y de explotación así como favorecer la sencillez de control del proceso al no tenerse que estar continuamente analizando el pH. No necesitar un dispositivo y accesorios asociados para añadir sustancias que regule el pH del medio acuoso implicaría un importante ahorro en el tratamiento del influente.

Ya entrando en el análisis global del sistema, las figuras 8.36 y 8.37 reflejan mediante ejes de coordenadas el comportamiento para las recirculaciones internas, cargas hidráulicas y caudal de aire de proceso ensayado en la eliminación del nitrógeno. Se puede observar que a medida que se aumenta la recirculación interna, para ambos caudales de aire de proceso (6.8 y 13.6 m³/m²m h) las concentraciones de salida del nitrógeno total se aproximan cada vez más al eje de abcisas, ocurriendo de igual manera para los caudal de aireación y para las cargas hidráulicas 0.6 y 0.7 m³/ m² día.

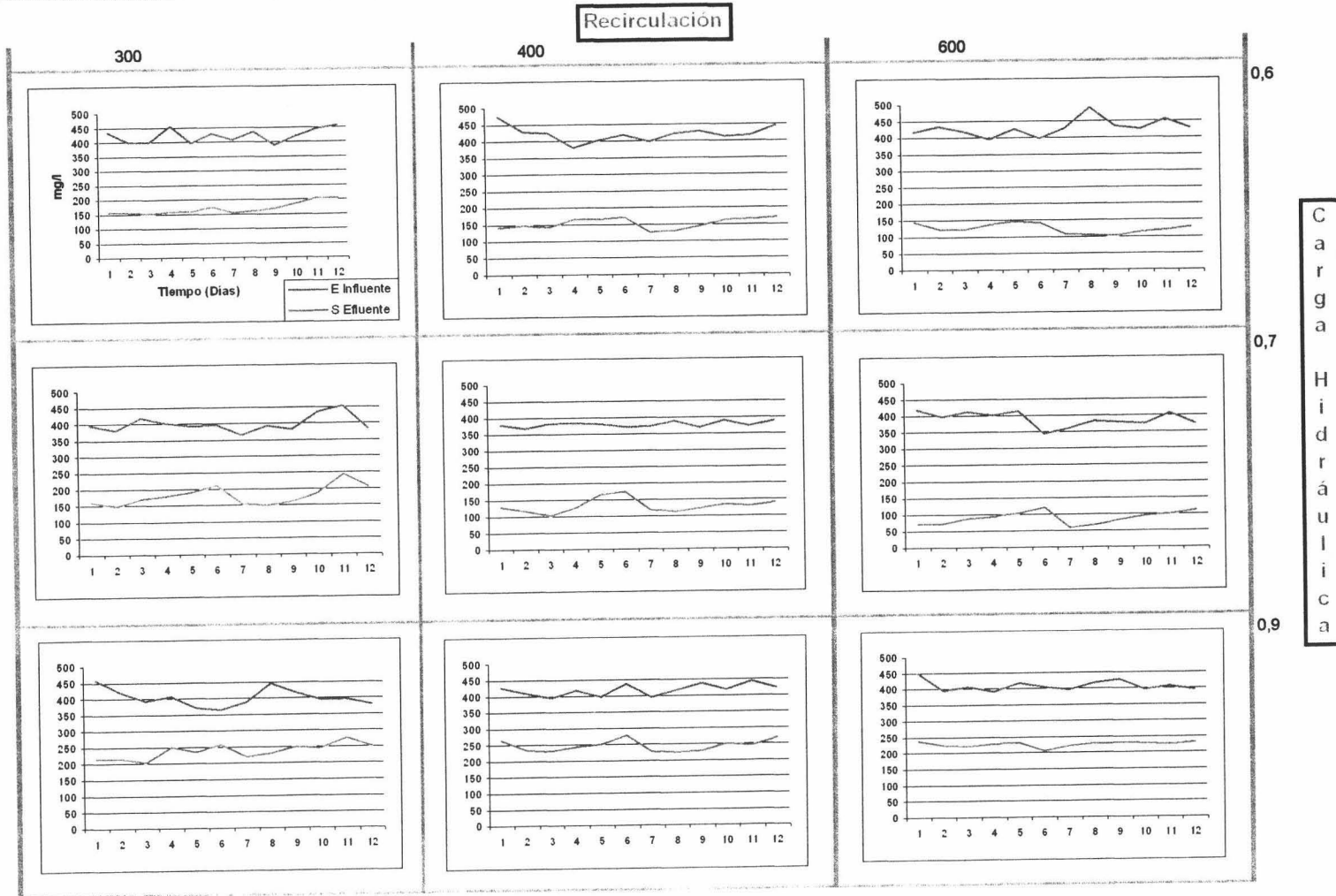


Figura 8.36.- Variación de las concentraciones de **Nitrógeno Total** del influente y efluente del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna (%) y carga hidráulica (m³/m² día) para una aireación de 6.8 m³/m² hora.

Investigación de Fondo

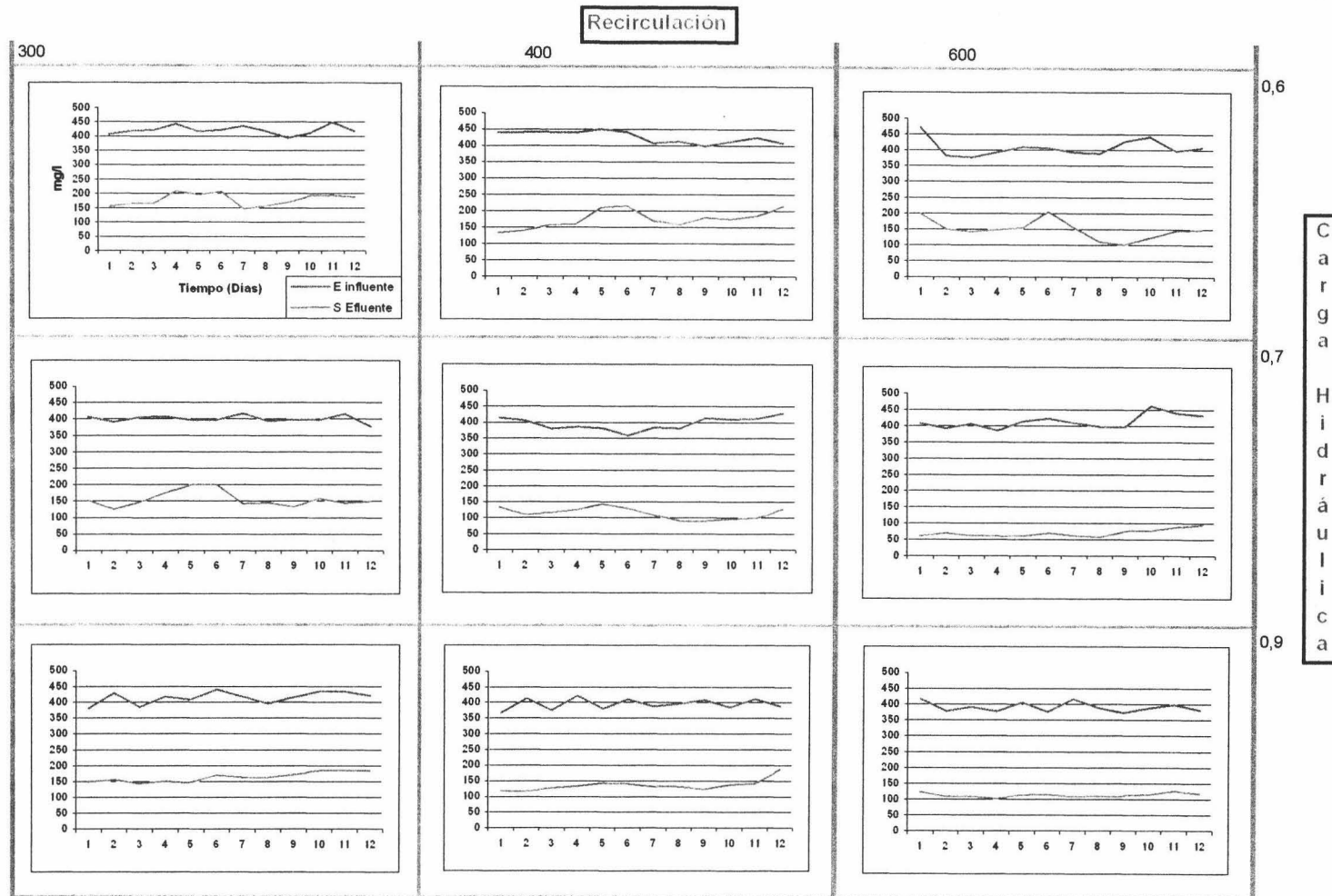


Figura 8.37.- Variación de las concentraciones de Nitrógeno Total del influente y efluente del sistema expresado en mg/l durante 12 días, en relación a la recirculación interna(%) y carga hidráulica (m^3/m^2 día) para una aireación de $13.6 m^3/m^2$ hora

Estadísticamente como se indica en la tabla 8.17, y según el análisis de la varianza existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para la eliminación de nitrógeno total para las tres variables del sistema de forma independiente, siguiendo un comportamiento lineal para la recirculación interna con un factor de correlación de 0.9975 (figura 8.38a). Como ya se ha comentado, aumentar la recirculación supone incrementar el tiempo de retención hidráulico, mejora la transferencia entre la fase líquida y la biopelícula (De Beer, 1997), y por supuesto introduce mayor cantidad de nitrato a la fase desnitrificante a pesar de la pequeña influencia negativa al introducir mayor oxígeno en la columna anóxica (Ronzano and Dapena, 1995; Karschunke and Sieker, 1997), aunque como se ha visto anteriormente para las combinaciones de las variables ensayada no supuso disminuir de forma significativa los rendimientos de la desnitrificación.

Pasar de una aireación de 6.8 a 13.6 m^3/m^2 hora supuso aumentar, independientemente de la influencia de las demás variables probadas, en aproximadamente 8 unidades el rendimiento medio de la eliminación de nitrógeno del sistema (Figura 8.38c).

Al igual que ocurrió en el comportamiento de la DQO, fenol, oxidación de amonio y formación de nitrato frente a la variable carga hidráulica, ese mismo comportamiento se reflejó para la eliminación global del nitrógeno en el sistema. Como refleja la figura 8.38b existió una mejora en el rendimiento con el aumento del caudal (Peladan *et al.*, 1997) de 0.6 a 0.7 m^3/m^2 día, para reflejar con el siguiente aumento 0.7 a 0.9 m^3/m^2 una disminución en el rendimiento, pudiendo mostrar la influencia del tiempo de retención hidráulico en la capacidad del sistema en eliminar el nitrógeno.

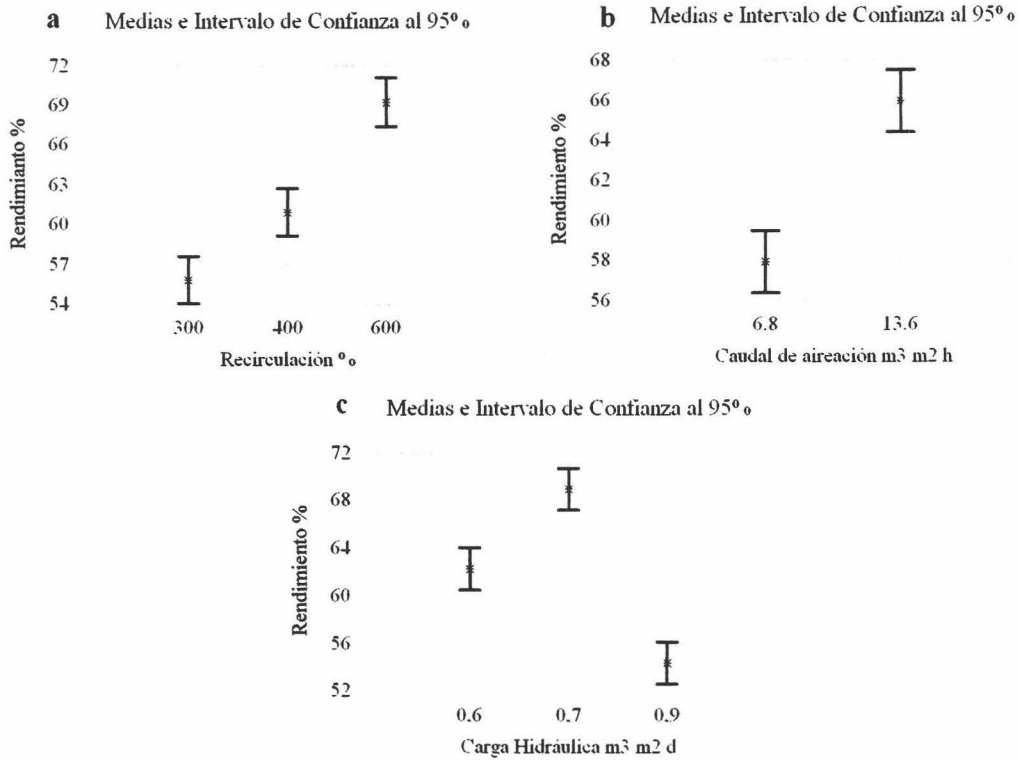


Figura 8.38.- Test de las mínimas diferencias significativas relacionando rendimiento en eliminación del nitrógeno total del sistema respecto de las variables ensayadas.

Tabla 8.17.- Análisis estadístico realizado para el rendimiento del nitrógeno total del sistema para las variables ensayadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación p<0.05
A: C. Hidráulica	2	7546.26	3773.13	33.01	0.0000
B: Aireación	1	3446.87	3446.87	25.9	0.0000
C: Recirculación	2	6457.45	3228.72	27.03	0.0000

La figura 8.39 refleja las condiciones ensayadas para la eliminación global de nitrógeno, y siguiendo los comportamientos indicados con anterioridad para las variables ensayadas. Bajo las condiciones de carga hidráulica 0.7 m³/m² día, un caudal de aireación del 13.6 m³/m² hora y una recirculación del 600 % se obtuvieron los mejores rendimientos del sistema en eliminación de nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas con el resto de combinaciones (Tabla 8.17). En estas condiciones, la reducción media de nitrógeno del sistema fue de 83.2±2.5 % muy

próximo al 85 % que reflejaría el rendimiento máximo teórico por nitrificación-desnitrificación mediante pre-desnitrificación.

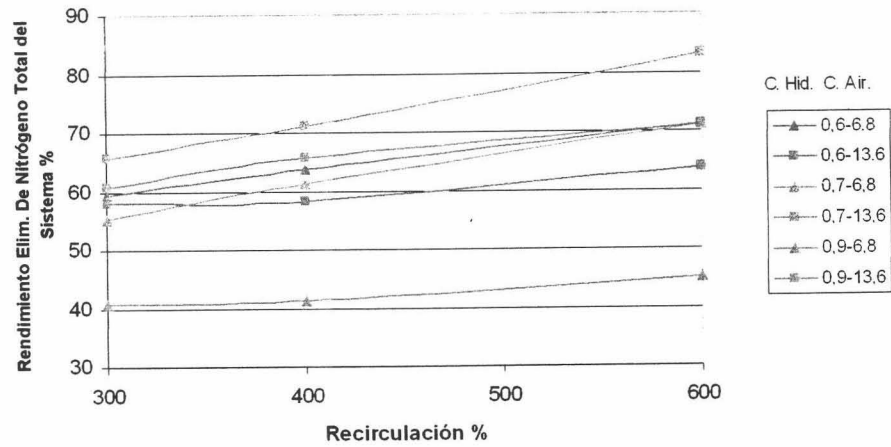


Figura 8.39.- Concentraciones medias de Nitrógeno total del sistema en relación a la recirculación, carga hidráulica y caudal de aire de proceso.

Como se podía esperar el fenol se utilizó como fuente de carbono para la eliminación de nitrógeno por vía biológica desasimilativa. Yamagishi *et al.*, (2001) indicaron que muchos microorganismos aclimatados al fenol pueden utilizarlo como donante de electrones. La degradación de los compuestos aromáticos en condiciones de desnitrificación ha sido estudiada sobre todo con respecto a la biorremediación de la contaminación por gasolina, que se revisó en un artículo (Wilson y Bouwer, 1997). Por otra parte, los desnitrificantes degradadores de fenol han sido ya aislados (Aders *et al.*, 1995; van Schie y Young, 1998), y estudiados en mayor profundidad. Esta es una prueba directa del potencial de los compuestos aromáticos utilizados como donantes de electrones en la desnitrificación, como así a ocurrido en esta investigación.

La tasa de desnitrificación de un lodo aclimatado al fenol se determinó mediante la adición de fenol, metanol, o acetato como donante de electrones (Yamagishi *et al.*, 2001). Se demostró que el fenol funcionaba como donante de electrones eficazmente y que el acetato proporcionaba incluso una tasa de desnitrificación más alta, tres veces mayor a la del fenol. Por otra parte, el metanol que posee la actividad más usual para fomentar la desnitrificación como donante de electrones en los procesos de eliminación de nitrógeno, no estimuló la desnitrificación

en absoluto. Esta es una prueba de que el metanol no siempre funciona eficazmente como donante de electrones en los procesos de desnitrificación, y un donante alternativo de electrones que incluyera sustancias de carbono, podría funcionar más eficientemente para este propósito.

En estas condiciones se trabajó con una relación en DQO/Nt media de 3.8 ± 0.5 , con una eliminación media en la columna anóxica en DQO de 51.7 ± 13.5 y de fenol 56.2 ± 20.7 y una eliminación total del sistema media del 96 y 98 % respectivamente. La eliminación media de nitrógeno en la columna aireada fue del 2.3 ± 0.5 , posiblemente asimilado por la biomasa presente en la columna. Con esta relación de DQO/Nt se obtuvo casi una desnitrificación completa y un rendimiento muy próximo al máximo teórico de 85%, relación que se aproxima a los valores indicados por diversos autores (Chiu *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1998; Fang and Zhou, 1999).

Chiu *et al.*, (1996) consiguieron en su trabajo de investigación utilizando filtros sumergidos para el tratamiento de un agua preparada en laboratorio mediante nitrificación-desnitrificación una eficiencia en la eliminación total de nitrógeno del 88%, superior a la obtenida en esta investigación. Pero hay que considerar una diferencia importante entre investigaciones, tratar un agua residual preparada en laboratorio y un agua residual industrial procedente de un complejo industrial, con la complejidad de distintas sustancias incorporadas al agua, que representan modelos ciertamente diferenciados.

Punzava *et al.*, (2001) con una planta piloto de filtros sumergidos tipo Biostyr® operando simultáneamente mediante nitrificación-desnitrificación en una proporción 60 y 40% en volumen respectivamente (la misma proporción utilizada en esta investigación si no se tiene en cuenta los primeros 20 cm de la columna anóxica), obtuvieron eficiencias en eliminación de nitrógeno entre el 60 y 70 % para un agua residual no sintética, rendimientos inferiores a los obtenidos en esta investigación.

8.4.4.- Lavado del sistema.

En los procesos biológicos, y más concretamente los procesos de biopelícula fija, la biocenosis se fija en la superficie del material soporte creando una capa con alto contenido en agua y gran concentración de biomasa que recubre el soporte. Para que la biopelícula elimine el sustrato del efluente industrial, tanto éste como el oxígeno necesario en la columna óxica, tienen que acceder al lugar donde se va a realizar la reacción biológica, que es donde se encuentran los microorganismos, es decir al interior de la biopelícula. Con la eliminación del sustrato, la biopelícula se desarrolla aumentando en espesor, fenómeno que genera un problema con relación al transporte tanto del sustrato como del oxígeno al interior de la biopelícula y de esa manera una pérdida en el rendimiento del proceso. Santegoeds *et al.*, (1998) estiman que la penetración media del oxígeno está entre los 200 a 400 μm para biopelículas aerobias. Además este crecimiento de la biopelícula supone una obstrucción de los poros creados por el soporte impidiendo el paso del influente, aumentando la pérdida de carga del sistema.

En línea general lo anteriormente expuesto motiva a fijar una frecuencia de lavado, buscando la sencillez en la explotación diaria de una planta depuradora, lo que exige que el lavado tipo debe modificarse con poca frecuencia, pues ha de evitarse introducir la habilidad del operador como variable de proceso.

Es por ello, que el criterio que fundamenta el diseño de los automatismos de los lavados, es la progresiva pérdida de carga que tiene lugar en el seno del biofiltro, en función del tiempo. De este modo, la ocurrencia de un lavado se produce asociada a un fenómeno puramente físico, que tiene en cuenta el deterioro de las condiciones hidráulicas, independientemente del estado en que se encuentre la biomasa en ese momento. Hay que indicar que en esta fase de la investigación la frecuencia de lavado está motivada por la fijación de los días de funcionamiento para cada ciclo, 6 días, para obtener un estudio estadístico homogéneo, a diferencia de las pautas seguidas en la investigación de choque que se fijaba en función de la pérdida de carga obtenida en las columnas. Como se muestra en la figura 8.40, a lo largo del ciclo hay tanto pérdida de

carga como disminución en el rendimiento del sistema en la eliminación global de nitrógeno.

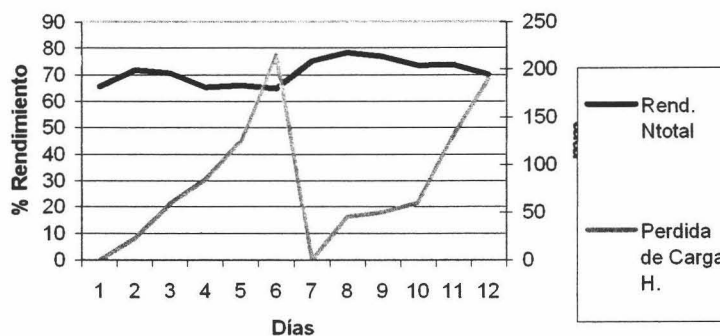


Figura 8.40.- Pérdida de Carga Hidráulica y rendimiento en la eliminación de nitrógeno total bajo las condiciones de $0.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día de Carga Hidráulica , $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día aireación y 600 % de recirculación.

Indicar que las pérdidas de carga se debió fundamentalmente al crecimiento de la biopelícula a la entrada de la columna óxica (Figura 8.41). Crecimiento excesivo al unirse dos circunstancias: existencia de fuente de carbono no degradado en la columna anóxica y oxígeno aportado.

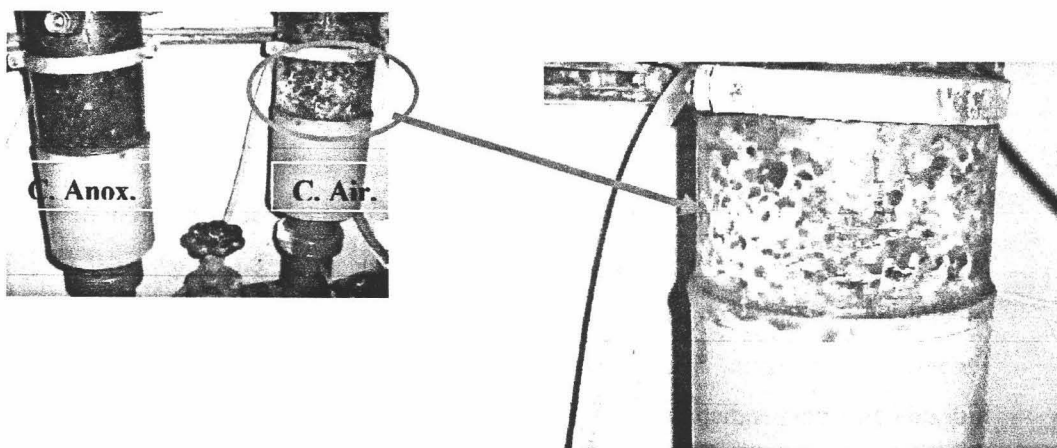


Figura 8.41.- Crecimiento de la biopelícula a la entrada de la columna aireada, causante principal de la pérdida de carga hidráulica del sistema.

Circunstancia esta que puede explicar el comportamiento de la concentración de nitrito a la salida de la columna aireada con respecto a la pérdida de carga. Se observó

que conforme se producía un aumento en la pérdida de carga la concentración de nitrito a la salida de la columna airada aumentaba (Figura 8.42). Furumai y Rittman (1994) describieron $N-NO_2^-$ una vez que la concentración de oxígeno disuelto caía por debajo de aproximadamente de 3 mg/l. La disponibilidad de oxígeno se ve normalmente limitada por el transporte de masa (Amonio, oxígeno etc) en la mayoría de las condiciones (Beccari *et al.*, 1992) y en especial conforme aumenta el espesor de la biopelícula, ello explicaría la relación entre el aumento de la pérdida de carga y el incremento en concentración de nitrito a la salida de la columna aireada. Según Seropian *et al.*, (1989) el atascamiento reduce el flujo de influente a través de la columna, alterando la hidráulica del proceso, produciéndose pérdida de carga hidráulica y como consecuencia una acumulación de nitrito. Este tipo de problemas fuerza al lavado de la columna para mantener el adecuado flujo de agua, siendo el incremento en la concentración de nitrito un indicador de los problema de atascamiento del sistema (Gómez *et al.*, 2001), como así ocurre en esta investigación como se muestra en la figura 8.43.

La figura 8.43 muestra para una condición de trabajo como el aumento de nitrito sigue un comportamiento exponencial en función de la pérdida de carga. Esto ocurrió para todos las combinaciones de variables ensayadas. Gómez *et al.*, (2001) obtuvieron el mismo comportamiento exponencial en función de los días de funcionamiento.

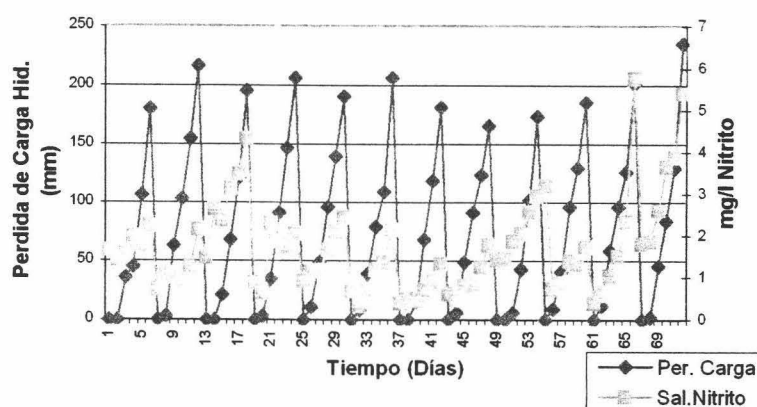


Figura 8.42.- Variación del nitrito a la salida de la columna aireada y pérdida de carga del sistema bajo las condiciones de carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ y posibles combinaciones con la recirculación y caudal de aire de proceso.

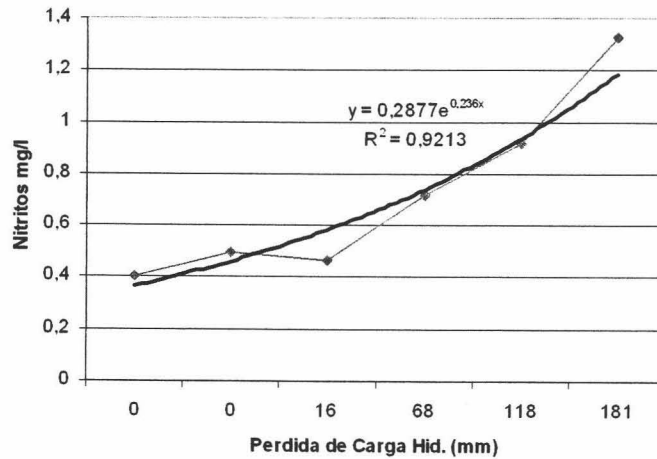


Figura 8.43.- Concentración de nitritos en relación a la pérdida de carga hidráulica bajo las condiciones de trabajo de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día de carga hidráulica, 600 % de recirculación y $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora de aireación.

La tabla 8.18 refleja el análisis estadístico según el test anovan, donde se muestra que solo la carga hidráulica influyó de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el comportamiento de la pérdida de carga de forma directamente proporcional, el aumento de carga hidráulica implicó alturas de pérdida de carga hidráulica superiores, con una altura media al final de cada ciclo de 247 mm.

Tabla 8.18.- Análisis estadístico realizado para la pérdida de carga hidráulica del sistema para las variables ensayadas.

Análisis de la Varianza					
Fuente de variación	g.L	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de Significación $p < 0.05$
A: C. Hidráulica	2	19611.8	14809.9	2.89	0.0476
B: Aireación	1	10009.47	1009.47	0.19	0.6608
C: Recirculación	2	6486.6	3242.33	0.62	0.5387

Más concretamente se puede observar en la figura 8.44 para las condiciones de trabajo donde se obtuvieron los mejores rendimientos en eliminación del nitrógeno total, el comportamiento de la concentración de nitrito con el paso de los días de funcionamiento, en este caso para los dos ciclos de funcionamiento.

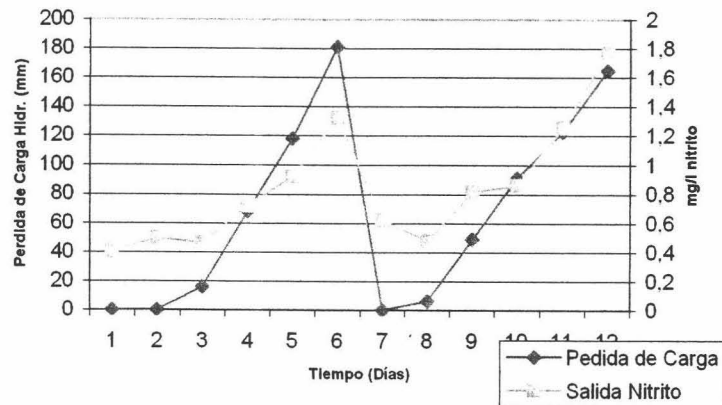


Figura 8.44.- Variación del nitrito a la salida de la columna aireada y pérdida de carga del sistema bajo las condiciones de carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$, 600 % de recirculación interna y $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ hora}$ de caudal de aireación de proceso.

Las pautas de lavado después de cada ciclo de funcionamiento del sistema se realizaron según se indica en la tabla 8.19.

Tabla 8.19.- Pautas de lavado de las columnas anóxica (1) y aireada (2), tras la finalización de cada ciclo de funcionamiento del proceso.

Pauta	Duración		Aporte de agua $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h}$		Aporte de aire $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h}$		Observaciones
	1	2	1	2	1	2	
Esponjamiento con aire	30''	30''			80	80	Se consigue así romper la oclusión del biofiltro.
Lavado con agua y aire	1'	1'	20	30	60	60	Se consigue así arrastrar el exceso de biopelícula elevando el relleno de forma considerable.
Aclarado con agua	1'	2'	20	30			Se consigue así arrastrar el exceso de biopelícula sin elevar el relleno.

Para lavar el material filtrante se utilizó simultáneamente agua y aire, el manual técnico del agua (Degremont, 1991) especifica para filtros de aguas residuales que durante la inyección del aire puede variarse el caudal de agua dentro de un margen muy amplio, manteniéndolo siempre superior a $5 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ h}$, y que cuanto mayor sea este caudal, mas rápido y eficaz será el lavado. Para la fase de aclarado indica aumentar el agua al menos hasta $15 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ h}$. Puede parecer que los valores obtenidos en la investigación

fueron mas elevados, pero como especifica el mismo manual, para filtros biológicos puede hacerse necesario el aumentar e incluso repetir varias veces la secuencia de lavado por la presencia de fango orgánico, más difícil de eliminar que el fango de origen mineral.

La casuística que rige este aspecto de la depuración mediante lechos inundados es muy compleja y, al tiempo, crítica respecto varios condicionantes, a saber:

- Nivel de contaminación del agua de entrada
- Cantidad de sólidos retenidos en el seno del biofiltro
- Estado de la biomasa: nivel de actividad microbiológica, densidad, espesor, etc.

Por tanto, sería necesaria una investigación exclusivamente dedicada al estudio de los lavados para elaborar un modelo, más o menos fiable, que permitiese predecir las necesidades de cada momento, función de las distintas variables y parámetros manejados. De hecho, ésta constituye una de las propuestas como línea de investigación futura.

Tras los lavados se obtuvo la biopelícula arrastrada, y pensando que ésta debe ser separada del agua por operaciones de decantación, sería útil conocer uno de los parámetros que definen la sedimentalidad de la biopelícula, la V_{30} . Tejero, (1998) indica que la biopelícula de estos sistemas tienen claramente una mejor sedimentalidad y densidad con relación a los obtenidos en los fangos activos, posiblemente debida a la ausencia de bacterias filamentosas.

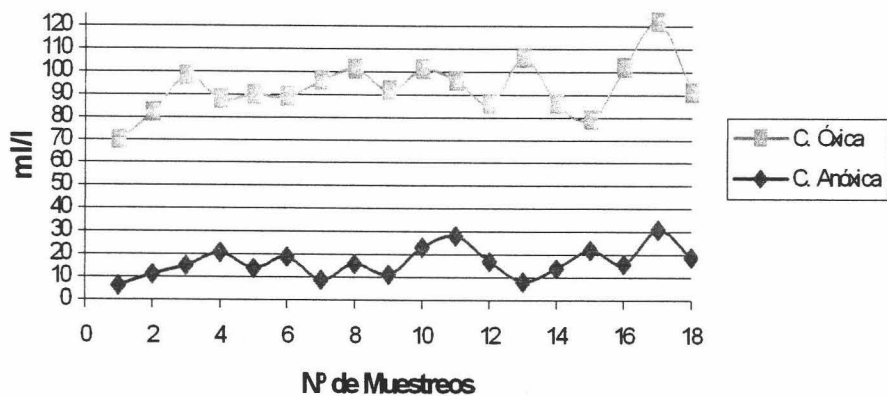


Figura 8.45.- Valores de V_{30} obtenidos tras los lavados de la columnas anóxica y óxica.

Como se observa en la figura 8.45 la V_{30} tanto de la columna óxica como anóxica es de buena a muy buena en todos los casos, se movió entre valores medios de 93 y 16 ml/l respectivamente. Estos valores se consiguieron a tiempos inferiores de 30 min. sin observarse resuspensión de la biopelícula a partir de ese tiempo.

Las figura 8.45 y 46 muestran claramente que las diferencias de sedimentalidad existentes entre la biopelícula que se forma en la columna anóxica y la que se forma en la columna aireada. La altura en ml posiblemente consecuencia de la cantidad y estructura de la biopelícula, siendo la biopelícula procedente de la columna anóxica migajosa, mientras que la biomasa procedente de la columna aireada estuvo constituida por grandes velos, turgente y cohesionada.

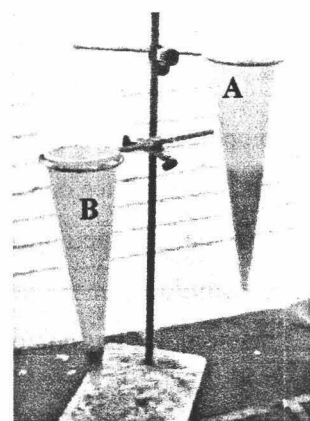


Figura 8.46.- Realización de la V_{30} para la columna aireada (A) y columna anóxica (B)

8.4.5.- Estudio de la biopelícula del proceso de nitrificación-desnitrificación.

Para optimizar las condiciones de operación de una planta de tratamiento, es muy importante determinar la composición de la biopelícula (Azeredo *et al.*, 1999), porque si importante son los mecanismos físicos de la planta no lo son menos los verdaderos actores y responsables de la descontaminación y tratamiento del efluente, los microorganismos.

En este apartado se muestra de forma inicial o de avance las posibilidades de los futuros estudios de investigación y la importancia de conocer la parte biológica de los

sistemas dedicados al tratamiento de aguas, dejando, ofreciendo una información, materiales y métodos que sirva como acicate a dichas futuras investigaciones.

Como ya se describió en la introducción las biopelículas se pueden considerar como agrupaciones de células simples o microcolonias embebidas en una matriz polimérica de origen microbiano (EPS, Substancias Poliméricas Extracelulares), las cuales les permiten realizar sus funciones vitales de forma más selectiva y permitiéndoles a la vez captar una mayor concentración de nutrientes y una protección frente agentes externos.

Es el EPS el responsable principal de la integridad funcional y estructural de la biopelícula, de manera que la composición del EPS determina muchas de las propiedades más importantes de la biopelícula, como densidad, porosidad, difusividad, resistencia a la fricción, conductividad térmica y actividad metabólica (Zhang *et al.*, 1999). El EPS esta constituido por biopolímeros, principalmente por polisacáridos, proteínas y de otras macromoléculas como DNA, lípidos y sustancias húmicas, etc (Nielsen *et al.*, 1997).

Bajo las condiciones de trabajo siguientes: 0.7 m³/m² día de carga hidráulica, 13.6 m³/m² hora de carga de aire de proceso y 600 % de recirculación interna, se realizó un análisis de la composición química de la biopelícula, mas concretamente del EPS, tanto de la columna anóxica como aireada siguiendo la metodología descrita en el aparatado de materiales y métodos analíticos. Para la extracción del EPS del agua de lavado de las distintas columnas se utilizaron tres métodos distintos, EDTA, formaldehído y etanol. La relación en cantidad de EPS obtenido por gramo de residuo seco en función de los métodos de extracción elegidos entre las columnas fue de 2.0±0.2 veces mayor para la columna anóxica. El EPS extraído por cada método se le analizó la proporción en carbohidratos, proteínas y carbono orgánico total (TOC), obteniéndose los siguientes resultados.

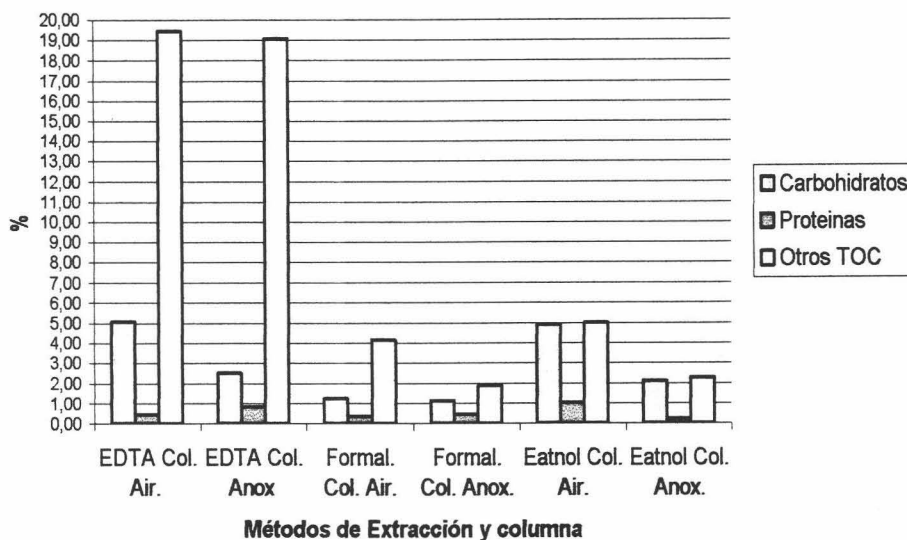


Figura 8.46- Composición del EPS en carbohidratos, proteínas y carbono orgánico total para distintos métodos de extracción y según las columnas del sistema.

Como se puede observar en la figura 8.46, dependiendo del método de extracción la concentración de los distintos parámetros variaron significativamente, así, para la obtención de carbohidratos los métodos del EDTA y etanol ofrecieron mejores resultados que los del formaldehído. El porcentaje en carbohidratos para los métodos ensayados varió de 1.14 a 5.09 %. No se observaron diferencias significativas para la obtención de proteínas para los métodos utilizados, que varió de 0.24 a 1.01%. Para la obtención de carbono orgánico el método del EDTA ofreció diferencias significativas con respecto a los otros métodos.

En todos los casos la cantidad de carbohidratos fue superior a la de proteínas, independientemente de la columna muestreada, con una relación entre carbohidratos/proteínas de 7 para el EPS obtenido con los métodos del EDTA y etanol, y de 3 para el método del formaldehído.

También se aprecia en la figura 8.47 diferencias de composición entre la columna aireada (nitrificantes) y anóxica (desnitrificante). Para todos los métodos de extracción se obtuvieron mayores concentraciones de carbohidratos en la columna nitrificante (figura 8.47), con una relación entorno a 2.0 para los métodos del EDTA y etanol. Parecido fue el

comportamiento para las proteínas pero con una mayor dispersión entre las relaciones obtenidas.

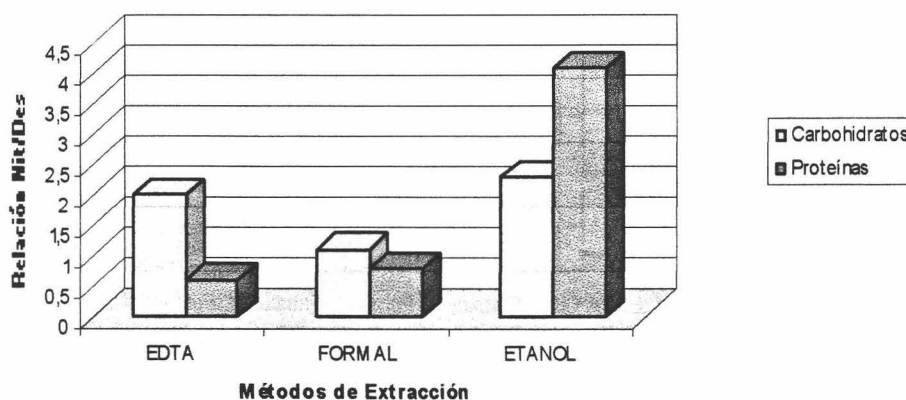


Figura 8.47.- Relación de la composición en carbohidratos y proteínas entre nitrificación (columna aireada) y desnitrificación (columna anóxica).

La composición química del EPS recogida en la literatura científica se caracteriza por ser muy heterogénea. Horan y Eccles (1986) obtienen una composición predominantemente por carbohidratos representado un 65 % del material extracelular con otras sustancias presentes como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los ratios de sus componentes varían, dependiendo de la procedencia de la muestra y de la técnica de extracción (Morgan *et al.*, 1990, Zhang *et al.*, 1999). Por ejemplo, Horan and Eccles (1986) y Morgan *et al.* (1990) analizan más carbohidratos que proteínas en un tratamiento de fangos activos, con relaciones que variaron de 0.16 a 0.70. Karapanagiotis *et al.*, (1989), Forster (1982) encontraron más proteínas que carbohidratos en la digestión de fangos, con ratios de 1.1-5.1.

Zhang *et al.*, (1999) emplearon los mismos métodos de extracción trabajando en procesos de nitrificación-desnitrificación, con la única variante que en esta investigación se dializó todas las muestras previas al análisis químico (no hay que olvidar que las muestras proceden de un medio salino), obteniendo resultados semejantes. Así obtuvieron una relación entre carbohidratos y proteínas próxima a 11.0 y una relación entre nitrificación/ desnitrificación de 2.99-4.64. La proporción obtenida de carbohidratos les

varió del 8 al 50% según el método de extracción utilizado. Wuertz *et al.*, (2001) caracteriza el EPS extraído por un método de intercambio catiónico por resinas del agua de un tratamiento mediante fangos activos con un 20% en TOC, 12 % en proteínas y un 4 % en carbohidratos. Nielsen y Jahn, (2000) explican que no existe un método universal de extracción que de valores reales de las propiedades del EPS, dado la dificultad de estos métodos de extraer la totalidad del EPS fuertemente retenido, especialmente en biopelículas mixtas, de ahí que estos autores consideren que los métodos de extracción no son realmente cuantitativos.

Uno de los parámetros fundamentales para los sistemas de tratamiento mediante biopelícula fija a un soporte inerte, es la capacidad de ésta biopelícula de fijarse al soporte y tolerar los aumentos de caudal y lavados sin implicar una pérdida importante de microbiota que provoque el desajuste del proceso.

Las figuras 8.48, 49 reflejan a diferentes alturas de las columnas anóxica y aireada la pérdida y en caso contrario la capacidad de fijación de la microbiota al material soporte tras ser sometido a un proceso de lavado descrito en el apartado 8.4.4. Como puede observarse tras el lavado del sistema la biopelícula mantuvo su estructura sobretodo la columna aireada, posiblemente al estar esta microbiota más adaptada a las fuerzas de arranque provocada por la aireación de proceso, constante en el tiempo. Además, se observa como la biopelícula de la columna aireada es más densa, tapizando toda la superficie del árido con una red mayada constituida por el EPS más compleja y canalizada. Posee una estructura como la definía Lewandowski *et al.* (1995), que las consideran sistemas tridimensionales donde hay estructuras heterogéneas muy canalizadas, canales que están llenos de agua y por donde circulan los nutrientes.

No así, la columna anóxica donde se muestra una biopelícula que deja ver la superficie del árido, más exigua y escasa de canales. Además se observa diferencias de estructura entre la parte superior de la columna y la inferior, posiblemente por la diferente distribución de nutrientes (Lazarova and Manen, 1995). La figura 8.50 si muestra la importancia del EPS en la capacidad de retener y fijar los microorganismos en el interior

de la biopelícula, observándose además a esta escala una composición microbiana compuesta principalmente por bacterias.

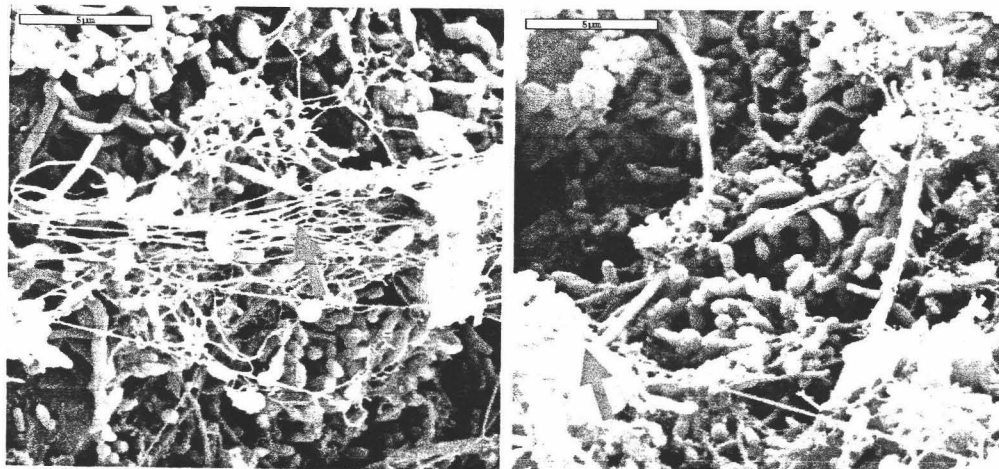
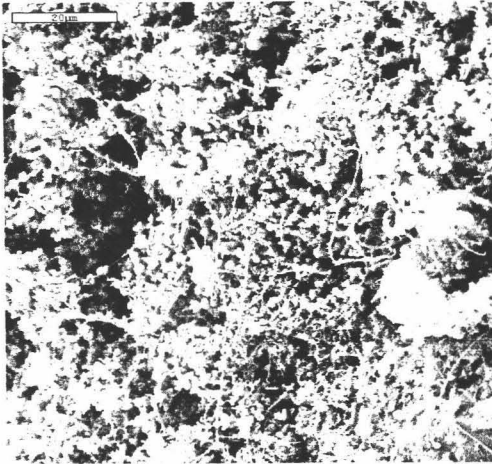


Figura 8.50.- Microscopía electrónica de barrido de superficie del aspecto de la biopelícula en la columna anóxica.

En cambio, la figura 8.51, muestra además de la importancia del EPS en la estructura, porosidad, fijación, etc, las diferencias de composición microbiana de la columna aireada con respecto a la columna anóxica. La diversidad microbiológica de la columna aireada es mucho mayor que la columna anóxica. En esta columna se llega a observar desde algas hasta hongos pasando sin duda por bacterias. Posiblemente estas diferencias estructurales y composición microbiana fue debido a las posibilidades que determina la presencia de oxígeno, a la selección que la toxicidad de los compuestos fenólicos pudo realizar en la microbiota de la columna anóxica, ya que fue la columna anóxica donde se obtuvieron mayores concentraciones de compuestos fenólicos, gracias a la entrada del influente.

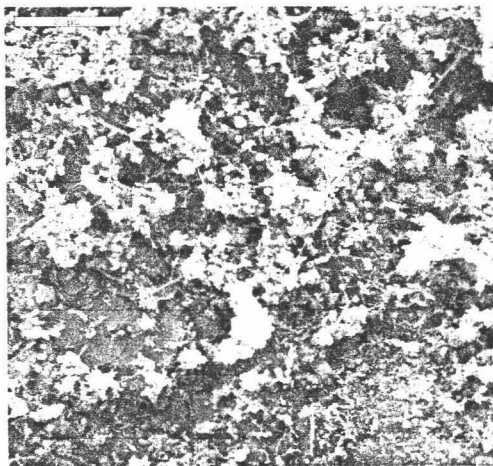
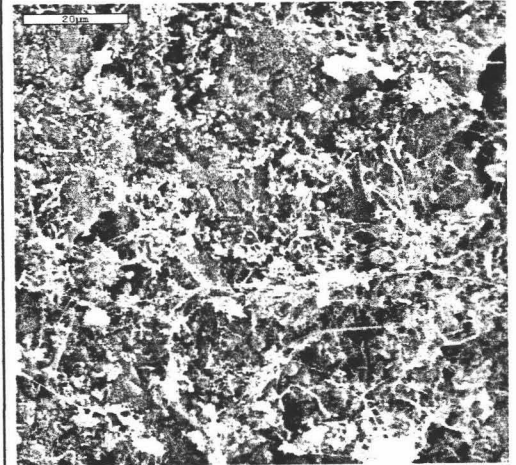
Columna Anóxica

Antes del Lavado



Zona superior de la columna Anóxica

Después del lavado



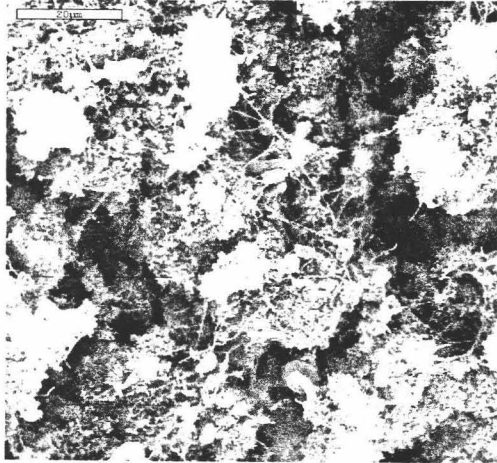
Zona inferior de la columna Anóxica



Figura 8.48.- Fotografías de microscopia electrónica de barrido de superficie que muestran los cambios sufridos por la biopelícula en la columna anóxica debido a los lavados del sistema.

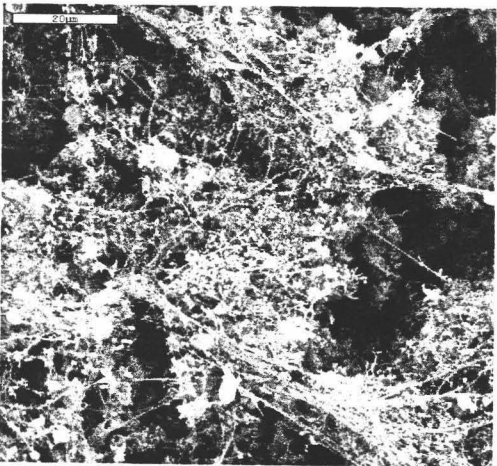
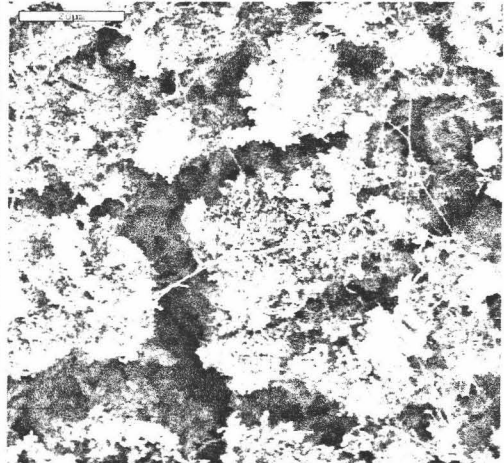
Columna Aireada

Antes del Lavado



Zona superior de la columna Aireada

Después del lavado



Zona inferior de la columna Aireada

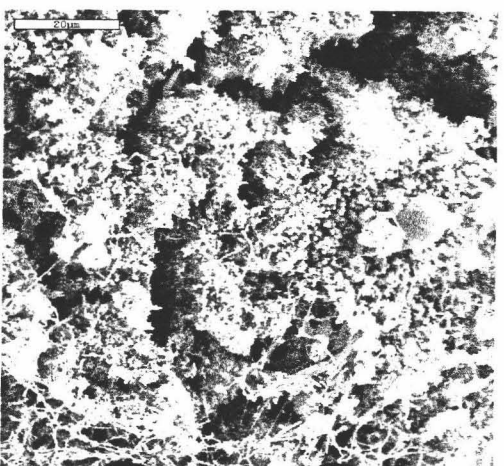


Figura 8.49.- Fotografías de microscopia electrónica de barrido de superficie que muestran los cambios sufridos por la biopelícula en la columna aireada debido a los lavados del sistema.

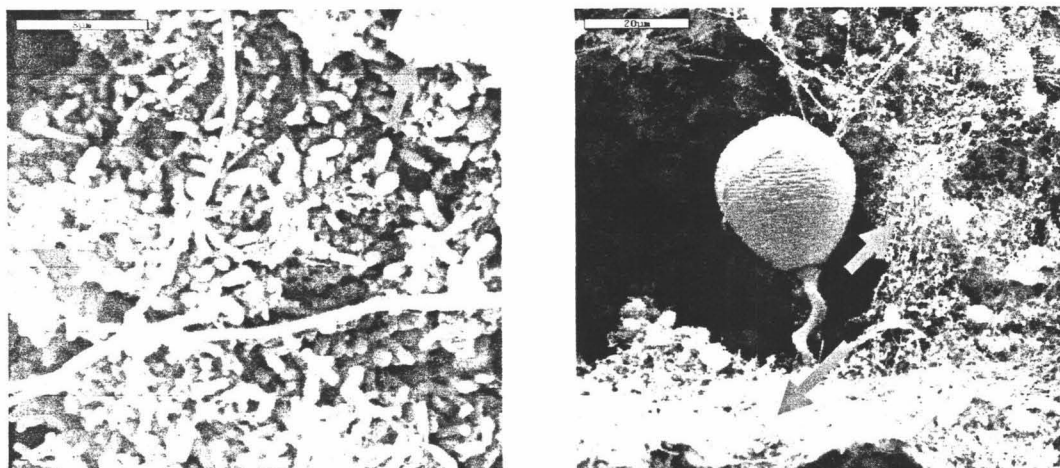


Figura 8.51.- Microscopía electrónica de barrido de superficie de la biopelícula de la columna aireada.

A continuación se realiza un estudio previo, bajo condiciones de trabajo de carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, recirculación de 600% y un caudal de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora, de la biodiversidad presente en el sistema a distintas alturas de ambos lechos inundados. Dichas alturas coinciden con la zona de entrada (zona superior de la columna anóxica), zona inferior de la columna anóxica, zona inferior de la columna aireada y zona superior de la columna aireada o salida del sistema.

El término “biodiversidad” fue acuñado en 1986 por Walter Rosen (Sarkar and Margules, 2002), nacido de la traducción de las palabras inglesas para “diversidad biológica” (*biological diversity*). Entendida en su acepción más amplia, la biodiversidad tiene como principal objeto de estudio las poblaciones (conjunto de individuos de una misma especie que viven en un lugar determinado), porque sobre ellas convergen tanto la diversidad genética como la taxonómica o la ecológica.

Tradicionalmente, el principal vehículo para el conocimiento de la biodiversidad ha sido el constituido por la taxonomía y sistemática biológica, es decir la ordenación en un sistema jerarquizado de los distintos tipos de seres vivos en grupos (taxones) y la clasificación de los mismos atendiendo a su origen filogenético. Quizá por esta razón y

por el hecho de que el mundo viviente ha sido considerado mayoritariamente por los biólogos y ecólogos en términos de especies, el término biodiversidad encuentra su uso más común como sinónimo de la diversidad taxonómica, en particular la riqueza de especies en distintos grupos taxonómicos que forman parte de un determinado hábitat.

Debido a las particularidades de los microorganismos, como son su pequeño tamaño y simplicidad estructural, la clasificación basada enteramente en la observación de caracteres morfológicos es muy poco fiable. La clasificación en función de propiedades fisiológicas y bioquímicas es imposible, puesto que se estima que un 99% de la totalidad de los distintos microorganismos que existen en la naturaleza no ha sido jamás aislado ni cultivado en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los mismos en condiciones naturales, que nos impide emular estas condiciones en el laboratorio, así como al desconocimiento de posibles interdependencias entre organismos en su hábitat naturales (Muyzer and Smalla, 1998).

El desarrollo de la biología molecular ha permitido el estudio de la diversidad procariota desde un punto de vista diferente: el nivel genético. La taxonomía moderna tiende a agrupar los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a la vez es un reflejo de su proximidad evolutiva (Woese, 1987). Hablando de modo general, los métodos de identificación a nivel de ADN generan una huella dactilar genética de los microorganismos que, de manera similar a un código de barras, resulta útil para su identificación y clasificación.

En este sentido, y siguiendo el método de extracción y análisis reflejado en el capítulo de materiales y métodos, se obtuvieron los siguientes perfiles (Figura 8.52) de la composición de la población en las muestras tomadas a distinta altura de los lechos.

Como se puede apreciar en la figura 8.52, se han obtenido con el empleo del ADNr 16S un patrón de diversidad para cada uno de los puntos de muestreo y perfiles de poblaciones reconocibles, que posibilita la separación de los geles con una resolución suficiente para permitir la reamplificación de las bandas, indispensables para

secuenciarlas y poder determinar su afiliación taxonómica. Apuntar que esta fases se esta llevando a cabo, a la espera de resultados. Esto indica haber logrado por primera vez aplicar con éxito la técnica de TGGE al estudio de perfiles de poblaciones en las biopelículas procedentes de un sistema de lechos inundados trabajando en desnitrificación-nitrificación en medio salino y con altas concentraciones en fenol, tomando como base una metodología previamente descrita que había sido especialmente diseñada para la extracción a partir de fangos activos (Watanabe *et al.*, 1998). Gómez-Villalba (2003), consiguió aplicar con éxito esta misma técnica en lechos inundados para el tratamiento de aguas residuales urbanas.

La misma figura, 8.52, refleja que los perfiles varían claramente según la altura del lecho (flechas), indicativo de las distintos factores físicos y químicos que caracteriza el punto de muestreo, a saber, concentración de oxígeno disuelto, fuente de carbono, fenol y formas distintas de nitrógeno. De igual manera se observa, bandas presentes en todos los perfiles (Corchetes). Recientemente, se ha demostrado cómo bacterias nitrificantes como *N. europea* y *N. eutropha* pueden simultanear nitrificación y desnitrificación cuando crecen bajo condiciones de oxígeno limitado (Bothe *et al.*, 2000), por lo que no se descarta esta explicación para la presencia de bacterias nitrificantes como parte de la comunidad microbiana del lecho anóxico. Igualmente en estudios parecidos, Sakano *et al.*, (2002) llevados a cabo en tratamientos de aguas residuales constataron la presencia de bacterias desnitrificantes tanto en los lechos aireados como en los anóxicos. Gómez-Villalba (2003), concluye en su estudio de poblaciones que las bacterias desnitrificantes se encontraron ampliamente distribuidas a lo largo de ambos lechos del tratamiento.

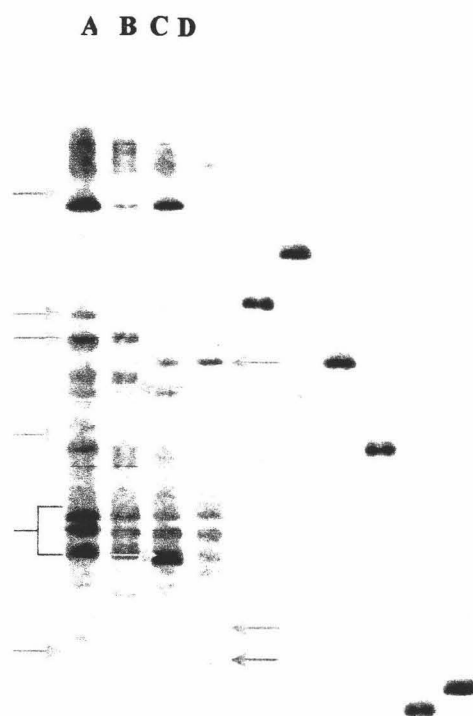


Figura 8.52.- Electroforesis en gel con gradiente de temperatura de fragmentos de gen ADNr 16S amplificado por PCR de distintas muestras procedentes de la zona superior de la columna anóxica (A), zona inferior de la columna anóxica (B), zona inferior de la columna aireada (C) y zona superior de la columna aireada o salida del sistema (D). Bajo condiciones de trabajo de carga hidráulica de $0.7 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$, recirculación de 600% y un caudal de aireación de $13.6 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ hora}$.

Si el perfil de población obtenido en esta investigación y reflejado en la figura 8.52, se compara con el perfil de población obtenido por Gómez-Villalba (2003) en su trabajo con lechos inundados para el tratamiento de aguas residuales y con el objetivo de eliminación de nitrógeno mediante nitrificación-desnitrificación, y recogido en la figura 8.53, se observa como la cantidad de bandas y así de diversidad es significativamente menor. Yamaguchi *et al.*, (1998, 1999) y Gamo and Shoji (1999), observaron que el lodo aclimatado al fenol tiene una estructura comunitaria microbiana menos diversa, pudiendo explicarse porque esta comunidad microbiana estuvo durante largo tiempo expuesta al

fenol y los microorganismos que eran capaces de degradar y/o tolerar el fenol habían sido seleccionados.

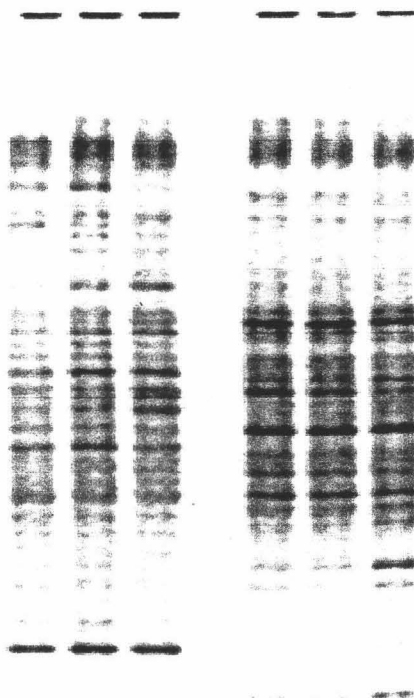


Figura 8.53.- Electroforesis en gel con gradiente de temperatura de fragmentos de gen ADNr 16S amplificado por PCR, obtenido en el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante lechos inundados en su conformación de nitrificación-desnitrificación (Gómez-Villalba, 2003).

Como se ha podido reflejare en estas líneas, la aplicación de las técnicas de biología molecular ha permitido demostrar el papel tan importante que estas bacterias juegan en diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, se ha conseguido, en este apartado, ofrecer una información que permite desarrollar futuras investigaciones que indaguen en el mundo de la biología en el tratamiento de aguas industriales en medio salino, y reflejar la necesidad de entender la relación existente entre diversidad de los distintos grupos bacterianos funcionalmente importantes y la estabilidad del proceso. Todo ello, con el objetivo de de obtener una base de conocimiento que proporcione información para la futura optimización o mejora del funcionamiento del sistema.

Conclusiones y Líneas Futuras de Investigación

9.- CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta lo obtenido por otros autores e investigadores y atendiendo al estudio sistemático de los resultados en el que se ha podido observar las interrelaciones entre las distintas variables y parámetros, para el sistema y proceso escogido para el tratamiento del agua residual industrial con el fin de obtener los objetivos marcados, se puede enunciar las siguientes conclusiones con la que se cierra estos años de investigación:

1. El material arcilloso, concretamente residuos de ladrillo procedente del rechazo por roturas por deficiente manipulación, pero con una cocción correcta, utilizado como material soporte de la biopelícula, posee propiedades con capacidad de regular el pH del medio líquido en el que se encuentre inundado, permitiendo descartar la adición de sustancias reguladoras de pH en sistemas de eliminación de nitrógeno mediante procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación. Dicha capacidad reguladora de pH se puede valorar en un volumen de agua tratada de 250 veces el volumen de relleno.
2. La utilización del agua residual industrial diluida con agua de mar procedente de la zona de vertido objeto de esta investigación, permite la formación de biopelícula activa (desnitrificante- nitrificante) sobre el influente sin necesidad de inoculación previa.
3. La carga hidráulica idónea del proceso, para la reducción de la DQO, fenol y nitrógeno, está comprendida entre $0.7-0.8 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$, ajustándose para éstos contaminantes a una ecuación polinómica cóncava de 2º grado.
4. El rendimiento en la eliminación de la DQO y fenol en el influente tratado, no se ve significativamente afectado por un aumento en el caudal de aireación ni de recirculación. Así, los incrementos en el rendimiento obtenidos por un aumento en ambos parámetros, no justificaría el mayor coste que produce.

5. La eliminación de nitrógeno se presenta como parámetro limitante para la selección del caudal de aireación del sistema, observándose una nitrificación completa para un caudal de aireación de $13.58 \text{ m}^3/\text{m}^2$ hora.
6. Para una carga hidráulica comprendida entre $0.7\text{-}08 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, un incremento del 50% de recirculación implica un aumento en el rendimiento de eliminación de nitrógeno del 10%, incremento que igualmente se produce al duplicar el caudal de aire para una determinada recirculación.
7. El uso de tecnologías de lechos inundados mediante su conformación en un sistema de desnitrificación-nitrificación (pre-desnitrificación), se muestra viable desde el punto de vista biológico, alcanzándose los máximos rendimientos posibles de eliminación para los contaminantes ensayados, independientemente de la recirculación. No obstante, la eliminación de nitrógeno no podría alcanzar las concentraciones de efluentes marcados por la normativa vigente, salvo con un incremento de la recirculación o bien mediante una dilución con agua de mar.

10.- LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.

1. Estudio de la variación de la biodiversidad según su distribución espacial y temporal con la conformación del sistema en pre y post-desnitrificación, así como, relaciones posibles entre el contenido de EPS con la capacidad de adhesión y descontaminación del agua residual industrial.
2. Estudio e identificación de las cepas mas activas nitrificantes y desnitrificantes, a partir de las cuales, realizar y estudiar las posibilidades de inocular selectivamente el sistema
3. Estudio de los efectos de un aumento en las recirculaciones en la relación DQO/Nt, y determinación de la relación optima de DQO/Nt para el proceso.

4. Estudio del tratamiento del agua residual industrial mediante la conformación en doble etapa, pre y post-desnitrificación, para alcanzar las exigencias recogidas en la normativa vigente.
5. Diseño de un modelo matemático que permita predecir en el funcionamiento y rendimientos del proceso en función de las variables estudiadas.
6. Diseño de automatismo de lavado y modelo que permita predecir las necesidades de lavado en cada momento, en función de las distintas variables y parámetros manejados.

Bibliografía

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdo, M.S.E.; Noiser, S.A.; Eltawil, Y.A.; Fadl, S.M. and Elkhairy, M.L.**, 1997. Removal of phenol from aqueous solutions by mixed adsorbents – Maghara coal and activated carbon. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Environmental Science & Engineering & Toxic & Hazardous Substance Control* **32** (4), pp. 1159-1169.
2. **Akunna, J.C.; Biceau, C. and Moletta, R.**, 1993. Nitrate and nitrite reduction with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Research* **27**, pp. 1303-1312.
3. **Alemzadeh, I.; Vossoughi, F. and Houshmandi, M.**, 2002. Phenol biodegradation by rotating biological contactor. *Biochemical Engineering Journal* **11**, pp. 19-23.
4. **Alleman, J.**, 2000. The history of fixed film wastewater treatment systems. *Proceedings of the 1st International Conference on Fixed-Film Systems*, Kings Island, Ohio, pp.60-88.
5. **Allison, D.G.; Gilbert, P.; Lappin-Scott, H. and Wilson, M.**, 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom.
6. **Álvarez, A.; Rui, A. and Alirio, E.**, 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* **6**, pp. 45-49.
7. **Anders, H.; Kaetzke, A.; Kämpfer, P.; Ludwig, W and Fuchs, G.**, 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. Nov., and *Azoarcus evansii* sp. Nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, pp. 327-333.
8. **Andreadakis, A.D.; Kalaergis, C.M.; Kartsonas, N. and Anagnostopoulos, D.**, 1997. Determination of the impact of toxic inflows on the performance of

- activated sludge by wastewater characterisation. *Water Science & Technology* **36**, pp. 45-52.
9. **Andreoni, V. and Bestetti, G.**, 1988. Ferulic acid degradation encoded by a catabolic plasmid. *FEMS Microbial Ecology* **53**, pp. 129-132.
 10. **Anonymous**, 1934. The Activated Sludge Patent. *Engineering News-Record*, pp. 113, 507.
 11. **Ardern, E. and Lockett, W.**, 1914. Experiments on the Oxidation of Sewage without the Aid of Filters," *Jour. Soc. Chemical Industry* **33**, pp. 523-539.
 12. **Ardern, E.**, 1917. A Resume of the Present Position of the Activated Sludge Process of Sewage Purification." *Jour. Soc. Chemical Industry*, **36**, pp. 822-830.
 13. **Aszczyk, B.; Thu, S.; Jusiak, M. and Suszek, A.**, 2002. Phenol removal in packed bed reactor under denitrifying conditions. *Acta Microbiologica Polonica* **51 (1)**, pp. 39-45.
 14. **Atlas, R.M. y Bartha, R.**, 1998. *Microbial ecology, fundamentals and applications*. Ed. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., an imprint of Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park, California.
 15. **Awad, Y.M. and Abuzaid, N.S.**, 1997. Electrochemical treatment of phenolic wastewater-efficiency, desing considerations and economic evaluation. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Environmental Science & Engineering & Toxic & Hazardous Substance Control* **32 (5)**, pp. 1393-1414.
 16. **Awad, Y.M. and Abuzaid, N.S.**, 2000. the influence of reidence time on the anodic oxidation of phenol. *Separation and Purification technology* **18**, pp. 227-236.
 17. **Azachi, M.;Henis, Y.; Oren, A.; Gurevich, P and Sarig, S.**,1995. Transformation of formaldehyde a *Halomonas sp.* *Can J. Microbiol* **41**, pp. 548-553.
 18. **Azevedo, B.D.; Mavinic, D.S. and Robinson, H.D.**, 1995. The effect of ammonia loading and operating temperature on the biological nitrification and denitrification of high ammonia landfill leachate. *Can. J. Civil Eng.* **22 (3)**, pp. 524-534.

19. **Azevedo, J.; Lazarova, V. and Oliveira, R.**, 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat. Res. Tech.* **39** (7), pp. 243-250.
20. **Baker, J.; Milke, M. and Mihelcic, J.**, 1999. Relationship between chemical and theoretical oxygen demand for specific classes of organic chemicals. *Wat. Res.* **33** (2), pp. 327-334.
21. **Balci, S. and Dincel, Y.**, 2002. Ammonium ion adsorption with sepiolite: use of transient uptake method. *Chemical Engineering and Processing* **41**, pp. 79-85.
22. **Banerjee, G.**, 1997. Treatment of phenolic wastewater in RBC reactor. *Wat. Res.* **31** (4), pp. 705-714.
23. **Barber, W. and Stuckey, D.**, 1999. Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR): 1, Denitrification. *Wat. Res.* **34** (9), pp. 2413-2422.
24. **Barber, W. and Stuckey, D.**, 1999a. Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR): 1, Nitrification. *Wat. Res.* **34** (9), pp. 2423-2432.
25. **Barragán, J.M.**, 1994. Ordenación, planificación y gestión del espacio litoral. *Estudios geográficos. Oikos Tau*.
26. **Beaubien, A.; Hu, Y.; Bellahcen, D.; Urbain, V. and Chang, J.**, 1995. Monitoring metabolic activity of denitrification processes using gas production measurements. *Water Research* **29**, pp. 2269-2274.
27. **Beccari, M.; Di Pinto, A.C.; Ramadroni, R. and Tomei, M.**, 1992. Effect of dissolved oxygen on nitrification kinetics. *Wat. Res.* **26**(8), pp. 1099-1104.
28. **Beer, D and Stoodley, P.**, 1995. Relation between the structure of anaerobic biofilm and transport phenomena. *Water Science & technology* **32**, pp. 11-18.
29. **Banerjee, G.**, 1997. Treatment of phenolic wastewater in RBC reactor. *Water Res.* **31**, pp. 705-714.
30. **Bertin, L.; Majone, M.; Gioia, D. and Fava F.**, 2001. An aerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* **87**, pp. 1161-1177.

31. **Bertrand, J.C.; Amallah, M.; Acquaviva, M. and Millie, G., 1990.** Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, pp. 160-263.
32. **Betenworth, H; Weining, J. and Bursik, A., 1995.** Biologische elimination von Stickstoffverbindungen aus abwasser van rauchgasentschwefelung saulagen. *UGB Kraftwerkstechnik* **75 (10)**, pp. 898-901.
33. **Bigot, B.; Le Tallec, X. and Badard, M., 1998.** A new generation of compact multi-media biological filter. *Proc. EWPCA/WEF/CIWEM Conf. Treatment Innovation for the Next Century, Cambridge University, UK, July 7-10*, pp. 9.
34. **Bishop, P.L., 1996.** Biofilm structure and kinetics. *3rd International IAWQ Special Conference on Biofilm Systems. Copenhagen.*
35. **Bitton, G., 1994.** *Wastewater Microbiology.* Wiley-Liss. New York.
36. **Blaszczyk, M.; Krogulska. B.; Plenkiewicz, J. and Mycielski, R., 1997.** The use of denitrifying bacteria for wastewater purification. *Bull. Pol. Acad. Sci.: Biol. Sci.* **44 (3-4)**, pp. 285-294.
37. **Bock, E., 1965.** Vergleichende untersuchung die Wirkung sichtbaren Lichtes auf *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi*. *Arch. Mikrobiol.* **51**, pp. 18-41.
38. **Bock, E.; Koops, H.P.; Ahlers, B. and Harms, H., 1992.** Oxidation of inorganic nitrogen compounds. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application* (Balows, A.; trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schleifer, K.H., eds.). pp. 414-430. Springer-Verlag, New York.
39. **Bohdziewicz, J. Bodzek, M. and Wasik, E., 1999.** The application of Reverse Osmosis and Nanofiltration to the Removal of Nitrates from Groundwater. *Desalination* **121**, 139-147.
40. **Bohdziewicz, J. Bodzek, M. and Wasik, E., 1999.** The application of Reverse Osmosis and Nanofiltration to the Removal of Nitrates from Groundwater. *Desalination* **121**, 139-147.

41. **Borregaard, V.**, 1997. Experience with nutrient removal in a fixed-film system at full-scale wastewater treatment plants. . *Wat. Sci. Technol.* **36 (1)**, pp. 129-137.
42. **Bothe, H.; Günter, J.; Schloter, M.; Ward, B.B. and Wizel, K.P.**, 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, pp. 673-690.
43. **Bouwer, E.; Rijnaarts, H. and Cunningham, R.**, 2000. Biofilms in porous media. In *Biofilms II: Process Analysis and Applications*, Edi. James D. Bryers. Wiley-Liss, Inc.
44. **Braun, C. and Zumft, W.G.**, 1992. The structural genes of the nitric oxide reductasa complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. *Journal of Bacteriology* **174**, pp. 2394-2397.
45. **Brenner, A.; Chozick, R. and Irvine, R.L.**, 1992. Treatment of a high-strength mixed phenolic-waste in a SBR. *Envir. Res.* **64**, pp. 128-133.
46. **Brond, S. and Sund, C.**, 1994. Biological removal of nitrogen in toxic industrial effluents, high in ammonia. *Water Science & Technology* **29 (9)**, pp. 231-240.
47. **Bryan, E. H.**, 1955. Molded Polystyrene Media for Trickling Filters. *Proceedings of the 10th Purdue Industrial Waste Conference*, Purdue University, Engng. Bulletin, pp. 164-172.
48. **Bryers, J.**, 2000. *Biofilms II. Process analysis and applications*. Edit. Wiley-Liss, New York. pp. 183.
49. **Buitrón, G.; González, A. and López-Marín, L.M.**, 1998. Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and insolated bacteria. *Water Sci. & Technol.* **37**, pp. 371-378.
50. **Buswell, A. M.**, 1928. *The Chemistry of Water and Sewage Treatment*. Chemical Catalog Company, Inc., New York, NY.
51. **Buttino, I ; Filippi, M. and Cardellicchio, N.**, 1991. Tossicità dei composti fenolici nell'ambiente marino. *Acqua Aria* **9**, pp. 853-861.

52. Campos, J.L.; Garrido, J.M.; Méndez, R. and Lema, J.M., 1999. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresource Technol.* **68**, pp. 141-148.
53. Campos, J.L.; Garrido, J.M.; Méndez, R. and Lema, J.M., 2002. The effect of kaolin particules on the behavior of nitrifying activated sludge units. *Bioresources Technology* **81**, pp. 225-231.
54. Campos, J.L.; Mosquera-Corral, A.; Sánchez, M.; Méndez, R. and lema J.M., 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research* **36**, pp. 2555-2560.
55. Caumette, P. and Baldeux, B., 1980. Etude des eaux rouges dues à la prolifération des bactéries photosynthétiques sulfoxydantes dans l'étang du Prévost, lagune saumâtre méditerranéenne. *Mar. Biol.* **56**, pp. 183-194.
56. Caumette, P.; Castel, J. and Herbert, R.A., 1996. Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prevost. In: *Coastal Lagoon Eutrophication and Anaerobic Processes* (Caumette, P.; Castel, J. and Herbert, R.A., Eds.), pp. 9-18. Kluwer, Dordrecht.
57. Charccklis, W.G. and Wilderer, P.A., 1989. Structure and function of biofilms. A Wley-interscience Publication.
58. Charest, A.; Bisailon, J.G.; Lepine, F. and Beaudet, R., 1999. Removal of phenolic compounds from a petrochemical effluent with a methanogenic consortium. *Canadian Journal of Microbiology* **45** (3), pp. 235-241.
59. Chen, Y.P.; López-de-Victoria, G and Lovell, C.R., 1993. Utilization of aromatic compounds as carbon and energy sources during growth and N₂-fixation by free-living nitrogen fixing bacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **159**, pp. 207-212.
60. Cheremisinoff, P.N., 1995. Handbook of water and wastewater treatment technology. Rd. Marcel Dekker, Inc. New York.
61. Chitra, S.; Sekaran, G. And Chandrakasan, G., 1995. Biodegradation of phenol in wastewater by immobilised mutant strain of *Pseudomona putida*.

- Journal of Environmental Science & Health, Part A: Environmental Science & Engineering & Toxic & Hazardous Substance Control **30 (8)**, pp. 1749-1773.
62. **Chui, P.C.; Terashima, J.H.; tay, J.H. and Ozahi, H.**, 1996. Performace of a partly aerated biofilter in the removal of nitrogen. *Wat. Sci. Tech.* **34 (1/2)**, pp. 187-194.
63. **Chui, P.C.; Terashima, J.H. and Ozahi, H.**, 2001. Wastewater treatment and nitrogen removal using submerged filter systems. *Water Science and Technology* **43 (1)**, pp. 225-232.
64. **Chudoba, P. and Pujol, R.**, 1998. A three-stage biofiltration process: performances of a pilot plant. *Proceedings of 19th IAWQ Biennial Conference*. Vancouver, Canada.
65. **Clifford, D. and Liu, X.**, 1993. Biological denitrification of Spent Regenerant Brine Using a Sequencing Batch Reactor. *Water Research* **27(9)**, 1477-1484.
66. **Cohen, Y.**, 2001. Biofiltración-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology* **77**, pp. 257-274.
67. **Colborn, T.; Clement, C.** editors, 1992. *Advances in modern enviromental toxicology: chemically-induced alterations in sexual and functional development: The human/wildlife connection*. Princetown Scientific Publishing. Volumen 21. New Yersey.
68. **Constantin, H. and Fick, M.**, 1997. Influence of C-source on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research* **31**, pp. 583-589.
69. **Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.**, 1998. *Informe 1998 Medio Ambiente de Andalucía*.
70. **Cornell, S.; Rendell, A. and Jickells, T.**, 1995. Atmospheric inputs of dissolved organic nitrogen to the oceans. *Nature* **36**, pp. 243-246.
71. **Croos, W.; Chian, E.S.K.; Pohland, F.; Harper, S.; kharkar, S.; Lu, F.**, 1982. Anaerobic biological treatment of coal gasificacion effluent. *Botechonology and Bioengineering Symposium* **12**, pp. 349-363.

72. **Cutruzzolà, F.**, 1999. Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, pp. 231-249.
73. **Dagley, S; Evans, W.C. and Ribbons, D.W.**, 1960. New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature* **188**, pp. 560.
74. **Davies, K.J.; Lloyd, D. and Boddy, L.**, 1989. The effects of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* **135**, pp. 2445-2451.
75. **De Beer, D.**, 1997. Microenvironments and mass transfer phenomena in biofilm and activated sludge studied with microsensors. *Proceeding of Environmental Biotechnology International Symposium*. Oostende.
76. **De Silva, D.G.**, 1997. *Theoretical and experimental studies on multispecies bioreactors involving nitrifying bacteria*. Ph.D. dissertation, Dept. Civil Engineering, Northwestern University, Evanston, IL.
77. **De Vries, I. And Hapstaken, C.**, 1984. Nutrient cycling and ecosystem behaviour in a saltwater lake. *Netherlands Journal of Sea Research* **18 (3/4)**, pp. 221-245.
78. **Decreto 14/1996**, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de la Calidad de las Aguas Litorales.
79. **Decreto 54/1999**, de 2 de marzo, por el que se declaran las zonas sensibles, normales y menos sensibles en las aguas del litoral y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias de la Comunidad Autónoma de Andalucía.
80. **Degrémont**, 1979. *Manual Técnico del Agua*, 4ª edición. Degrémont.
81. **Demianov, P.; Di Stefano, C.; Gianguzza, A. And Sammartano, S.**, 1995. Equilibrium studies in natural waters: speciation of phenolic compounds in synthetic seawaters at different salinities. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, pp. 767-773.
82. **Demirer, G.; Speece, R.E.**, 1998. Anaerobic biotransformation of four 3-carbon compounds (Acrolein, Acrylic acid, Allyl alcohol and *n*-Propanol) in UASB reactors. *Water Res.* **32 (3)**, pp. 747-759.

83. **DEPA**. Danish Environmental Protection Agency, 1995. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects.
84. **Diaz, R.J. and Rosenberg, R.**, 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna *Oceanography. Marine Biology Annual Review* **33**, pp. 245-303.
85. **Dicosmo, F.; Tanaka, H.; and Neuman, A.W.**, 1994. Cell immobilization by adsorption to glass fibre mats. In: Veliky, I.A. McLean, R.J.C. (Eds.), *Immobilized Biosystems*. Chapman & Hall, London.
86. **Dickens, C.**, 1949. *A Tale of Two Cities*, Oxford University Press, London.
87. **Dincer, A. and Kargi, F.**, 2001. Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* **28**, pp. 661-665.
88. **Directiva 76/464/CEE del Consejo**, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.
89. **Directiva 86/280/CEE del Consejo**, de 12 de junio de 1986 relativa a los valores límite y los objetivos de calidad para los residuos de determinadas sustancias peligrosas comprendidas en la Lista I del Anexo de la Directiva 76/464/CEE.
90. **Dispirito, A.A.; Taaffe, L.R. and Hooper, A.B.**, 1985. Localization and concentration of hydroxylamine oxidoreductase and cytochromes c-552, c-554, c-552 and a in *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Acta* **806**, pp. 320-330.
91. **Duchon, K. And Bills, J.**, 1996. Toxicity reduction evaluation for complex wastewater. *WEFTEC'96 Annu. Conf. Expo. 69th*. **6**, pp. 45-54.
92. **Evans, M.; Nkhalambayausi-chirwa and Wang, Y.**, 2001. Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in a fixed film coculture bioreactor: reactor performance. *Wat. Res.* **35 (8)**, pp. 1921-1932.
93. **Fang, H.H.P. and Chang, O.C.**, 1997. Toxicity of phenol towards anaerobic biogranules. *Wat. Res.* **31 (9)**, pp. 2229-2242.

94. **Fang, H.H.P. and Zhou G.M.**, 1999. Interactions of methanogens and denitrifiers in degradation of phenols. *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, **125** (1), pp. 57-63.
95. **Fang, H.H.P.; Xu, L. and Chan, K.**, 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Wat. Res.* In press.
96. **Fdz-Polanco, F.; Fdz-Polanco, M.; Fernández, N.; Uruña, M.; García, P. and Villaverde, S.**, 2000. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research* **35** (4), pp. 1111-1114.
97. **Fdez-Polanco, F.; Méndez, M.; Uruña, A.; Villaverde, S. and García, P.**, 2000. Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Wat. Res.* **34** (16), pp. 4081-4089.
98. **Field, R. and Howell, J.**, 2001. Treating phenolic pollutants with membranes. *TCE*, March 2001, pp. 36-37.
99. **Flemming, H.C.; Wingender, J.; Griebe, T. and Mayer, C.**, 2000. Physico-chemical properties of biofilms. In: *Biofilms: recent advances in their study and control*. Edit. Evans, Harwood Academic Publishers.
100. **Forster, C.**, 1982. Sludge surfaces and their relation to the rheology of sewage suspensions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**, pp. 799-807.
101. **Furumai, H.; Rittmann, E.**, 1994. Evaluation of multi-species biofilm and floc processes using a simplified aggregate. *Wat. Sci. Technol.* **29** (10-11), pp. 439-446.
102. **Gabric, A.J. and Bell, P.R.**, 1993. Review of the effects of nonpoint nutrient loading on coastal ecosystems. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **44**, pp. 261-283.
103. **Gálvez, J.**, 2001. Eliminación de la materia orgánica y del nitrógeno en el agua residual urbana mediante lechos inundados. Tesis Doctoral Univ. de Granada. Depto. Ingeniería Civil. Depto. Microbiología. Instituto del Agua.
104. **Gamo, M. and Shoji, T.**, 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses biologic plates and multiple sole carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, pp. 4419-4424.

105. **GEASMP**, 1990. Joint Group of Experts on the Scientific Aspect of Marine Pollution: the State of the Marine Environment UNEP Regional Seas Reports and studies. No. 115, UNEP.
106. **Gemeiner, P.; Rexova, L.; sevec, F. and Norrlov, O.**, 1994. Natural and synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles and molecules. In: Veliky, I.A. and McLean, R.J. (Eds.) Immobilized Biosystems. Chapman & Hall, London.
107. **German FEA.** German Federal Environmental Agency, 1996. Endocrinically active chemicals in the environment.
108. **Gibson, D.T. and Subrawahian, V.**, 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Gibson, D.T. (Ed.). Microbial Degradation of Organic Compounds. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 181-252.
109. **Gignac, M.F.; Urbain, V; Rybacki, D.; Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P.**, 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci Technolo*, **38**, pp. 45-53.
110. **Glass, C. and Silverstein, J.**, 1999. Denitrification of high-nitrite, high salinity wastewater. *Water Research* **33** (1), pp. 223-229.
111. **Gómez, M.A.**, 1998. Eliminación biológica de nitrato de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos: Optimización del sistema. Tesis Doctoral, Univ. de Granada, Depto. De Ingeniería Civil, Depto. Microbiología, Instituto del Agua.
112. **Gómez, M.A.; Zamorano, M.; Moreno, B.; Osorio, F; González-López, J. and Hontoria, E.**, 1999. Desnitrificación biológica de aguas subterráneas. International Conference on Environmental Engineering. Cartagena (Murcia).
113. **Gómez, M.A.; Moreno, B.; González-López, J. and Hontoria, E.**, 2000. Eliminación biológica de nitrato de aguas subterráneas, mediante filtros sumergidos. *Alquibla* **6**, 121- 137.
114. **Gómez, M.A.; González-López, J. and Hontoria, E.**, 2000a. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials* **B80**, pp. 69-80.

115. **Gómez, M.A.; Ramos, A.; de la Escalera, S.; Moreno, B.; Osorio, F.; Pérez, J.I.; Menéndez, A. and González-López, J., 2001.** Eliminación de nitrato de aguas residuales industriales con alto contenido en fenol. V Simposio sobre "El agua en Adalucía". Almería 25-28, SIAGA 2001.
116. **Gómez, M.A.; Galvez, J.M.; Hontoria, E. González-López, J., 2003.** Influence of ethanol concentration on biofilm bacterial composition from a denitrifying submerged filter used for contaminated groundwater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **3 (95)**, pp. 245-251.
117. **Gonenc, I.E. and Harremoes, P., 1985.** Nitrification in rotating disc systems. I. Criteria for transition from oxygen to ammonia rate limitation. *Wat. Res.* **19**, pp. 1119-1127.
118. **González, G.; Herrera, M.; García, M. and Peña, M., 2001.** Biodregeneration of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactors. *Bioresource Technology* **76**, pp. 245-251.
119. **González-López, J.; Gómez, M.A. and Hontoria, E., 1998.** Congreso Internacional de Contaminación de Aguas Subterráneas por Nitratos y Pesticidas. Tetuán (Marruecos).
120. **Grady Jr.; Daigger, C.P. and Lim, H. C., 1999.** Biological wastewater treatment. Marcel Dekker, New York
121. **Grant, W.D. and Long, P.E., 1989.** Microbiología ambiental. Editorial Acribia, Zaragoza.
122. **Gras, H. and Álvarez, J., 1991.** Tratamiento biológico de aguas residuales urbanas por biofiltración sobre material granuloso y nitrificación sobre soporte sumergido. *Tecnología del Agua* **86**, pp. 58-65.
123. **Green, M.; Ruskol, Y. Lahav, O. and Tarre, S., 2000.** Chalk as the carrier for nitrifying biofilm in a fluidized bed reactor. *Wat. Res.* **35 (1)**, pp. 284-290.
124. **Green, M.; Ruskol, Tarre, S. and Loewenthal, R.E., 2002.** Nitrification utilizing CaCO₃ as the buffering agent. *Environmental Technology* **23 (3)**, pp. 303-308.

125. **Guerra, R.**, 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere* **44**, pp. 1737-1747.
126. **Guerrero, M.A. and Jone, R.D.**, 1996. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. Dark recovery after monochromatic or polychromatic irradiation. *Marine Ecology-Progress Series* **141 (1-3)**, pp. 193-198.
127. **Hallengraef, G.**, 1995. Algal blooms in Australian coastal waters. *Water* **22**, pp. 20-23.
128. **Hanaki, K.; Wantawin, C. and Ahgaki, S.**, 1989. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, pp. 289-296.
129. **Hannaford, A.M. and Kuek, C.**, 1999. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**, pp. 121-126.
130. **Hardenbergh, W. A.**, 1936. *Sewerage and Sewage Treatment, International High Rate Filters Textbook Company, scranton, PA.*
131. **Harper, D.**, 1992. *Eutrophication of freshwater. Principles, problems and restoration. Chapman & Hall.*
132. **Harrison, P.T.C.; Holmes, P. and Humfrey, C.D.N.**, 1997. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?. *The Science the Total Enviroment* **205**, pp. 97-106.
133. **Heider, J.; Spormann, A.M.; Beller, H.R. and Widdel, F.**, 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hidrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, pp. 459-473.
134. **Heitzer, R.D. and Ottow, J.C.**, 1976. New denitrifying bacteria isolated from Red Sea sediments. *Mar. Biol.* **37**, pp. 1-10.
135. **Hell, F.; Lahnsteiner, J.; Frischherz, H. and Baumgartner, G.**, 1998. Experience with full-scale electro dialysis for nitrate and hardness removal. *Desalination* **117(1-3)**, 173-180.

136. **Henze, M. and Harremões, P.**, 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors. A Literature review. *Water Science & Technology* 15 (8-9), pp. 1-101.
137. **Henze, M. Harremões, P.; la Cour, J. and Harbin, E.**, 2002. *Waster Treatment. Biological and chemical processes*. Edit Springer, 3rd Edition.
138. **Henze, M.; Kristensen, G.H. and Strube, R.**, 1994. Rate-capacity characterisation of wastewater for nutrient removal processes. *Water Science & Techonology* 29 (7), pp. 101-107.
139. **Herbert, R.A.**, 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23, pp. 563-590.
140. **Hinteregger, C. and Streichsbeir, F.**, 1997. *Halomonas* sp., moderately halophilic strain, for biotretament of saline phenolic waste-water. *Biotechnol. Lett.* 19 (11), pp. 1099-1102.
141. **Hollocher, T.C.**, 1984. Source of oxygen atoms of the nitrate oxidation of nitrite by *Nitrobacter agilis* and evidence aganinst a P-O-N anhydride mechanism in oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys* 233, pp. 721-727.
142. **Hontoria, E.; Bacquet, G. and Salguero, J.**, 1993. Groundwater denitrification with biofilm reactors. A case study in Spain. Second Internacional Specialized Conference on Biofilm Reactors, pp. 695-696. Paris
143. **Hoofman, R.N., and Vink, G.J.**, 1980. The determination of toxic effects of pollutants with the marine polychate, worm *Ophryotrocha diadema*. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 4, pp. 252-262.
144. **Horan, N.J. and Eccles, C.R.**, 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludge. *Wat. Res.* 20, pp. 1427-1432.
145. **Hörold, S.; Tacke, T. and Vorlop K.D.**, 1993. Catalytical removal of nitrate and nitrite from drinking water-I. Screening for hydrogenation catalysts and influence of reaction conditions on activity and selectivity. *Environmental Technology*, 14, 931-939.

146. **Hsieh, Y.; Tseng, S. and Chang, Y.**, 2003. Nitrogen removal from wastewater using a double-biofilm reactor with a continuous-flow method. *Bioresource Technology* **88**, pp. 107-113.
147. **Hunik, J.; Tramper, J. and Wijffels, R.H.**, 1994. A strategy to scale up nitrification processes with immobilised cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engng.* **11**, pp. 73-82.
148. **Hunter, C.H.; Senior, E.; Howard, J.R. and Bailey, I.W.**, 1999. Assessment of phenolic compound perturbations of a nitrifier microbial association maintained within a continuous-flow multi-stage laboratory model. *Water S.A.* **25 (2)**, pp. 167-174.
149. **Hurley, J.**, 1943. An English View on Contact Aeration. *Engineering News-Record*, pp. 130, 895.
150. **Hutton, W.C. and LaRocca, S.A.**, 1975. Biological treatment of concentrated ammonia wastes. *Water Pollution Control* **47**, pp. 989-997.
151. **IEH. Institute for Environment and Health**, 1995. Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Assessment A1.
152. **Iwai, S. and Kitao, T.**, 1994. Wastewater treatment with microbial films. *Technomic Publication. Lancaster, Pennsylvania.*
153. **Jannasch, H.W.**, 1960. Versuche über die denitrifikation und die verfügbarkeit des Sauerstoffs in wasser und gewässer. *Arch. Hydrobiol.* **56**, pp. 355-369.
154. **Jones, G.L. and Paskins, A.R.**, 1982. Influence of high partial pressure of carbon dioxide and/or oxygen on nitrification. *Chem. Technol. Biotechnol.* **32**, pp. 213-223.
155. **Jorgensen, B.B. and Richardson, K.**, 1996. Eutrophication in coastal marine ecosystems. *American Geophysical Union. Washington.* Pp. 272.
156. **Jou, C. J. and Huang, G.C.**, 2003. A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed-film bioreactor. *Advances in Environmental Research* **7 (2)**, pp. 463-469.

157. **Juárez, B.**, 2002. Efecto de los compuestos fenólicos sobre el crecimiento y la actividad biológica de *Azotobacter chroococcum*. Tesis Doctoral. Dep. de Microbiología. Instituto del Agua. Universidad de Granada.
158. **Jung, M.; Ahn, K.; Lee, Y.; Kim, K.; Rhee, J.; Park, J. and Paeng, K.**, 2001. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). *Microchemical Journal* **70**, pp. 123-131.
159. **Junta de Andalucía.** Consejería de Medio Ambiente, 1995. Plan de Medio Ambiente de Andalucía (1995-2000).
160. **Junta de Andalucía.** Consejería de Medio Ambiente, 1999. Informe 1998 Medio Ambiente en Andalucía.
161. **Kanekar, P.P.; Sarnaik, S.S. and kelkar, A.S.**, 1999. Bioremediación of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *Journal of Applied Microbiology* **85 (Suppl S)**, pp. 128S-133S.
162. **Kapoor, A.; Kumar, R.; Kumar, A.; Sharma, A. and Prasad, S.**, 1998. Application of immobilized mixed bacterial culture for the degradation of phenol present in oil refinery effluent. *J. Environ. Sci. Health A.* **33**, pp. 1009-1021.
163. **Karapanagiotis, N.K.; Rudd, T.; Sterritt, R.M. and Lester, J.N.**, 1989. Extraction and characterization of extracellular polymers in digested sewage sludge. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **44**, pp. 107-120.
164. **Kargi, F. and Dincer, A. R.**, 1997. Biological treatment of saline wastewater by bed-batch operation. *Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, pp. 167-172.
165. **Karim, K. and Gupta, S.K.**, 2001. Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresource Technology* **80**, pp. 179-186.
166. **Karnovic-Ozretic, M. and Orzetic, B.**, 1988. Toxic effects of phenols on grey mullet, *Mugilus auratus* Risso. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **40**, pp. 23-29.
167. **Karschunke, K. and Sieker,** 1997. Grenzen der denitrification in der biofiltrationstechnik am beispiel der kläranlage Nyborg. *GWF Wasser Abwasser* **138 (7)**, pp. 337-344.

168. **Karvlock, R.J.; Daston, G.P.; DeRosa, C. et al.**, 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* **104**, pp. 715-740.
169. **Keefer, C. E.**, 1940. *Sewage-Treatment Works*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, NY.
170. **Kessler, L. H. and Norgaard, J.T.**, 1942 Operation of Army Sewage Treatment Plants. *Sewage Works Journal* **14**, pp. 1228-1261.
- 171.
172. **Kimor, B.**, 1992a. Impact of eutrophication on phytoplankton composition. In: *Marine Coastal Eutrophication*, eds. R.A. Vollenweider, R. Marchetti and R. Vicviani, pp. 871-878. Elsevier. Amsterdam.
173. **Kimor, B.**, 1992b. The impact of eutrophication on phytoplankton composition in coastal marine ecosystems. *Science of the Total Environmental*. No. Supplement. pp. 871-878.
174. **Kirk-othmer**, 1996. *Encyclopaedia of Chemical Thecnology* **18**, pp. 580-602, John Wiley and Sons.
175. **Knoop, S. and kunst, S.**, 1998. Influence of temperature and sludge loading on activated sludge sttling, especialy on *Microthix parvicella*. *Water Science & Technology* **37 (4-5)**, pp. 27-35.
176. **Koike, I. and Hattori, A.**, 1978. Controlled ecosystem pollution experiment: effect of mercury on enclosed water columns. VI. Denitrification by marine bacteria. *Mar. Sci. Commun.* **4**, pp. 1-12.
177. **Kolot, F.B.**, 1988. In: Robert, E. (Ed.), *Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications*. Krieger, New York.
178. **Kornaros, M. and Lyberatos, G.**, 1998. Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification Ander aerobic, anoxic and transiet operating condiction. *Water Research* **32 (56)**, pp. 1912-1922.
179. **Körner, H. and Zumft, W.G.**, 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the disolved oxygen level and respiratory substrate in continous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microb.* **55**, pp. 1670-1676.

180. **Koyuncu, I.; Topacik, D.; Turan, M.; Celik, M.S. and Sarikaya, H.Z.,** 2001. Application of the membrane technology to control ammonia in surface water. *Water Science and technology: Water Supply* 1 (1), pp.117-124.
181. **Kowalska, M.; Bodzek, M. and Bohdziewicz, J.,** 1998. Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *Process Biochemistry* 33 (2), pp. 189-197.
182. **Kristensen, H. and Jepsen, S.,** 1991. Biological denitrification of wastewater from wet lime gypsum flue gas desulphurization plant. *Water Science Technology* 23 (4-6), pp. 691-700.
183. **Lacalle, M.; Villaverde, S.; Fdez-Polanco, F and García-Encina, P.,** 2001. Combined anaerobic/aerobic (UASB+UBAF) system for organic matter and nitrogen removal from a high strength industrial wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 44 (4), pp. 255-262.
184. **Lacamp, B.; Hansen, F.; Penillard, P. and Rogalla, F.,** 1993. Wastewater nutrient removal with advanced biofilm reactors. *Water Science & Technology* 27, pp. 263-276.
185. **Larrea, L.,** 1998. Eliminación de nitrógeno y fósforo. En XVI Curso sobre Tratamiento de Aguas Residuales y Explotación de Estaciones Depuradoras. CEDEX. Madrid.
186. **Lassus, P.; Herbland, A. and Abd Lebaut, C.,** 1991. In Recent approaches of red tides. *Proceedings of 1990 Korean French Seminar on Red Tides*, eds. J.S. Park and H.G. Kim, pp. 121-134. National Fisheries Research and Development Agency. Republic of Korea.
187. **Lawson, C.,** 1981. Development of a biological denitrification process for a high strength industrial waste. *Proceeding of the 35th Purdue Industrial Waste Conference*. Purdue University. Lafayette I.N.
188. **Lazarova, V.Z., Capdeville, B. and Nikolov, L.,** 1994. Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Water Research* 28 (5), 1189-1197.

189. **Lazarova, A. and Manem, J.**, 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* **29** (10), pp. 2227-2245.
190. **Lazarova, V.; Nogueira, R.; Manem, J. and Melo, L.**, 1998. Influence of dissolved oxygen on nitrification kinetics in a circulating bed reactor. *Wat. Sci. Technol.* **37** (4/5), pp. 189-193.
191. **Lazarova, V.Z.; Bellahcen, D.; Manem, J.; Staahl, D. and Rittmann, B.**, 1999. Influence of operating conditions on population dynamics in nitrifying biofilms. *Water Science & Technology* **37** (7), pp. 5-11.
192. **Leakovic, S.; Mijatovic, L. and Hodzic, E.**, 1999. Nitrogen removal from fertilizer wastewater by ion exchange. *Wat. Res.* **34** (1), pp. 185-190.
193. **Lewandowski, Z.; Stoodley, P. and Altobelli, S.**, 1995. Flow induced vibration, drag forces and pressure drop in conduits covered with biofilm. *Water Science & Technology* **32**, pp. 19-26.
194. **Ley 22/1988**, de 28 de julio, de Costas.
195. **Li, X.Z. and Zhao, Q.L.**, 2001. Efficiency of biological treatment affected by high strength of ammonium-nitrogen in leachate and chemical precipitation of ammonium-nitrogen as pretreatment. *Chemosphere* **44**, pp 37-43.
196. **Lie, E. and Welander, T.**, 1994. Influence of dissolved oxygen and oxidation-reduction potential on the denitrification rate of activated sludge. *Nagle*, pp. 91-10.
197. **Liang, S.; Mann, M.A.; Guter, G.A.; Kim, P.H.S. and Hardan, D.L.**, 1999. Nitrate removal from contaminated groundwater. *Journal American Water Works Association* **91**(2), 79-91.
198. **Liang, Y.; Quan, X.; Chen, J.; Chung, J.; Sung, J.Y.; Chen, S.; Xue, D. and Zhao, Y.**, 2000. Long-term results of ammonia removal and transformation by biofiltration. *J. Hazardous Materials* **80**, pp. 259-269.
199. **Lin, J.G.; Chang, C.N. and Wu, J.R.**, 1996. Decomposition of 2-Chlorophenol in aqueous solution by ultrasound/H₂O₂ process. *Water Science & Technology* **33** (6), pp. 75-81.

200. **Lin, S. and Wang, C.**, 2002. Treatment of high-strength phenolic wastewater by a new two-step method. *Journal of Hazardous Materials* **B90**, pp. 205-216.
201. **Liu, L.H. and Koinig, A.**, 2002. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: batch experiments. *Process Biochemistry* **37**, pp. 885-893.
202. **López, J.**, 2002. El mar: contaminación, características químicas y eutrofización. Miraguano Ediciones.
203. **Lutz-Arend, M.; Köster, M.**, 2000. Eutrophication of marine waters: effects on benthic microbial communities. *Marine Pollution Bulletin* **4**, Nos 16, pp.255-263.
204. **Lye, Christina M.**, 2000. Impact of oestrogenic substances from oil production at sea. *Toxicology Letters* **112-113**, pp. 265-272.
205. **Marcipar, A.; Cochet, N.; Brackenridge, L. and Lebeault, J.M.**, 1978. Immobilization of yeasts on ceramic supports. *Biotechnol. Lett* - **1**, pp.65.
206. **Margalef, R.**, 1995. Ecología. 8ª Reimpresión. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
207. **Margalis, I. And Lovelock, J.E.**, 1974. Biological modulation of the earth's atmosphere. *Icarus* **21**, pp. 471-489.
208. **Márquez, M.C.; Ventosa, A. And Ruiz-Berraquero, F.**, 1987. A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. Gen. Microbiol.* **133**, pp. 45-56.
209. **Martínez-Toledo, M.V.**, 1992. *Biología del nitrógeno en interacción planta-microorganismo*. Biología del nitrógeno (González-López, J y Lluch-Pla, C. Eds.) Editorial Rueda, Alarcón (Madrid), pp. 26-35.
210. **Marttinen, S.K.; Kettunen, R.H.; Sormunen, K.M.; Soimasuo, R.M. and Rintala, J.A.**, 2002. Screening of physical-chemical methods for removal of organic material, nitrogen and toxicity from low strength landfill leachates. *Chemosphere* **46**, pp. 851-858.
211. **Matsuoka, k.**, 1999. Eutrophication process recorded in dinoflagellate cyst assemblages- a case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. *Sci Total Environ* **231**, pp.17-35.

212. **McCarty, P.L.**, 1971. Energetics and kinetics of anaerobic treatment. In *Anaerobic Biological Treatment Processes*, ed. R.F. Gould, 159th Meeting of the American Chemical Society, Houston, Tex., *Advances in Chemistry* 105, Washington DC.
213. **Mc Kenney, D.J.; Johnson, G.P. and Findlay, W.J.**, 1984. Effect of temperatura on consecutive denitrification reactions in brookston clay and fox sandy loam. *Applied and Environmental Microbiology* 47, pp. 919-926.
214. **McLeese, D.W.; Zitko, V.; Sergeant, D.B.; Burrige, L. and Metcalfe, C.D.**, 1981. Lethality and accumulation of alkilphenols in aquatic fauna. *Chemosfere* 10 (7). pp. 723-730.
215. **McMmeekin, T.A. et al.** , 1993. Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic Saline Lakes. *Experientia* 49, pp. 1042-1046.
216. **Meadows, P.S.**, 1971. The attachment of bacteria to solid surfaces. *Arc. Microbiol.* 75, pp. 374.
217. **Meaney, B.J.; and Strickland, J.E.**, 1994. Operating experience with submerged filters for nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.* 29 (10/11), pp. 119-125.
218. **Menoud, P.; Wong, C.H.; Robinson, H.A.; Farquhar, A.; Bardford, J.P. and Barton, G.W.**, 1999. Simultaneous nitrification and denitrification using siporaxTM packing. *Wat. Sci. Tech.* 40, pp. 153-160.
219. **Metcalf, L. and Eddy, H.**, 1916. *American Sewerage Practice, Vol. III - Disposal of Sewage*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
220. **Metcalf and Eddy.**, 1995. *Wateswater engineering: treatment, disposal and reuse.* (3^a ed.) Mc Graw-Hill, New York.
221. **Mokrini, A.; Ousse, D. and Esplugas, E.**, 1997. Oxidation of aromatic compounds with uv radiation/ozzone/hydrogen peroxide. *Water Science & Technology* 35 (4), pp. 95-102.
222. **Mordocco, A.; Kuek, C. and Jenkins, R.**, 1999. Continuous degradation of pheno al low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. *Enzyme & Microbial Technology* 25 (6), pp. 530-536.

223. **Moreno, B.**, 2001. Mejora de los parámetros de diseño de filtros sumergidos aplicados a la desnitrificación de aguas subterráneas mediante la inoculación selectiva. Tesis Doctoral Univ. de Granada. ETS. de I.C.C.y P. Dpto. Ingeniería Civil. Instituto del Agua.
224. **Moreno, J.**, 1986. Actividad biológica de *Azotobacter* en el suelo: fijación de nitrógeno atmosférico y utilización de compuestos fenólicos. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.
225. **Morgan, J.; Forster, C.F. and Evison, L.**, 1990. A comparative study of the nature of biopolymer extracted from anaerobic and activated sludges. *Wat. Res.* **24** (6), pp. 743-750.
226. **Müller-Nuglück, M. and Engle, H.**, 1961. Photoinaktivierung von *Nitrobacter winogradskyi*. *Buch. Arch. Mikrobiol.* **39**, pp. 130-138.
227. **Muñoz, J.A.; Pérez-Esteban, B.; de la Escalera, S.; Gómez, M.A.; Martínez-Toledo, M.V. and González-López, J.**, 2001. Growth of moderately halophilic bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source. *Folia Microbiol.* **46** (4), pp. 297-302.
228. **Muyzer, G.; de Waal, E.C. and Uitterlinden A.G.**, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**, pp. 695-700.
229. **Muyzer, G. and Smalla, K.**, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, pp. 127-141
230. **Muyzer, G.**, 1999. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**, pp. 317-322
231. **Nandy, T. And Kaul, S.N.**, 2001. Anaerobic pre-treatment of herbal-based pharmaceutical wastewater using fixed-film reactor with recourse to energy recovery. *Water Research* **35** (2), pp. 351-362.
232. **Neufeld, R.D.; Hill, A.J. and Adekoya, D.O.**, 1980. Phenol and free ammonia inhibition to *Nitrosomonas* activity. *Water Research* **14**, pp. 1695-1703.

233. **Nguyen, V.T. and Shieh, W.K.**, 1995. Anoxic and oxic biological fluidized bed treatment of amines and phenol. *Water Science & technology* **31(1)**, pp. 185-193.
234. **Nielsen, P.H.**, 1996. Adsorption of ammonium to activated sludge. *Wat. Res.* **30**, pp. 762-764.
235. **Nielsen, P.H. and Jahn, A.**, 2000. Extraction of EPS. In a: Microbial extracellular polymeric substances. *Characterization, structure and function*. Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C.(eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
236. **Nielsen, P.H.; Jahn, A. and Palmgren, R.**, 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilm. *Water Sci. Technol.* **36**, pp. 11-19.
237. **Ninassi, M.; Peladam, J. and Pujol, R.**, 1998. Pre-denitrification of municipal wastewater: The interest of up-flow biofiltration. *Proc. Conf. WEFTEC '98*, October 3-7, Orlando, Florida, **vol.1**, pp. 445-466.
238. **Nogueira, R.; Lazarova, J and Melo, F.**, 1998. Influence of dissolved oxygen on the nitrification kinetics in a circulating bed biofilm reactor. *Bioproc. Eng.* **19**, pp. 441-449.
239. **Nowak, O.; Schweighofer, P. and Svardal, K.**, 1994. Nitrification inhibition- A method for the estimation of actual maximum autotrophic rates in activated sludges systems. *Water Science & Technology* **30 (6)**, pp. 9-19.
240. **O'Kelly, J.C.; Becker, G.E. and Nason, A.**, 1970. Characterization of the particulate nitrite oxidase and its component activities from the chemoautotroph *Nitrobacter agilis*. *Biochem. Biophys. Acta* **205**, pp. 409-425.
241. **Odum, E. P.**, 1971. *Fundamentals of ecology*. 3ª edición. W.B. Saunders, Philadelphia.
242. **Oh, J. and Silverstein, J.**, 1999. Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research* **33 (8)**, pp. 1925-1937.
243. **Oh, J.; Yoon, S.M. and Park, J.M.**, 2001. Denitrification in submerged biofilters of concentrated-nitrate wastewater. *Wat. Sci. Technol.* **43 (1)**, pp. 217-223.

244. **Olso, R.J.**, 1981. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. *J. Mar. Res.* **39**, pp. 227-238.
245. **Orden del 31 de octubre de 1989**, sobre normas de emisión, objetivos de calidad, métodos de medida de referencia y procedimientos de control relativos a determinadas sustancias peligrosas contenidas en los vertidos desde tierra al mar.
246. **Orhon, D.; Genceli, E.A. and Sozen, S.**, 2000. Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewater. *Water S.A.* **26 (1)**, pp. 43-50.
247. **Osorio, F.**, 1998. Optimización de lechos inundados con soporte de residuos reciclados. Tesis Doctoral. Univ. Granada. Depto. Ingeniería Civil.
248. **Osorio, F. and Hontoria, E.**, 2001. Optimization of bed material height in a submerged biological aerated filter. *J. Env. Eng. (ASCE)*. Nov. 2001.
249. **Otte, S.; Schalk, J.; Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M.**, 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **51**, pp. 255-261.
250. **Ott, L. S.**, 1982. Personal Communication, University of Maryland, College Park, MD.
251. **Oviatt, C.; Lane, P.; French, F. and Donaghay, P.**, 1989. Phytoplankton species and abundance in response to eutrophication in coastal marine mesocosms. *Journal of the Plankton Research* **11**, pp. 1223-1244.
252. **Ozbelge, T.; Ozbelge, O. and Baskaya, S.**, 2002. Removal of phenolic compounds from rubber-textile wastewaters by physico-chemical methods. *Chemical Engineering and Processing* **41**, pp. 719-730.
253. **Painter, H.**, 1986. Nitrification in sewage treatment. In: Prosser, J.I. (Ed.). *Nitrification*. IRL Press. Oxford, England
254. **Painter, H. and Loveless, J.**, 1983. Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated-sludge process. *Wat. Res.* **17**, pp. 237-248.

255. **Pansward, T and Anan, C**, 1999. Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. *Bioresource Technology* **70**, pp. 237-243.
256. **Park, E.; Seo, J.; Kim, M.; Jung, I.; Kim, J. and Kim, S.**, 2001. Salinity acclimation of immobilized freshwater denitrifier. *Aquacultural Engineering* **24**, pp. 169-180.
257. **Patureau, D.; Davison, J.; Bernet, N. and Moletta, R.**, 1994. Denitrification under various aeration conditions in *Comamonas* sp. Strain SGLY2. *FEMS Microbiology Ecology* **14**, pp. 71-78.
258. **Payne, W.J.**, 1981. Denitrification. Wiley-Interscience, New York.
259. **Pearse, L.**, 1938. Modern Sewage Disposal, Lancaster Press, Inc. Lancaster, PA.
260. **Peladan, J.G.; Lemmel, H.; Tarallo, S.; Tattersall, S. and Pujol, R.**, 1997. A new generation of upflow biofilters with high water velocities. Proceedings of International Conference on Advanced Wastewater Treatment Processes. Leeds, U.K.
261. **Percival, S.; Walker., and Hunter, P.**, 2000. Microbiological aspects of biofilms and drinking water. Series Edit. Vreeland, R. CRC Press, Boca Raton, London, New York.
262. **Pérez, J.**, 1994. *Legislación Ambiental, anotada, concordada y comentada*. Editorial Comares.
263. **Peyton, B.; Mormile, M. and Petersen, J.**, 2001. Nitrate reduction with *Halomonas campisalis*: kinetics of denitrification at pH 9 and 12.5 % NaCl. *Wat. Res.* **35 (17)**, pp. 4237-4242.
264. **Peyton, B.; Wilson, T. And Yonge, D.**, 2002. Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions. *Water Research*. In Press.
265. **Pintar, A.; Batista, J. and Levec, J.**, 1998. Potential of mono and Bimetallic Catalysts for Liquid Phase Hydrogenation of Aqueous Nitrite solutions. *Water Science Technology*. **37(8)**: 177-185.

266. **Polaert, I; Wilhelm, M. and Delmas, H.**, 2002. Phenol wastewater treatment by a two-estep adsorption oxidation process on activated carbon. *Chemical Engineering Science* **57**, pp. 1585-1590.
267. **Ponting, Clive.**, 1992. *Historia verde del mundo*. 1ª Edición. Ediciones Piados. Barcelona-Buenos Aires-México.
268. **Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A.**, 1999. *Microbiología* 4ª edición. Ed. Mc Graw-Hill Internacional. Madrid.
269. **Pugnetti, A.; Viaroli, P. And Ferrari, M.**, 1992. Proceses leading to dystrophy in a po River delta lagoon (Sacca Di Goro): phytoplankton-macroalgae interaction. *Sci. Tot. Enviro. Suppl.* **6**, pp. 445-456.
270. **Pujol, R.; Hamon, H.; Kandel, X. and Lemmel, H.**, 1994. Biofilters, flexible, reliable biological reactors. *Water Science & Technology* **29**, pp. 33-38.
271. **Pujol, R.; Peladan, J.G. and Buchl, K.H.**, 1995. Nutrient removal by up flow biofiltration. *Proceeding of 7th International Conference on Desing and Operation of Large Wastewater Treatment Plants*. Viena.
272. **Pujol, R.; Lemmel, H. and Gousailles.**, 1998. A keypoint of nitrification in an upflow biofiltration reactor. *Wat. Sci. & Technol.* **38 (3)**, pp. 43-49.
273. **Puznava, N.; Payraudeau, M. and Thornberg, D.**, 2001. Simultaneous nitrification and denitrification in biofilters with real time aeration control. *Wat. Sci. Technol.* **43 (1)**, pp. 269-276.
274. **Ramos, A.F.; Moreno, B.; Pérez, J.I.; Osorio, F.; Martiniz-Toledo, M.; Gómez, M.A. and Hontoria, E.**, 2002. Treatment of industrial wastewater effluents with high nitrogen content and high salinity by a submerged biofilter system. *Internacional Congress Watmed 2002. The water in the Mediterranean Basin: Resources and Sustainable Development*. Monastir. Tunissia.
275. **Randall, C.W. and Buth, D.**, 1984. Nitrite build-up in activated sludge resulting from combined temperature and toxicity effects. *Water Pollution control* **56**, pp. 1045-1049.
276. **Real Decreto 258/1989**, de 10 de marzo de 1989, por el que se aprueba la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar.

277. **Reddy, K.J. and Lin, J.P.**, 2000. Nitrate Removal from Groundwater Using Catalytic Reduction. *Water Research*, **34(3)**, pp. 995-1001.
278. **Regner, D.**, 1991. the progressive changes of the copepod community from the eastern Adriatic coast caused by eutrophication. *Toxicology and Environmental Chemistry* **31-32**, pp. 433-439.
279. **Rheinheimer, G.**, 1987. *Microbiología de las Aguas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
280. **Ribbons, D. W.**, 1966. The microbiological degradation of aromatic compounds. *Annual Reports of the Chemical Society* **62**, pp.445-468.
281. **Richard, Y. and Thébault, P.**, 1992. Biological removal of nitrates-report on 7 years of operation and progress. *Water supply* **10 (3)**, pp. 151-160.
282. **Richardson, K. and Jorgensen, B.B.**, 1996. eutrophication: definition, history and effects. In: *Eutrophication in coastal marine ecosystems*. Eds. B.B. Jorgensen. and K. Richardson, pp. 1-19. American Geophysical Union. Washigton.
283. **Riegman, R.**, 1985. Nutrient-related selection mechanisms in marine plankton communities and the impact of eutrophication on the plankton food web. *Water Science Technology* **32**, pp. 63-75.
284. **Riesner, D.; Steger, G.; Zimmat, R.; Owens, R.A.; Wagenhofer, M.; Hillen, W.; Vollbach, S. and Henco, K.**, 1989. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis* **10**, pp. 377-389
285. **Rittmann, B. And Langeded, W.**, Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. *J. water Pollution Control Fedn.* **57**, pp. 300-308.
286. **Rittmann, B. And McCarty, P.**, 2001. *Biotechnología del medio ambiente*. Mc Graw-Hill.
287. **Rogalla, F. and Bourbigot, M.M.**, 1990. New developments in complete nitrogen removal with biological aerated filters. *Wat. Sci. Tech.* **22 (1/2)**, pp. 273-280.

288. **Rönner, V.**, 1983. Biological nitrogen transformations in marine ecosystems with emphasis on denitrification. Dissertation. Universitat Gotteborg.
289. **Rosa, M.; Furtado, A.; Albuquerque, R.; Leite, S. and Medronho, R.**, 1998. Biofilm development and ammonia removal in the nitrification of a saline wastewater. *Bioresource Technology* **65**, pp. 135-138.
290. **Ronstrom, W.**, 1998. Nitrification of high strength ammonia wastewater using immobilised nitrifiers. PhD-dissertation, Department of Chemical Engineering, Imperial College, London, UK.
291. **Rozic, M.; Kurajica, S.; Vancina, V. and Hodzic.**, 2000. Ammoniacal nitrogen removal from water by treatment with clays and zeolites. *Wat. Res.* **34 (14)**, pp. 3675-3681.
292. **Ruiz, G.; Jeison, D. and Chamy, R.**, 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research* **37**, pp. 1371-1377.
293. **Rust, C.; Marjorie, C. and Flora, J.**, 2002. Laboratory sand column study of encapsulated buffer release for pontencial in situ pH control. *Journal of Contaminant Hydrology* **54**, pp. 81-98.
294. **Sa, C.S. and Boaventura, R.A.**, 2001. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a trickling bed reactor. *Biochemical Engineering journal* **9**, pp. 211-219.
295. **Sakano, Y.; Pickering, K.; Strom, P. and Kerkhof, L.**, 2002. Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, pp. 2285-2293.
296. **Santegoeds, C.M.; Ferdelman, T.G.; Muyzer, G. and de Beer, D.**, 1998. Structural and functional dynamics of sulphate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, pp. 3731-3739.
297. **Sarkar, S. and Margules, C.**, 2002. Operationalizing biodiversity for conservation planning. *Journal of Bioscience.* **27**, pp. 299-308.
298. **Sata, T. and Nojima, S.**, 1999. Transport-Properties of anion-exchange membranes prepared by the reaction of cross-linked membranes having

- chloromethyl groups with 4-vinylpyridine and trimethylamine. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer physics* **37(15)**, 1773-1785.
299. **Satsangee, R. and Ghosh, P.**, 1996. Short communication: continuous anaerobic phenol degradation using adapted mixed culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, pp. 409-411.
300. **Schenk, H and Hegemann, W.**, 1995. Nitrification inhibition by high salt concentrations in the aerobic biological treatment of tannery wastewater. *Wasser/Abwasser* **136(9)**, pp. 465-470.
301. **Schidt, I.; Sliemers, O.; Schmid, M.; Cirpus, I.; Strous, M.; Bock, E.; Kuenen, G. and Jetten, M.**, 2002. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria – competitors or natural partners. *FEMS Microbiology Ecology* **1319**, pp. 1-7.
302. **Schuurmann, G.; Segner, H. and Jung, K.**, 1997. Multivariate mode-of-action analysis of acute toxicity of phenols. *Aquatic Toxicology* **38(4)**, pp. 277-296.
303. **Seropian, J.C; Vergne, C.; Moro, A. and Capdeville, B.**, 1989. La dénitrification biologique d'eau à potabiliser par lit fluide. *TSM-L'eau* **84**, pp. 527-532.
304. **Sharma, B. and Ahlert, R.C.**, 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Wat. Res.* **11**, pp. 897-925.
305. **Sheng, H.L. And Chang, L.W.** 1996 Removal of nitrogenous compounds from aqueous solution by ozonation and ion exchange. *Water Research* **30**, 1851-1857.
306. **Sheng, H.L.; Ching, T.S. and Mei, C.S.**, 1998. Saline wastewater treatment by electrochemical method. *Water Science & Technology* **32 (4)**, pp. 1059-1066.
307. **Sison, N.F.; Hanaki, K. and Matsou, T.**, 1996. Denitrification with external carbon source utilizing adsorption and desorption capability of activated carbon. *Water Research* **30**, pp. 217-230.
308. **Smith, R.A.**, 1867. On the examination of water for organic matter. *Manchester. Let. Philos. Soc. Mem. Ser. 4*, pp. 37-88.

309. **Smith, A.T. and Hardy, J.P.**, 1992. High rate sewage treatment using biological aerated filters. *JIWEM* **3** (2), pp. 154-167.
310. **Songgming, Z. and Shulin, C.**, 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering* **25**, pp. 1-11.
311. **Sonnenschein, C. and Soto, A.**, 1998. An undated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol **65**, No. 1-6, pp. 143-150.
312. **Sorensen, K.H.; Thornberg, D. and Janning, K.F.**, 2000. Using advanced control, post-denitrification and equalisation to improve the performance of a submerged filter. *Wat. Sci. Technol.* **41** (4-5), pp. 117-184.
313. **Soto, M.; Méndez, R. And Lema, J.M.**, 1993. Sodium inhibition and sulphate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewater. *Chem. Tech. Biotechnol* **58**, pp. 1-7.
314. **Spacek, W.; Bauer, R. and Heisler, G.**, 1995. Heterogeneous and homogeneous wastewater treatment comparison between photodegradation with TiO₂ and the photo-fenton reaction. *Chemosphere* **30**(3),pp. 477-484.
315. **Spacie, A.; Hamelink, J.L.**, 1985. Bioaccumulation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere, New York, pp. 492-525.
316. **Sprent, J.L.; Sutherland, J.M. and De Faria, S.M.**, 1987. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *A Century of Nitrogen Fixation Research: Present Status and Future Prospects* (*Proceeding of Royal Society Discussion Meeting 2-23 October 1986*) ed. Bergensen, F.J. y Postgate, J.R. pp. 45-63. The Royal Society (Cambridge University Press). London.
317. **Stainer, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M and Painter, P.**, 1988. *Microbiología*. Segunda Edición. Editorial Reverté, S.A., pp. 218-220.
318. **Stephen, J.R.; McMaig, A.E.; Smith, Z.; Prosser, I.M. and Embly, M.T.**, 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S and RNA gene sequences related to beta subgroup ammonia oxidising bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, pp. 4147-4154.

319. **Stephens, C.**, 2002. Microbiology: breaking down biofilms. *Current Biology*, **12**, pp. 132-134.
320. **Strenstrom, M.K. and Song, S.S.**, 1991. Effects of oxygen transport limitation on nitrification in the activated sludge process. *J. Water Pollut. Control Fed.* **63 (3)**, pp. 208-219.
321. **Sundermeyer-Klinger, H.; Meyer, W.; Warninhoff, B. and Bock, E.**, 1984. Membrane bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrite reductase system of the bacterium. *Arch. Microbiol.* **140**, pp. 153-158.
322. **Tampion, J. and Tampion M.D.**, 1987. Immobilized cells: Principles and application. Cambridge University Press, Cambridge.
323. **Tarre, S. and Green, M.**, 1994. Precipitation potential as a major factor in the formation of granular sludge in an upflow sludge-bloket reactor for denitrification of drinking water. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**, pp. 482-486.
324. **Tejero, I.**, 1998. Procesos biológicos de película fija. En XVI Curso sobre Tratamiento de Aguas Residuales y Explotación de Estaciones Depuradoras. CEDEX, Madrid.
325. **Thauer, R.K.; Jungermann, K. and Decker, K.**, 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**, pp. 100-180.
326. **Thomas, K.L.; Llyyd, D. and Boddy, L.**, 1994. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiology Letters* **118**, pp. 181-186.
327. **Thomsen, J.K.; Geest, T. and Cox, R.P.**, 1994. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microb.* **60 (2)**, pp.536-541.
328. **Trillo, J.D.**, 1998. Sistemas de aireación. Técnicas aplicables al diseño y gestión. En XVI Curso sobre Tratamiento de Aguas Residuales y Explotación de Estaciones Depuradoras. CEDEX, Madrid.
329. **Tritt, W.P.**, 1992. The anaerobic treatment of slaughter-house wastewater in fixed bed reactors. *Biores. Technol.* **41**, pp. 201-207.

330. **Tseng, C., Potter, T. and Koopman, B.**, 1998. Effect of influent chemical oxygen demand to nitrogen ratio on a partial nitrification/complete denitrification process. *Wat. Res.* **32 (1)**, pp. 165-173.
331. **van Dongen, U.; Strous, M. van de Pas-Schoonen, K.; van Loosdrecht, M. Kuenen, J. and Jetten, M.**, 2000. Combination of partial nitrification and anaerobic ammonium oxidation (anammox) for the removal of ammonia from concentrated wastewater. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Environmental Technology*. Noordwijkerhout, the Netherlands, pp. 42-45.
332. **van Loosdrecht, M.; Eikelboom, D. ; Gjaltema, A.; Mulder, A.; Tjihuis, L. and Heijnen, J.**, 1996. Biofilm structures. *Wat. Sci. Tech.* **32 (8)**, pp. 35-43.
333. **van Schie, P.M. and Young, L.Y.**, 1998. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, pp. 2432-2438.
334. **van Schie, P.M. and Young, L.Y.**, 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation J* **4**, pp.1-18.
335. **Ventosa, A. and Nieto, J.J.**, 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Microbiol Biotechnol* **11**, pp. 85-94.
336. **Verstraete, W. and Alexander, M.** 1972. Heterotrophic nitrification by *arthrobacter sp.* *J. bacteriol.* **110**, pp. 955-961.
337. **Villaverde, S.; García-Encina, P. and Fdz-polanco, F.**, 1996. Influence pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Wat. Res.* **31 (5)**, pp. 1180-1186.
338. **Villaverde, S.; Fdz-Polanco, F. and Garcia, P.A.**, 2000. Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence. *Wat. Res.* **34 (2)**, pp. 602-610.
339. **Vollenweider, R.A.**, 1992. Coastal marine eutrophication: principles and control. In: *Marine Coastal Eutrophication*, Eds. R.A. Vollenweider, R. Marchetti and R. Vicviani, pp. 1-20. Elsevier. Amsterdam.

340. **Vrendenbregt, L.H.J.; Nielsen, K.; Potma, A.A.; Kristensen, G.H. and Sund, C.**, 1997. Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater. *Water Science & Technology* **36** (1), pp. 93-100.
341. **Watanabe, K.; Yamamoto, S.; hino, S. and Harayama, S.**, 1998. Population dynamics of phenol-degradation bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, pp. 1203-1209.
342. **Watson, S.W.**, 1965. Characteries of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. *Limnol. Oceanogr* **10**(Suppl.), pp. 274-289.
343. **Weisburg, W.G.; Barn, S.M.; Pelletier, D.A. and Lane, D.J.**, 1990. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, pp. 697-703
344. **Welander, U.; Herrysson, T. and Welander, T.**, 1997. Nitrification of landfill leachate using suspended-carrier biofilm technology. *Water Research* **31**, pp. 2351-2355.
345. **Wetzel, R.G.**, 1975. Dissolved organicmatter and phytoplanktonic productivity in mare lakes. *Limnology*. Philadelphia, Saunders, 743S.
346. **Widdel, F and Rabus, R.**, 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, pp. 259-276.
347. **Wickens, J.F.**, 1983. Studies on marine biological filters. *Wat. Res.* **12**, pp. 1769-1780.
348. **Wild, D von Schultherss and Gujer, W.**, 1995. Structured modelling of denitrification intermediates. *Water Science and Technology* **31** (2), pp. 45-54.
349. **Wilson, L.P. and Bouwer, E.J.**, 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J. Anal. Chem.* **39**, pp. 116-130.
350. **Wimpennig, J.W.T. and Calasauti, R.**, 1997. A unifying hypotesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *Water Research* **22**, pp. 1-16.
351. **Wingender, J.; Neu, T.R. and Flemming, H.C.**, 1999. What are bacterial extracellular polimeric substances? In: Wingender, J.; Neu, T.R. and

- Flemming, H.C., (eds) *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-19.
352. **Woese, C.R.; Weisburg, W.G.; Hahn, C.M.; Paster, B.J.; Zablen, L.B.; Lewis, B.J.; Macke, T.J.; Ludwig, W. and Stackebrandt, E.**, 1984. The phylogeny of the purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, pp. 25-33.
353. **Woese, C.R.; Weisburg, W.G.; Hahn, C.M.; Paster, B.J.; Zablen, L.B.; Lewis, B.J.; Macke, T.J.; Ludwig, W. and Stackebrandt, E.**, 1984. The phylogeny of the purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, pp. 327-336.
354. **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* **51**, pp. 221-271.
355. **Wood, P.** , 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser, J.I. (Ed.). *Nitrification*. IRL PRES. Oxford, England
356. **Wuertz, S.; Spaeth, R.; Hinderberger, A; Griebe, T.; Flemming, H.C. and Wilderer, P.A.**, 2001. A new method extraction of extracellular polymeric substance from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Wat. Sci. Technol.* **43 (6)**, pp. 25-31.
357. **Holub, W.; Przytocka, M.; Blaszyk, m. and Mycielski, R.**, 1999. Nitrite as agent selecting anaerobic phenol degrading microflora in petroleum refining sediments. *Wat. Res.* **34 (4)**, pp. 1354-1358.
358. **Woolard, C.R. and Irvine, R.L.**, 1995. Response of a periodically operated halophilic biofilm reactor to changes in salt concentration. *Water Science & Technology* **31(1)**, pp. 41-50.
359. **Wu, R.S.S.**, 1982. Periodic defaunation and recovery in a subtropical epibenthic community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **64**, pp. 253-270.
360. **Wu, R.S.S.**, 1999. eutrophication, water borne pathogens and xenobiotic compounds: environmental risks and challenges. *Marine Pollution Bulletin* **39**, Nos 1 12, pp. 11-22.

361. **Wulff, F.; Stigebrandt, A. and Rahm, L.**, 1990. Nutrient dynamics of the Baltics Sea. *Ambio*. **19**. pp. 126-133.
362. **Yamagishi, T.; Leite, J.; Ueda, S.; Yamaguchi, F. and Suwa, Y.**, 2001. Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Wat. Res.* **35 (13)**, pp. 3089-3096.
363. **Yamaguchi, F.; Shoji, T.; Suwa, Y.; Yonezama, Y. and Yokoyama, K.**, 1999. Diversity of colony-forming bacteria in activated sludges. Abstract of 33rd Annual Meeting of Japan Society on Water Environment, Abstract N^o
364. **Yang, R.D. and Humphrey, A.E.**, 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnology Bioeng.* **17**, pp. 1211-1235.
365. **Yong-Woo, L.; Say-Kee, O. and Chikashi, S.**, 1997. Effects of heavy metals on nitrifying bacteria. *Water Science & Technology* **36 (12)**, pp. 69-74.
366. **Zamorano, M.**, 1996. Estudio comparativo de rellenos en sistemas de depuración de lechos inundados. Tesis Doctoral. Univ. Granada. E.T.S. de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Depto. de Ingeniería Civil.
367. **Zamorano, M.; Menéndez, A; Moreno, M.A.; Hontoria, E. and González-López, J.**, 1996. Utilización de residuos industriales como soporte para la depuración biológica de aguas residuales. IV Simposium sobre el agua en Andalucía (Almería) Vol. 2, pp. 381-390.
368. **Zhang, L.C. and Bishop, P.L.**, 1994. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Research* **28**, pp. 2267-2277.
369. **Zhang, X.; Bishop, P.L. and Kinkle, B.**, 1999. Comparason of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* **39 (7)**, pp. 211-218.
370. **Zoh, K.D.; Daniels, J.I.; Knezovich, J.P., and Strenstrom, M.K.**, 1999. Treatment of hydrolysates of the high explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine and actahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine using biological denitrification. *J. Wat. Pollut Control Fed.* **71**, pp. 148-155.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología (IFD97-0477), y realizado gracias a la Empresa DSM DERETIL S.A, al Instituto del Agua, Departamento de Ingeniería Civil y Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.



Grupo MITA
Microbiología y Técnicas Ambientales
Universidad de Granada

