



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS
MONOAROMÁTICOS EN PRESENCIA
DE METALES PESADOS

LUIS M. AMOR CAMBÓN

Enero 2007

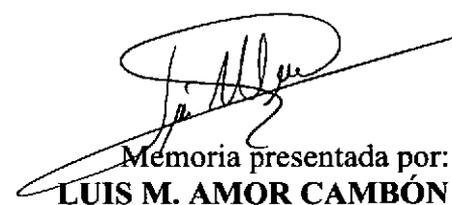


UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

**ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS
MONOAROMÁTICOS EN PRESENCIA
DE METALES PESADOS**



Memoria presentada por:
LUIS M. AMOR CAMBÓN

para optar al grado de Doctor por
la Universidad de A Coruña

Enero 2007



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULDADE DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E
ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

Alejandro de la Sota, 1 15008 A Coruña
Teléfono 981 16 70 00 Fax 981 16 70 65

M^a Carmen Veiga Barbazán y **Christian Kennes**, Profesores Titulares del Departamento de Química Física e Enxeñería Química I de la Universidad de A Coruña,

Certifican Que el trabajo titulado **Eliminación biológica de compuestos monoaromáticos en presencia de metales pesados** ha sido realizado por la Licenciado en Ciencias Químicas Luis M. Amor Cambón en el Departamento de Química Física e Enxeñería Química I, Área de Enxeñería Química, y que, como Directores del mismo, autorizan su presentación para optar al grado de **Doctor en Química**.

Y para que así conste, expiden y firman la presente en A Coruña, a 4 de octubre de 2005.

María del Carmen Veiga Barbazán

Christian Kennes



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E
ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

Alejandro de la Sota, 1 15008 A Coruña
Teléfono 981 16 70 00 Fax 981 16 70 65

Manuel Esteban Sastre de Vicente, Director del Departamento de Química Física e Enxeñería Química I de la Universidad de A Coruña,

Certifica Que el Licenciado en Ciencias Químicas Luis M. Amor Cambón ha realizado en este departamento, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Veiga Barbazán y del Dr. Christian Kennes, el trabajo titulado **Eliminación biológica de compuestos monoaromáticos en presencia de metales pesados**, que presenta para optar al grado de **Doctor en Química**.

Y para que así conste, expide y firma la presente en A Coruña, a 4 de octubre de 2006.


Manuel Esteban Sastre de Vicente

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha sido el resultado del trabajo y esfuerzo de un equipo de personas sin cuyo apoyo y colaboración no habría sido posible. Ellos me han enseñado a dar y recibir, a compartir y a luchar por lo que uno cree.

A mi directora de tesis, Dra. M^a Carmen Veiga Barbazán, por su dirección, apoyo, consejos y enseñanzas, que me han permitido enfrentarme a todo con ilusión y optimismo. En la vida uno va conociendo a muchas personas que te enseñan a ver, interpretar, decidir y actuar, sin duda ha sido una de ellas. Asimismo agradecer a mi codirector de tesis Dr. Christian Kennes por su apoyo y dirección.

A los profesores del departamento por sus enseñanzas y apoyo: Dr. Rafael Blázquez, Dr. Manuel Soto, Dr. Alberto de Vega y Dra. Isabel Ruiz.

Al Dr. Pablo Ligero y a la Dra. Lourdes García por haber sido unos compañeros de primera. Su amistad y apoyo hicieron que viera la vida de otro color, gracias.

A Marga, Ana, Sara, Natalia, Marta, Chefiña, Pili, Marien, Jesús, Óscar, Ángela, Juan, Jorge, Juan Carlos y a todos los que han pasado por el laboratorio mientras desarrollaba este trabajo, sobre todo por su compañerismo y amistad.

A Bea, por su colaboración en distintas partes de esta tesis y por su estupenda amistad.

A Regina por su apoyo, comprensión y amistad.

Agradecerle a toda mi familia por su gran paciencia, cariño y por su ánimo constante. Especialmente a mis padres y abuela, por su apoyo incondicional y por su enorme cariño. Siempre pensé que era una persona afortunada y no me queda la menor duda. Es bonito aprender y disfrutar de cada instante de nuestro esfuerzo, pero aún lo es más saber que uno no se encuentra solo.

Muchísimas gracias a todos.

Índice

ÍNDICE

Resumen y objetivos	R-1
Summary and objectives	S-1
Capítulo 1. Introducción	1-1
1.1. Compuestos monoaromáticos	1-1
1.1.1. Fuentes de contaminación	1-1
1.1.2. Características de los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs).	1-1
1.1.2.1 Los BTEX (Benceno, tolueno, etilbenceno, tolueno y xileno). ...	1-1
1.1.2.2. Origen y fuentes en agua y aire.....	1-2
1.1.2.3. Toxicidad.	1-4
1.1.2.4. Metabolismo y biodegradación de los BTEX.....	1-7
1.1.2.5. Alternativas de tratamientos de los BTEX.....	1-9
1.1.3. Fenol.....	1-14
1.1.3.1 Características generales del fenol.	1-14
1.1.3.2. Degradación del fenol.....	1-16
1.2. Metales pesados.....	1-18
1.2.1. Características de los metales.....	1-19
1.3. Eliminación de carbono mediante un proceso aerobio.....	1-22
1.3.1. Conversión biológica de la materia orgánica.	1-22
1.3.2. Conversión heterótrofa aerobia de materia orgánica.	1-24
1.3.3. Coeficiente de rendimiento.	1-26
1.3.4. Microorganismos.	1-28
1.3.5. Efecto de los factores medioambientales.	1-28
1.4. Fundamentos de la nitrificación	1-32
1.4.1. Razones que justifican la eliminación de nitrógeno.....	1-32
1.4.2. Amonificación.....	1-33
1.4.3. Nitrificación biológica.	1-34
1.4.3.1. Microorganismos.....	1-34
1.4.3.2. Cinética de nitrificación.	1-36
1.4.3.3. Limitación de sustrato.	1-37
1.4.3.4. Inhibición por sustrato.....	1-38

1.4.3.5. Influencia de parámetros físico-químicos.....	1-39
1.5. Eliminación simultánea de carbono y nitrógeno.	1-43
1.6. Referencias.	1-46
Capítulo 2. Material y Métodos.....	2-1
2. Materiales y métodos	2-1
2.1. pH	2-1
2.2. Sólidos en suspensión totales y volátiles (SST y SSV).....	2-1
2.3. Oxígeno disuelto.....	2-1
2.4. Demanda Química de oxígeno (DQO).....	2-2
2.5 Determinación de nitrito y nitrato	2-2
2.6. Determinación de los BTEX.....	2-5
2.7. Nitrógeno amoniacal.....	2-6
2.8. Determinación del fenol	2-7
2.9. Determinación de metales	2-9
2.10. Ensayos en discontinuo	2-10
2.10.1. Ensayos de biodegradación aerobia de BTEX.....	2-10
2.10.2. Ensayos en medio aerobio con fenol.....	2-11
2.10.3. Ensayo aerobio en un reactor de lodos activos	2-13
2.10.3.1. Descripción del equipo	2-13
2.11. Referencias	2-15
Capítulo 3. Eliminación de alquilbencenos con cultivos mixtos y con cepas puras.	3-1
3.1. Introducción.....	3-1
3.2. Materiales y métodos.....	3-2
3.2.1. El cultivo microbiano y el medio	3-2
3.2.2. Inoculación y experimentos de biodegradación.....	3-3
3.2.3. Métodos analíticos	3-3
3.3. Resultados.....	3-4
3.3.1. Crecimiento y cinética de degradación con cultivos mixtos.....	3-4
3.3.2. Crecimiento y cinética de degradación con cultivos puros.....	3-5
3.3.3. Influencia del pH y de las vitaminas/minerales traza sobre el crecimiento y sobre las eficacias de degradación.....	3-8

3.4. Discusión	3-9
3.5. Conclusiones.....	3-11
3.6. Referencias	3-12
Capítulo 4. Cinética de inhibición en la biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos en presencia de metales pesados.	4-1
4.1. Introducción.....	4-1
4.2. Material y métodos	4-2
4.2.1. Crecimiento bacteriano y el medio	4-2
4.2.2. Métodos analíticos	4-3
4.3. Resultados y discusión	4-3
4.3.1. Efecto de los metales pesados sobre la biodegradación de los alquilbencenos	4-3
4.3.2. Modelo cinético de la degradación del tolueno, etilbenceno y <i>o</i> -xileno en presencia de metales pesados	4-8
4.4. Conclusiones.....	4-13
4.4.1. Biodegradación de los alquilbencenos	4-13
4.4.2. Modelo cinético de degradación	4-14
4.5. Referencias	4-14
Capítulo 5. Biodegradación del fenol y efecto sobre la nitrificación.....	5-1
5.1. Introducción.....	5-1
5.2. Materiales y métodos.....	5-2
5.2.1. Ensayos en discontinuo	5-2
5.2.2. Reactor de lodos activos a escala laboratorio	5-3
5.2.3. Métodos analíticos	5-4
5.3. Biodegradación del fenol en discontinuo	5-4
5.3.1. Degradación de fenol	5-5
5.3.2. Nitrificación	5-8
5.4. Biodegradación de fenol y nitrificación en un reactor de lodos activos.....	5-11
5.4.1. Biodegradación de fenol	5-15
5.4.2. Nitrificación en presencia de fenol	5-16
5.5. Conclusiones.....	5-18
5.5.1. Ensayos aerobios en discontinuo	5-18

5.5.2. Ensayos en el reactor de lodos activos.....	5-19
5.6. Referencias	5-19
Capítulo 6. Degradación del fenol en presencia de metales pesados y efecto sobre el proceso de nitrificación.....	6-1
6.1. Introducción.....	6-1
6.2. Material y métodos	6-1
6.2.1. Ensayos en discontinuo	6-1
6.2.2. Reactor de lodos activos.....	6-2
6.3. Resultados.....	6-2
6.3.1. Isotermas de adsorción	6-2
6.3.2. Efecto del cinc, cadmio, cromo y níquel sobre la biodegradación del fenol en discontinuo.....	6-10
6.3.3. Efecto de los metales sobre la nitrificación en discontinuo.....	6-14
6.3.4. Ensayos aerobios en un reactor de lodos activos en presencia de metales pesados (cadmio, cromo, cinc níquel)	6-22
6.3.5. Concentración metal soluble	6-28
6.3.6. Biodegradación del fenol en presencia de metales pesados	6-31
6.3.7. Proceso de nitrificación en presencia de metales pesados.....	6-34
6.3.8. Ensayos aerobios en un reactor de lodos activos en presencia de una mezcla de metales pesados.....	6-39
6.3.8.1. Biodegradación del fenol en presencia de la mezcla de metales pesados	6-41
6.3.8.2. Nitrificación en presencia de metales pesados	6-42
6.4. Conclusiones.....	6-43
6.4.1. Ensayos en discontinuo en presencia de metales pesados.....	6-43
6.4.2. Ensayos en un reactor de lodos activos en presencia de metales pesados	6-44
6.5. Referencias	6-44
Conclusiones.....	C-1

Resumen y Objetivos

RESUMEN Y OBJETIVOS

Las aguas residuales de las industrias productoras de resinas o industrias petroquímicas se caracterizan por poseer un elevado contenido en compuestos orgánicos y nitrogenados. El tratamiento biológico de estas aguas requiere un proceso combinado de eliminación de carbono y de nitrógeno. Con este trabajo se pretende estudiar la eliminación biológica de compuestos monoaromáticos, como son los alquilbencenos o fenoles, en presencia de metales pesados. Parte de este trabajo se ha realizado empleando cepas puras y otra parte con cultivos mixtos.

En el Capítulo 1 se realizó una revisión general de los conceptos fundamentales tratados en este trabajo, centrándose en los alquilbencenos, en el fenol y los metales pesados. Se inicia con una descripción de las principales características de estos compuestos monoaromáticos para continuar con una evaluación de los sistemas de tratamiento de dichos compuestos. Finalmente se hace una breve revisión sobre los principales fundamentos de eliminación de carbono y de los procesos de nitrificación.

En el Capítulo 2 (materiales y métodos) se realizó una descripción de los métodos analíticos utilizados durante el desarrollo del trabajo experimental para llevar a cabo la determinación de los distintos parámetros medidos.

En el Capítulo 3 se llevó a cabo el estudio del crecimiento y cinética de la degradación de alquilbencenos con cepas de microorganismos puros y mixtos. Para este estudio se emplearon tres tipos de especies, aisladas de un biofiltro, donde dos especies bacterianas, *Bacillus* y *Pseudomonas*, fueron las dominantes, mientras que la especie *Trichosporon*, especie también capaz de degradar a estos compuestos, crece con dificultad en presencia de éstos cuando son la única fuente de carbono presente en el medio. Los valores cinéticos y las velocidades de degradación fueron calculados y comparados para las diferentes cepas puras y mixtas. También se observó la influencia que el pH ejerce en la degradación de los diferentes microorganismos. La biodegradación y el crecimiento de las bacterias fue posible en un rango de 3,5 - 7,0 con velocidades apreciables de degradación.

En el Capítulo 4 el objetivo fue la evaluación de la influencia de la toxicidad e inhibición de los metales pesados como cadmio, níquel y cinc sobre la degradación de los alquilbencenos en presencia de las bacterias *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp., estudiadas en el Capítulo 3. Se ha empleado la ecuación de Andrews, con la cual se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo; para estudiar la cinética de degradación del tolueno, etilbenceno y *o*-xileno en presencia de los metales pesados (Cd, Ni y Zn) a varias concentraciones. La constante de inhibición de los metales pesados fue calculada para las diferentes combinaciones de éstos y de compuestos orgánicos volátiles.

En el Capítulo 5 el objetivo fue el estudio de la biodegradación del fenol mediante ensayos en discontinuo en condiciones aerobias, a concentraciones crecientes, y analizar la influencia que este ejerce sobre el proceso de nitrificación. Para ello se evaluó un rango de fenol comprendido entre 100 mg/L y 2500 mg/L, obteniéndose resultados de una total degradación, incluso a las concentraciones más altas estudiadas. Los resultados obtenidos de la degradación biológica del fenol se ajustaron a un modelo cinético de inhibición. Se comprobó que la nitrificación no tiene lugar hasta la total degradación del fenol. La segunda parte de este capítulo se dedicó al estudio en continuo en un reactor de lodos activos a escala de laboratorio. Se alimentaron concentraciones crecientes de fenol, estudiándose su eliminación y la influencia de estas concentraciones en el proceso de nitrificación. Se obtuvieron altos porcentajes tanto de eliminación de fenol como de nitrificación.

Con el Capítulo 6 se evaluó el análisis del tratamiento biológico aerobio, primeramente en ensayos en discontinuo y a continuación en un reactor de lodos activos de un agua residual sintética, cuya fuente de carbono empleada era el fenol y en cuyo medio se encontraban presentes otros contaminantes altamente tóxicos para los microorganismos, como son los metales pesados, cinc, cadmio, cromo y níquel. Se observó el comportamiento inhibitorio de los metales pesados sobre la degradación del fenol. Así mismo se estudió el efecto que ejercieron los metales sobre el proceso de nitrificación. Inicialmente se determinó la adsorción de los metales pesados en el medio a diferentes concentraciones. Posteriormente, se pasó a analizar la eliminación de diferentes cargas de fenol en presencia de metales pesados, comprobándose la total

degradación de este contaminante, y el efecto inhibitor producido en el proceso nitrificante.

Una vez realizado el estudio en discontinuo se pasó a la realización del estudio en un reactor de lodos activos. En este estudio se analizó la eliminación de distintas concentraciones de fenol en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados por separado y, a continuación manteniendo una misma concentración de fenol y variando la concentración de los metales pesados. En todos los casos estudiados se produjo una degradación del fenol, detectándose productos de degradación. Así mismo se estudió el efecto inhibitor de los metales sobre la actividad de las bacterias nitrificantes. Finalmente se analizó el sinergismo de los metales pesados, observándose el efecto inhibitor que ejercen sobre la degradación del fenol y el proceso de nitrificación.

Summary and Objectives

SUMMARY AND OBJECTIVES

Wastewaters in phenol and alkylbenzene producing industries contain a large number of organic and nitrogen compounds. Biological treatment of these wastewaters requires a combined process for carbon and nitrogen removal. The present work contributes to improve the knowledge on the treatment of wastewaters containing volatile organic compounds as alkylbenzenes or phenols, and studies their influence on the nitrification process.

In the present work, both pure cultures and mixed cultures are used. Chapters 3 and 4 present studies with alkylbenzenes while phenol is studied in Chapters 5 and 6.

Chapter 1 presents a general review of fundamental concepts is realized, specially on monoaromatic compounds present in wastewaters from resin producing industries and petrochemical industries. It starts with a description of their main characteristics and goes on with an evaluation of the different treatment systems for these compounds. Some information regarding the main characteristics of heavy metals is also given. Finally a short review of the main systems available to carry out nitrification processes and carbon removal is done.

Chapter 2 (materials and methods) describes the methodology employed to determine the different parameters measured during this work.

In Chapter 3, microbial growth on alkylbenzenes and biodegradation kinetics are studied with defined microbial consortia and with pure cultures. Two bacteria, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., were isolated on alkylbenzenes, as well as a *Trichosporon* strain which could, however, hardly grow on alkylbenzenes in pure culture. Kinetic parameters and biodegradation rates were calculated and compared for the different mixed and pure cultures. Experiments were also undertaken to study the influence of pH on the performance of the different cultures. Biodegradation and growth were possible, over the pH range 3.5 - 7.0 at appreciable rates, both with mixed cultures and with pure bacterial cultures.

In Chapter 4 the toxic and inhibitory effects of heavy metals such as cadmium, nickel and zinc on alkylbenzene removal are evaluated with the *Pseudomonas* sp and *Bacillus* sp. The kinetics of alkylbenzene (Toluene, Ethylbenzene and *o*-Xylene) biodegradation in presence of different concentrations of the heavy metals (Cd, Ni, Zn) were modelled using the Andrews equation which yielded a good fit between model and experimental data. The heavy metals inhibition constants were calculated for different combinations of volatile organic compounds and heavy metals. The present approach provides a method for evaluating and quantifying the inhibitory effect of heavy metals on the biodegradation of pollutants by specific microbial strains.

In Chapter 5 phenol biodegradation under aerobic conditions and its effect on the nitrification process are studied, first in batch assays and then in an activated sludge reactor. In batch assays, phenol was completely biodegraded at concentrations ranging from 100 to 2500 mg/L. Phenol was inhibitory to the nitrification process, showing more inhibition at higher initial phenol concentrations. The kinetics of phenol biodegradation at various concentrations is modeled using an inhibition kinetic model. Finally, phenol removal was studied in an activated sludge reactor. The applied organic loading rate was increased stepwise by gradually increasing the phenol concentration. High phenol removal efficiencies could be maintained at all the applied organic loading rates. Ammonium removal was also very high during the operation period.

In Chapter 6 batch assays as well as an activated sludge reactor were used for the aerobic biological treatment of synthetic wastewater containing phenol as the only carbon source and heavy metals as zinc, cadmium, chromium and nickel. The inhibitory effects of the heavy metals on the biodegradation of phenol were studied in batch. Likewise the heavy metals effect on the nitrification process was also studied. First the adsorption of heavy metals was studied in the medium at different concentrations. Later phenol removal at different concentrations and in presence of heavy metals was analyzed. Phenol was completely biodegraded and showed inhibition on the nitrification process.

Phenol biodegradation in an activated sludge reactor was studied at different heavy metals concentrations. In all cases phenol was completely biodegraded. Also the effect of heavy metals on the nitrification process was studied.

Capítulo 1. Introducción

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos Monoaromáticos

1.1.1. Fuentes de contaminación

Casi todo el mundo está expuesto a los contaminantes orgánicos volátiles (COVs), fenol y derivados, aunque el grado de contaminación difiere a lo largo de la exposición debido a que en algunas industrias los COVs y fenoles son los principales productos mientras que en otras son de menor importancia. El amplio uso de los COVs y fenoles es una consecuencia de sus propiedades, especialmente su disponibilidad para disolver un amplio número de compuestos orgánicos insolubles en agua y de compuestos inorgánicos. Como consecuencia de ello, millones de toneladas de estos contaminantes son producidas en el mundo.

Algunos de estos compuestos son de procedencia biogénica, pueden ser producidos por plantas, animales y por la degradación de la materia orgánica, pero la fuente mayoritaria de los COVs y fenoles en el medio ambiente se debe a la antropogénica. En los apartados que a continuación se exponen se hablarán de los contaminantes estudiados en el presente trabajo.

1.1.2. Características de los compuestos orgánicos volátiles

Al ser los COVs muy amplios y como poseen muchas aplicaciones, no es posible dar una relación de todos ellos de modo que se citarán los empleados en esta investigación: el benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros del xileno.

1.1.2.1. Los BTEX (Benceno, etilbenceno, tolueno y xileno)

Desde los orígenes de la Revolución Industrial en el siglo XIX la cantidad de sustancias contaminantes liberadas a los distintos compartimentos del medio ambiente ha ido aumentando vertiginosamente hasta nuestros días. La aparición de compuestos orgánicos en suelos, agua y aire es un problema de creciente preocupación e interés tanto para la industria como para el público en general debido a los posibles riesgos que

estos compuestos representan para la salud humana. Los problemas que ocasiona la liberación de éstos a la atmósfera se deben a que producen olores desagradables, aumentan la concentración de ozono en el aire y pueden además, en algunos casos, tóxicos y cancerígenos. Asimismo, con las lluvias pueden pasar de la atmósfera a la superficie terrestre.

Entre los compuestos orgánicos liberados al medio, los compuestos orgánicos volátiles representan un grupo de contaminantes con unas características físico-químicas específicas similares, como son la solubilidad en grasas y la baja reactividad. En Estados Unidos, los COV's se definen como "cualquier compuesto orgánico que contenga carbono y participe en reacciones fotoquímicas atmosféricas, excluyendo el monóxido de carbono, dióxido de carbono, ácido carbónico, carburos metálicos o carbonatos metálicos y carbonato de amonio".

Dentro de los compuestos volátiles, el benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno están clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA (Environmental Protection Agency). Los BTEX son utilizados a menudo como referencia en estudios medioambientales debido a su riesgo potencial para la salud y porque indican la existencia de contaminación por hidrocarburos.

Los BTEX se caracterizan por poseer una gran energía de resonancia que desemboca en una gran estabilidad termodinámica. Se trata de hidrocarburos orgánicos monoaromáticos de bajo peso molecular, poco solubles en agua. Debido a sus elevadas presiones de vapor (sobre todo para el benceno) pasan con facilidad a la fase gaseosa.

1.1.2.2. Origen y fuentes en agua y aire

Los BTEX se encuentran presentes en el petróleo de forma natural. Se emplean generalmente como disolventes en la preparación de pinturas, aceites, resinas, adhesivos, etc., y como intermedios químicos en la síntesis de diversos compuestos. El benceno y el tolueno se usan también como aditivos en la gasolina para incrementar el octanaje.

La aparición de estos compuestos en el medio ambiente puede ser explicada como resultado del aumento de la actividad antropogénica (industria, transportes, efluentes domésticos, actividades agrícolas) o por descarga directa del agua, aire o suelo. Sin embargo, en la mayoría de los casos se debe a sucesos accidentales como las pérdidas producidas en los tanques subterráneos de almacenamiento de productos derivados del petróleo, o vertidos ocurridos durante el transporte de dichos productos.

Las emisiones de BTEX al medio ambiente se acumulan principalmente en el aire debido a su naturaleza volátil, y en menor proporción en agua y suelo. Esta distribución está gobernada por los coeficientes de partición aire/agua y suelo/agua, que son unos parámetros imprescindibles para predecir el comportamiento de estas sustancias. Por ejemplo, para una concentración de 50 ppb de BTEX en aire, las concentraciones en equilibrio en agua podrían alcanzar niveles de 800-1000 ng/l, que supone aproximadamente el 0,5% de la concentración de contaminante.

Los niveles en agua provienen principalmente de derrames de gasolina y otros productos del petróleo y de su uso como disolventes. Los que son vertidos al agua superficial pasan rápidamente al aire por volatilización. Cuando se vierten al terreno, son adsorbidos por el suelo y migran con facilidad hacia el agua subterránea, donde permanecen estables durante largo tiempo.

Los niveles más altos de estos compuestos encontrados en agua subterránea y aire se muestran en la tabla 1.1 (Ware, 1988).

Tabla 1.1 Valores más altos de BTEX encontrados en agua subterránea y en aire urbano.

	Aguas subterráneas (µg/l)	Aire urbano (µg/l)
Benceno	80	$57 \cdot 10^{-3}$
Tolueno	1,4	10^{-3}
Etilbenceno	0,87	$0,6 \cdot 10^{-3}$
Xilenos	2,5	2

La persistencia de estos compuestos en agua varía de acuerdo con las condiciones medioambientales. Así, en aguas superficiales la vida media puede ser muy corta, debido a la volatilización, sin embargo en aguas subterráneas, donde no hay evaporación, la vida media es muy larga. En la tabla 1.2 (Ware, 1988) se indica el rango de valores de la vida media previstos para los BTEX en aire, agua superficial y agua subterránea, basados en la fotooxidación, biodegradación aerobia y biodegradación aerobia-anaerobia, respectivamente.

Tabla 1.2 Rango de valores de la vida media de los BTEX en días.

	Aire	Agua superficial	Agua subterránea
Benceno	2,1-20,9	5-16	10-730
Tolueno	0,4-4,3	4-22	7-28
Etilbenceno	0,4-3,6	3-10	6-228
<i>o</i>-xileno	0,2-1,8	7-28	14-365
<i>p</i>-xileno	0,2-1,7	7-28	14-56
<i>m</i>-xileno	0,1-1,1	7-28	14-56

1.1.2.3. Toxicidad

Debido a que los BTEX son compuestos neutros, solubles en lípidos y de bajo peso molecular, son absorbidos rápidamente por el organismo una vez inhalados o ingeridos. La mayor fuente de riesgo de exposición al benceno es por vía aérea. Cuando un ser humano respira un aire contaminado con alguno de estos compuestos, entre el 50-60 % de la dosis es absorbida por el organismo. Al ser muy solubles en lípidos tienden a acumularse en los tejidos grasos. Sobre la mitad del benceno inhalado es exhalado de nuevo en menos de 20 minutos. Dejando largos períodos de exposición, la proporción de reabsorción es inicialmente elevada y luego decrece. Dependiendo del individuo, la reabsorción es tan elevada como un 80 %. El benceno reabsorbido es depositado por la sangre en el sistema central y médula ósea (18 veces la concentración en sangre), en el tejido adiposo del peritoneo (10 veces la concentración en sangre) y en el cerebro (2,5 veces la concentración en sangre). El coeficiente de distribución entre el aire y la sangre es de 1:7. Aproximadamente un 80% es oxidado y eliminado después de 3 días pero

incluso después de 5-7 días pueden ser detectados todavía indicios de benceno por ejemplo, en la médula ósea, testículos y los músculos esqueléticos. La reabsorción de benceno es eliminada casi enteramente en la orina en forma de fenol, de hecho es usado en medicina ocupacional para la vigilancia sanitaria.

Un estudio sobre empleados en gasolineras mostró que con una cantidad media de entre 0,065 y 0,490 ppm de benceno en 8 horas de trabajo en ese ambiente (con un máximo de 30 minutos un valor de 4,462 ppm; el umbral límite técnico alemán para la media de 8 h/día está fijado en 8 ppm) fue posible encontrar entre 6 y 37 mg de benceno y sus metabolitos en 1 litro de orina, lo cual está en el orden de magnitud de personas no expuestas al benceno (Lehmann H., 1979). No había correlación entre concentraciones de benceno en la gasolina, en el aire de la gasolinera y la concentración de fenoles en la orina de los empleados (Lehmann H. 1979). En otro estudio con voluntarios la eliminación del benceno, el cual fue inhalado durante 5 días en concentraciones de 2-10 ppm, fue diferenciada entre la exhalación y excreción en forma de fenol. Las mujeres eliminan el benceno más lentamente que los hombres (Sato, 1975; Radojiac, 1975). También ratas y hombres con alto contenido graso eliminan el benceno más lentamente. En otro estudio con mujeres trabajadoras en la industria del caucho trabajando con gasolina, podría demostrarse que fracciones de hidrocarburos (los cuales no están diferenciados) se acumulan en el embrión y en la leche materna (Zabol Moskwa, 1979).

En el caso de la inhalación del tolueno, sobre un 20%-50% es exhalado y sobre un 50%-80% se reabsorbe (Bauer, 1979; Fodor, 1972). Un incremento en la concentración del aire a 200 ppm (0.75 mg/l) corresponde a un incremento en la concentración en sangre de unos 0.35 mg/100 ccm (Fodor, 1972). El tolueno es también principalmente absorbido por los órganos lipídicos tales como las glándulas suprarrenales, médula ósea, cerebro, hígado, sangre, etc. La mayoría del tolueno se convierte en ácido benzoico, el cual tras la conjugación con glicerina es excretado con la orina como ácido hipúrico (Bauer, 1979; Fodor, 1972). También desde que el cuerpo está en estado normal, variando la proporción de excreción de ácido hipúrico, es difícil sopesar la contribución del tolueno. El tolueno es excretado más rápidamente que el benceno, la eliminación total se alcanza después de unas 14 horas. La vida media biológica del tolueno es de

aproximadamente 7 ½ horas, y es rápidamente cambiado por otros solventes (Tokunaga, 1974).

Similarmente al tolueno, los xilenos suben por los pulmones, a través de la piel o de la boca y pasa a los tejidos ricos en lípidos. Son oxidados a ácido toluico y xilenoles, que son excretados con la orina en varias formas – posiblemente como conjugados- con algunas de las fracciones requiriendo algo más de tiempo que en el caso del tolueno (Fodor, 1972).

Además del riesgo de leucemia, la exposición a benceno es probable que también produzcan mutaciones (Albert, 1978). La magnitud del riesgo no se puede estimar porque también se ha observado una dudosa relación cuantitativa entre mutaciones hereditarias y aberraciones cromosómicas. El benceno fue hallado en el test de Ames para indicar efectos mutacionales por ser no-mutagénico. Sin embargo, podría ser posible que una activación metabólica humana del sistema enzimático fuera el causante de ser mutagénico. Ha sido comparada la genotoxicidad del benceno, tolueno, xilenos y fenoles (Dean, 1978). Los escasos informes de efectos reproductores, embrionicos y teratógenos del benceno son conflictivos y poco concluyentes, y por lo tanto no son útiles en la evaluación de posibles riesgos. La elevada exposición a proporciones de 1.000 ppm a 5.000 ppm puede causar deformación en células animales.

Los aromáticos moleculares inferiores afectan al sistema nervioso central y, probablemente, a pequeñas dosis engendran desórdenes inespecíficos, tales como: cansancio, irritabilidad ocular, náuseas, insomnio y disminución del poder de concentración y rendimiento individual. Diferentes investigadores han tratado de correlacionar objetivamente tales formas de agotamiento con la ayuda de la neurofisiología y otros métodos (Bokina, 1976). Por ejemplo, 1,5 mg benceno/m³ ya está en el subconsciente con respecto a su efecto sobre la actividad eléctrica del córtex cerebral. Estos valores umbral se aproximan a los valores umbral del olor. Por otra parte, ciertos niveles de benceno en callejones también son de esta clase.

Como ya se ha mencionado, la irritación ocular debida al benceno, diferente a otros aromáticos volátiles, sólo ocurre a concentraciones relativamente elevadas (medical

Biological Laboratory, The Netherlands, 1976). También se están realizando investigaciones sobre la patogénesis de lesiones cutáneas debido al benceno. Son muy importantes los efectos sinérgicos entre aromáticos volátiles y otros contaminantes. Se sabe, por ejemplo, que el fenobarbital, clorpromacina y 3-metilcolantreno, tolueno, hierro, monóxido de carbono, humo de cigarro, percloroetileno, selenio, vibración - ruido y dióxido de sulfuro como función de las condiciones climáticas influyen en el metabolismo y/o efectos del benceno.

1.1.2.4. Metabolismo y biodegradación de los BTEX

Los hidrocarburos aromáticos son metabolizados a la vez *in vitro* e *in vivo* a óxido de areno, que isomerizan a fenoles, son enzimáticamente hidratados a dihidrodioles, y conjugados con glucación (The Handbook of Environmental Chemistry, Ed. O. Hutzinger, volumen 3). Los dihidrodioles son posteriormente metabolizados a catecoles por deshidrogenación.

El paso inicial de la oxidación del benceno al epóxido es la reacción mediada por una complicada oxidación, en el NADPH/NADP-sistema de los microsomas. El citocromo P-450, NADPH-reductasa y fosfatida son factores importantes. El fenobarbital y el 3-metilcolantreno pueden incrementar la proporción de benceno en el metabolismo. El tolueno puede retardar el metabolismo del benceno en microsomas del hígado de ratón. Ya que el benceno también reduce la incorporación del hierro, esta reacción también puede ser una medida para la chimenea de benceno. El proceso de desintoxicación de reactivos altamente cancerígenos e hiriendo hígados el óxido de areno tiene dihidrofenoles y dehidrociclohexano como intermediarios. Recientemente, ha sido demostrado que los compuestos de epóxido aromático reactivo —el cual puede formar enlaces covalentes con ADN, ARN y/o proteínas— reacciona no enzimáticamente a fenoles o enzimáticamente junto con hidratasa epoxidasa o GSH-s epóxido transferido a compuestos dihidroxi o a conjugados monohidroxi glutatión. La activación adicional de enzimas es posible con un desarrollo progresivo en el desarrollo filogenético animal. Parece que también hay metabolitos reactivos, de los cuales uno sirve para daños reparables y el otro para enlace tóxico covalente irreparable. Es interesante tomar nota

sobre si la toxicidad del benceno en conejos acelera también la síntesis de ácidos nucleicos en la médula ósea.

El tolueno y los isómeros de los xilenos son metabolizados *in vivo* junto con fenoles y productos resultantes de una oxidación de cadena indirecta. Así, el tolueno primeramente es metabolizado por vía ácido benzoico, la formación intermedia da primero bencilalcohol y luego benzaldehído. Tanto el *o*-cresol como el *p*-cresol también son detectados como metabolitos secundarios *in vivo*. Los xilenos son metabolizados primeramente *in vivo* por oxidación de un grupo metil para producir ácido toluico. Se ha sugerido, que una pequeña cantidad de tolueno o xilenos también pueden ser hidroxilados en los núcleos benceno, cuando se administran a ratas albinas macho.

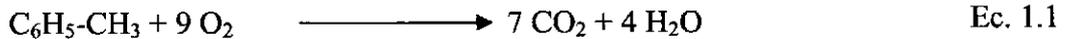
Los hidrocarburos tienen un origen pirolítico natural y han estado en contacto con microorganismos a lo largo de los periodos de evolución. De esta forma, no es de extrañar que numerosas bacterias hayan adquirido la habilidad de utilizarlos como sustrato.

La habilidad de las bacterias para utilizar hidrocarburos aromáticos para crecer, fue demostrada en 1908 por Stormer, quien aisló el *Bacillus hexacarbovorum* en virtud de su capacidad de crecer con tolueno y xileno aeróbicamente. En 1913 Söhngen escribió sobre la utilización de benceno por microorganismos, y un año más tarde Wagner aisló dos organismos, *Bacterium benzoli* a y b, capaces de crecer con benceno, tolueno y xileno.

La descontaminación biológica, el uso controlado de la biodegradación para eliminar compuestos químicos tóxicos de suelos, aguas subterráneas e incluso aire contaminado, es una técnica efectiva y eficiente para tratar lugares de contaminación compleja, en combinación con otras estrategias de tratamiento físicas y químicas.

Las rutas metabólicas que utilizan los microorganismos para degradar hidrocarburos pueden ser *aerobias* (utilizan oxígeno como fuente primaria de aceptores de electrones)

o *anaerobias* (utilizan una fuente alternativa de aceptores de electrones como nitratos o sulfatos). Aunque los hidrocarburos pueden ser degradados por ambas rutas, las aerobias son generalmente consideradas más rápidas y más eficientes porque requieren menos energía para iniciarse, y producen mayor energía de reacción (Cookson 1995). En la ecuación 1.1 se presenta la relación estequiométrica para la mineralización aerobia de un hidrocarburo representativo (tolueno).



En contraste, la siguiente ecuación 1.2 presenta la relación estequiométrica de la mineralización anaerobia del mismo hidrocarburo usando nitrato como aceptor de electrones (Reisinger 1995).



El proceso aerobio predomina en presencia de oxígeno, sin embargo, cuando se acaba el oxígeno en el sistema, domina el proceso anaerobio.

La degradación natural de residuos, tiene lugar en la mayoría de los medios naturales. Sin embargo, algunas veces el proceso es tan lento que no se puede considerar como un mecanismo efectivo de eliminación de contaminante.

1.1.2.5. Alternativas de tratamiento de los BTEX

Los métodos convencionales de tratamiento de aire, agua contaminados por estos contaminantes son físico-químicos, sin embargo, desde hace algunas décadas, el interés mostrado por los métodos biológicos ha ido aumentando de forma exponencial (Veiga y col., 1996). Los métodos físico-químicos se pueden utilizar para tratar amplias gamas de concentración y además la eficacia de la tecnología no se ve afectada por la toxicidad de los contaminantes. No obstante, aunque son

sensibles a la biotoxicidad del contaminante y sólo se pueden utilizar cuando este compuesto está presente en baja concentración en el gas a tratar, los métodos biológicos presentan grandes ventajas como, por ejemplo, su bajo coste y su capacidad de biodegradar y eliminar completamente la contaminación.

Tratamiento físico-químico.

Los métodos físico-químicos tradicionales utilizados en la eliminación de contaminantes son la adsorción, absorción, incineración térmica o catalítica.

Tratamiento biológico.

Desde hace algunas décadas se empezaron a desarrollar nuevas tecnologías basadas en la utilización de microorganismos capaces de convertir una serie de compuestos contaminantes en productos no polucionantes (Bioremediación). Los métodos biológicos son baratos y permiten degradar totalmente los contaminantes.

Según Sayler, el desarrollo de las tecnologías de tratamiento biológico está basado en la interrelación de varias disciplinas: biología molecular, ingeniería y ciencias ecológicas y medioambientales (Sayler y col., 1991).

Los microorganismos se caracterizan por su capacidad de transformar compuestos inorgánicos y orgánicos (sustratos) en otros compuestos con características distintas, conocidos como productos del metabolismo. Esta característica se aprovecha de forma controlada desde principios de este siglo en procesos de bioconversión (fermentación), por ejemplo, para la obtención de productos con un valor añadido superior al de los sustratos de partida o para obtener alimentos fermentados.

Más recientemente, se aprovecha esta capacidad de fermentación de los microorganismos en procesos de biodegradación para degradar la materia orgánica de efluentes líquidos contaminados y obtener así efluentes limpios. El desarrollo que

han experimentado los procesos biotecnológicos en algunos países, se puede medir por el aumento del número de compañías dedicadas a la descontaminación biológica (Devine 1995). Se espera que este crecimiento continúe hasta más allá del año 2000.

La mineralización completa de los contaminantes conduce, principalmente, a la formación de dióxido de carbono, metano o agua, según que el proceso sea aerobio o anaerobio. En estos casos se forman también nuevas células y pueden aparecer otros productos de degradación. Algunos microorganismos son además capaces de degradar compuestos altamente tóxicos o recalcitrantes (Kennes y col., 1994). El porcentaje de este tipo de compuestos que es posible eliminar mediante un tratamiento biológico (Kovalick, 1991).

Los mismos mecanismos de biodegradación que se utilizan para el tratamiento de aguas se pueden aprovechar para el tratamiento de gases contaminantes. El tratamiento biológico de gases es una tecnología que se utiliza de forma cuantitativamente significativa desde principios de los años 70, sobre todo para el tratamiento de olores y otros compuestos volátiles producidos en plantas de tratamiento de aguas y por industrias alimenticias.

Como suele ocurrir a menudo en el desarrollo de una nueva tecnología, algunos estudios aislados ya empezaron varias décadas antes (probablemente sobre los años 30). El país pionero en la materia es indudablemente Alemania. De ahí la tecnología se extendió bastante rápido a países vecinos y, poco después, a EEUU. En España, la tecnología está en fase de desarrollo y han sido muy pocos los trabajos publicados por grupos de investigación de nuestro país. El mayor desarrollo de la tecnología en países de centro Europa y en Estados Unidos es debido, entre otros, a la mayor contaminación atmosférica en esos países y a la legislación vigente.

Los primeros estudios y aplicaciones conocidas de los métodos biológicos atañen principalmente al tratamiento de aire contaminado por compuestos volátiles inorgánicos (CVI's) como son, entre otros, el H₂S, NO_x, SO₂, NH₃, etc. Más tarde la

tecnología se aplicó al tratamiento de compuestos orgánicos volátiles (COV's) alifáticos y aromáticos. Los aromáticos son en general más difíciles de degradar, sobre todo cuando se trata de compuestos xenobióticos o antropogénicos.

En general, el tratamiento biológico de contaminantes se puede aplicar, en principio, en cualquier caso en el cual los contaminantes son biodegradables y si esa biodegradación conduce a la formación de productos no tóxicos con una cinética apreciable. El tratamiento biológico presenta en ese caso la ventaja de degradar los contaminantes en compuestos no tóxicos. Es decir, a diferencia de lo que ocurre con métodos físicos o químicos más clásicos, se destruye el tóxico y simplemente no se transfiere el problema como sería el caso, por ejemplo, con los métodos de adsorción.

Otra ventaja de los métodos biológicos es que suelen ser más baratos y de fácil operación, aunque son aplicables a gamas más reducidas y más bajas de concentración que los métodos clásicos. Una combinación de métodos biológicos y físico-químicos podría ser interesante en algunos casos aunque en la práctica no se usan mucho.

El tratamiento biológico de gases contaminados es una tecnología que puede ser utilizada en un número amplio de industrias para tratar numerosos compuestos químicos volátiles. Existen tres categorías de reactores para el tratamiento de gases contaminantes: biofiltros, filtros percoladores y biolavadores.

Cometabolismo de los alquilbencenos.

La diversidad de la actividad microbiana hacia la degradación de los compuestos aromáticos, ha conducido en algunos casos a algunas observaciones aparentemente contradictorias en cuanto a la degradación de BTX en presencia de otras sustancias. Por ejemplo, la degradación de benceno por una población microbiana mixta presente en una charca de una refinería de petróleo, es inhibida por el fenol, que es

un sustrato más fácilmente degradable. En otro trabajo, la presencia de sustratos fácilmente degradables (como los aminoácidos) incrementa la biodegradación de fenoles monosustituídos. En un experimento dirigido a estudiar la degradación de benceno en presencia de otros compuestos aromáticos, se encontró que la degradación de benceno en cultivos mixtos se veía estimulada por la presencia de *o*-xileno o tolueno (Arvin y col., 1989). Sin embargo se produce un efecto contrario cuando están presentes tolueno y *o*-xileno a la vez.

Álvarez y Vogel (1991) estudiaron los problemas debidos a la interacción entre los diferentes componentes de la mezcla BTX durante su degradación bacteriana. Observaron que el *p*-xileno era degradado más lentamente en una mezcla de BTX en medio acuoso.

De la mezcla BTX, los isómeros del xileno pueden ser los más recalcitrantes (Kennes y col. 1996, Evans y col. 1991, Thomas y col. 1990). Aún así, se han encontrado cultivos puros capaces de crecer con *o*-xileno como única fuente de carbono.

La forma en que un compuesto BTX puede teóricamente estimular la degradación de otro compuesto BTX, es por inducción de los enzimas catabólicos requeridos en la degradación. Otra interacción de sustrato beneficiosa podría ser la de uno de los BTX (tolueno, por ejemplo) actuando como sustrato primario, estimulando el crecimiento microbiano, lo cual podría aumentar el cometabolismo de otro BTX (xileno, por ejemplo). Por otro lado, uno de los compuestos BTX también podría inhibir la degradación de otro por inhibición enzimática, disminución del número de compuestos aceptores de electrones, etc. (Álvarez y col. 1991).

Influencia del pH.

Los valores de pH recomendados para mantener unas condiciones de trabajo óptimas en biorreactores suelen ser alrededor de la neutralidad. Sin embargo, durante el funcionamiento de un biofiltro para el tratamiento de alquilbencenos (Kennes y col.,

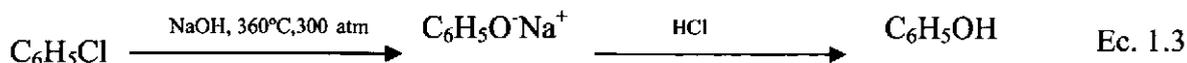
1996), se observó una disminución del pH desde 6 a 4,5, sin que se apreciara ningún efecto adverso. Más aún, se produjeron mejores capacidades de eliminación que en otros trabajos encontrados en la literatura para la eliminación de alquilbencenos.

1.1.3. Fenol

1.1.3.1. Características generales del fenol.

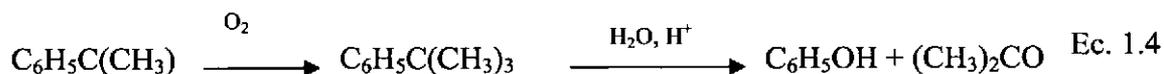
El fenol o también denominado hidroxibenceno (C_6H_6O), ácido carbólico o monohidroxibenceno se presenta en forma de cristales blancos o semitransparentes, es venenoso y corrosivo, de sabor ardiente y penetrante. Es tóxico por ingestión, inhalación y absorción cutánea. Es higroscópico, su punto de fusión es de $43^\circ C$ (Merck Index, 1996) y el punto de ebullición es elevado, $182,75^\circ C$, debido a la formación de puentes de hidrógeno, igualmente su solubilidad de 93 g en 1000 g de agua a $25^\circ C$ (Morrison y Boyd, 1990) está favorecida por la formación de puentes de hidrógeno con ella. El fenol presenta unas características diferentes a los alcoholes a pesar de contar con el grupo $-OH$, como puede ser la marcada acidez, con una constante K_a de $1,1 \cdot 10^{-10}$. Presenta un olor característico, dulce con un umbral de olor de 0,04 ppm.

El fenol se encuentra formando parte de la madera y en alquitrán de la hulla, sin embargo la cantidad más importante se obtiene sintéticamente. Antiguamente se producía por diversos procesos a partir del benceno. Uno de los procesos de síntesis empleados es la fusión de bencenosulfonato de sodio con álcali; otro proceso es el de Dow, en el que se hace reaccionar clorobenceno con hidróxido sódico acuoso a unos $360^\circ C$ teniendo lugar una sustitución nucleofílica:



Actualmente el fenol se fabrica mediante un proceso más moderno a partir del propileno formado en el craking del petróleo. El propileno se une al benceno en presencia del cloruro de aluminio como catalizador formándose cumeno, isopropilbenceno, que se

oxida con aire a hidroperóxido de cumeno, posteriormente éste se transforma en fenol y acetona por hidrólisis en medio ácido:



Además de su acidez, la propiedad más notable del fenol es la reactividad elevada de su anillo en la sustitución electrofílica. La acidez desempeña un papel importante, incluso en la sustitución anular, pues la ionización del fenol genera el grupo $-\text{O}^-$, que es más liberador de electrones que el grupo $-\text{OH}$. Entre las reacciones más características podemos encontrar la síntesis de Williamson de éteres por reacción del fenol con halogenuros de alquilo en disolución alcalina; la formación de ésteres por acción de ácidos, cloruros o anhídridos de ácido; y dentro de la sustitución electrofílica aromática tenemos reacciones de nitración, sulfonación, halogenación y alquilación de Friedel-Crafts.

El principal uso del fenol es para la producción de resinas fenólicas, entre las que destacan las resinas de fundición, de moldeo, adhesivas, laminados decorativos, fibra de vidrio y laminados industriales. Otros usos son la manufactura de caprolactama (nylon), bisfenol A (base, a su vez de las resinas epoxi y de los policarbonatos), así como la producción de colorantes, productos farmacéuticos, herbicidas, fungicidas, bactericidas, detergentes, antioxidantes, aditivos para aceites lubricantes y térmicos tensioactivos, etc.

Baeyer en 1872 observó la condensación del fenol con formaldehído en una masa resinosa (Babor e Ibarz, 1970) pero abandonó el estudio al no obtener una masa cristalina. Sería el belga Backeland quien desenvolvería el proceso en 1909. El aldehído fórmico condensa con el fenol reaccionando con sus hidrógenos reactivos (en posición orto y para) dando lugar, con exceso de fenol, las resinas nuevo lacas (solubles, termoplásticas y que no endurecen) y con exceso de formaldehído a varias fases de productos de condensación distinguibles por su solubilidad y fusibilidad: resoles (resinas iniciales, solubles y fusibles), resitoles (resinas intermedias en las que aparecen características tales como la insolubilidad en acetona) y resitas (resinas finales del proceso de condensación, duras, insolubles e infusibles y no plásticas). Las nuevas lacas

están formadas por una cadena lineal de radicales fenólicos, entre 10-12 moléculas de fenol como máximo, unidos por grupos metilénicos. Los resoles tienen una estructura lineal siendo derivados hidroximetilados de las nuevas lacas.

La EPA clasifica al fenol en el grupo D, enmarcado como no causante de cáncer. Sin embargo es un producto tóxico cuya inhalación o exposición dérmica es altamente irritante para la piel, ojos y mucosas. La ingestión de 1 g puede ser letal para los humanos con síntomas que incluyen la debilidad muscular, temblores, pérdida de coordinación, parálisis, convulsiones, coma y parada respiratoria. La exposición continua a este tóxico, estudios efectuados sobre animales mostraron daños a nivel del hígado, riñón y de los sistemas respiratorio, cardiovascular y del nervioso central.

1.1.3.2. Degradación del fenol.

El fenol es uno de los productos que pueden definir el nivel industrial de un país, pues está íntimamente relacionado con sectores básicos como la construcción y la automoción. Los compuestos fenólicos aparecen en efluentes acuosos de plantas de fabricación de resinas, de refinado de petróleo, de fabricación de plásticos, pesticidas, plantas de coque, etc. Antes de ser vertidos a un medio acuático estos efluentes deben ser tratados cuidadosamente y no exceder la concentración de 0,5-1 mg/L para efluentes industriales y de 0,5 mg/L para agua de abastecimiento, de acuerdo con la actual legislación española (BOE 14-9-90).

La dificultad del tratamiento del fenol es que puede inhibir el crecimiento microbiano a concentraciones relativamente bajas, de ahí que la eliminación del fenol de los efluentes acuosos industriales sea un problema práctico muy importante. Existen diferentes métodos para degradar o diluir el fenol como la oxidación química, la coagulación, la flotación, la precipitación y la adsorción. El uso de diferentes adsorbentes como el carbón activo fue investigado llegándose a resultados poco esperanzadores. El uso del carbón activo como adsorbente no está muy recomendado para el tratamiento de las aguas residuales debido al alto coste de regeneración del material que ni siquiera puede compensarse con la recuperación del fenol adsorbido. Generalmente estos efluentes son tratados mediante un proceso de lodos activos porque muchas bacterias heterótrofas aerobias y hongos son quienes emplean el fenol como fuente de carbono y energía.

En la biodegradación aerobia del fenol, éste primero es oxidado a catecol que posteriormente es oxidado siguiendo el camino metabólico bien a través del derivado orto- o meta- (Wang y Loh, 1999; Kibret y col., 2000). En la vía a través del derivado orto- la encima pirocatecasa, catecol 1,2-diosixenasa, cataliza la abertura del anillo aromático del catecol para formar cis, cis- ácido mucónico por la inserción de dos átomos de oxígeno molecular. En la vía metabólica del derivado meta-, la metapirocatecasa, catecol 2,3-dioxigenasa, cataliza la conversión del catecol a ácido 2-hidroximucónico semialdehído (2-HMAS) que es el responsable del cambio de color en el medio (de incoloro a amarillo-verdoso) durante la degradación del fenol.

Se ha estudiado la degradación de fenol en continuo. Duff y col. (1995) trataron un agua residual sintética que tenía bajas concentraciones de fenol y clorofenoles con un reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) al cual se adaptó rápidamente. Nakhla y col. (1995), estudiaron la degradación de fenol en cuatro reactores SBR (Sequencing Batch Reactor) con concentración de 100 a 800 mg C₆H₆OH/L, observando que el fenol puede degradarse con una eficacia del 99,5 % con un TRH de 1.1 días y con una carga orgánica de 0,12 a 0,4 mg C₆H₆OH/mg SSV/d.

Annadurai y col. (1999 y 2000), realizaron experimentos en discontinuo de la biodegradación del fenol empleando distintos cultivos puros de bacterias. Usaron el método Box-Benkhen en el diseño de estos experimentos buscando para cada bacteria las condiciones óptimas en las que se da el máximo crecimiento de éstas y la máxima degradación de fenol, para el cual siguieron el método estadístico de análisis de varianza (ANOVA). Para las *Pseudomonas putida* estudiaron el efecto de la concentración de la maltosa, fosfato, pH y temperatura, encontrando que el pH óptimo se encuentra a 7,9 y la temperatura a 31,5°C. Para *Pseudomonas pictorum* inmovilizadas en carbón activo estudiaron el efecto de la concentración de carbón activo, del pH y de la concentración del fenol. Tras 48 horas se encontró un máximo porcentaje de degradación partiendo de 229 mg C₆H₆OH/L a pH 7,6 y a una concentración de carbón activo de 1,12 g/L.

Nakamura y Swada (2000) observaron que es posible la biodegradación de fenol en presencia de otros tóxicos, como son los metales pesados, proponiendo un modelo matemático para describir el crecimiento microbiano.

El fenol raramente se encuentra sólo en los efluentes, Ha y Vinitnantharat (2000) estudiaron la eliminación competitiva del fenol y del 2,4-diclorofenol encontrando mayores cotas de degradación para el fenol, tanto estando sólo como en mezclas con otros compuestos.

1.2. Metales Pesados

El término de metal pesado ha sido muy utilizado diversamente para referirse a los elementos de la parte central de la tabla periódica con el valor del peso atómico superior a 100, o cuya densidad relativa sea mayor de cinco. Los metales son esenciales para la vida y son usados como micronutrientes por los humanos, plantas y microorganismos, pero cuando la concentración de los micronutrientes en el medio no supera la cantidad requerida por los organismos vivos, pasa a ser tóxica, considerándose contaminante.

La toxicidad y el destino final de los metales se encuentran gobernados por su química y por su especiación. Estos pueden aparecer en el medio acuoso como especies iónicas hidratadas, formando una amplia variedad de complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos que incluyen interacciones electrostáticas y/o covalentes, o asociados a coloides y materia particulada en suspensión. La química del elemento metálico está relacionada con su posición en la tabla periódica y su posibilidad de actuar como un ácido de Lewis reaccionando con bases que neutralizan su carga.

Los efectos tóxicos de los metales sobre las personas vienen de hace miles de años antes de la generalización de su uso. Durante el transcurso de la historia de la humanidad se han registrado varios casos accidentales de metales provocando en muchos casos un envenenamiento masivo en algunas poblaciones, como ha sido la de Japón en los años 50-60, en la que descargas de metil mercurio en los ríos llegaron mediante la bioacumulación a la cadena alimentaria provocando la muerte de varios miles de personas. También se han registrado intoxicaciones en ciertas poblaciones por causa de accidentes industriales con metales como el Cd, Cr, Zn, Fe y As.

La causa principal de contaminación en el medio ambiente se debe a las actividades humanas. El proceso de utilización de los metales pesados abarca desde la extracción en las minas de los yacimientos, la fundición y el refinado para obtenerlos. Industrias

como las de galvanización emplean sales de Zn, Cr y Ni en forma de cianuros complejos vertiéndose a las aguas cantidades de estos compuestos en las operaciones de aclarados y en los desagües. El Cd es un metal pesado encontrándose asociado a los minerales de Zn, Pb y Cu y es emitido al medio ambiente cuando dichos metales son procesados.

Muchos compuestos inorgánicos metálicos y también los organometálicos se han incluido en las listas de sustancias tóxicas y/o peligrosas cuyo vertido hay que controlar, reducir o eliminar. Son especialmente peligrosos los compuestos siguientes: compuestos organoestánnicos, el mercurio y sus compuestos, el cadmio y sus compuestos. Son sustancias menos tóxicas los siguientes metales junto a sus compuestos: Zn, Cu, Ni, Pb, Se, As, Sb, Sn, Ba, Co, Cr, Ur, V, Tl, Te, Ti, Mo, Be, B, y Ag (Cotoruelo y Marqués, 2000).

1.2.1. Características de los metales

Cinc

Este metal es importante para poder llevar a cabo los procesos biológicos. Se trata del segundo metal más abundante en el cuerpo humano por detrás del hierro. El cuerpo humano de un adulto contiene de 2-3 g de Zn en unas doscientas enzimas y proteínas. El principal papel del cinc como Zn^{+2} es actuar como ácido de Lewis, facilitando procesos hidrolíticos. Es encontrado en muchas deshidrogenasas dependientes del NADP y del NAD, enzimas que promueven la transferencia de iones hidruro desde moléculas del substrato al de las coenzimas NAD^+ y $NADP^+$, por ejemplo la enzima alcohol deshidrogenasa del hígado. El Zn^{+2} también es un componente esencial de las polimerasas del ARN y del ADN, y está presente en la anhidrasa carbónica y en la carboxipeptidasa. La hormona insulina se almacena en forma de complejo de cinc (Lehninger, 1984).

En disoluciones acuosas que contienen alguna especie con CO_2 puede formar un complejo soluble de $ZnCO_3$, o precipitar los carbonatos, $ZnCO_{3(s)}$ y $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2(s)$ que son menos solubles que los hidróxidos $Zn(OH)_{2(s)}$ y $ZnO_{2(s)}$. El cinc también puede

formar un complejo aminado $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_6]^{+2}$, e igualmente reacciona con el fenol por el oxígeno del mismo.

Cadmio

El cadmio es el metal traza típico a escala planetaria, se encuentra asociado a minerales de cinc siendo el más corriente la greenockita (sulfuro doble de cinc y de cadmio). Es muy empleado en la fabricación de pilas botón, su uso en los últimos años está en claro descenso.

Forma numerosos complejos con aniones, como por ejemplo con haluros, nitratos, sulfatos, tiosulfatos, amonio y cianuros, generalmente no muy estables. Una gran variedad de sales y sobre todo básicas de este metal son bastante solubles en agua. Los haluros son fácilmente solubles, pero sus disoluciones contienen una amplia gama de halo-complejos. El acuo-ión $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6]$ es bastante ácido, y las disoluciones diluidas de las sales de cadmio contienen la mayor parte del metal en forma de $[\text{CdOH}]^+$ solvatado o de polímeros solvatados; en disoluciones concentradas está presente la especie $[\text{Cd}_2\text{OH}]^{+3}$. Con amoníaco forma el complejo $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$.

El ión cadmio es capaz de reemplazar al cinc de las metaloencimas interfiriendo en sus actividades, este se convierte en un peligroso veneno. En el cuerpo humano el destino final es el hígado, los riñones y el sistema óseo (donde es intercambiado por el calcio). La enfermedad más conocida es la denominada Itai-Itai.

Níquel

Se encuentra normalmente formando arseniatos y sulfuros. Se emplea en procesos de fusión para fabricar diversas aleaciones metálicas, como catalizador para la preparación de compuestos orgánicos y también aparece en algún pesticida.

Las sales de níquel hidratadas acostumbran tener el ión $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+2}$, y son solubles en agua, a excepción de los ferri- y ferrocianuros, los sulfuros y el dimetilglioxamato.

Fisiológicamente este metal no es muy tóxico pero alguna de sus sales puede tener efectos potencialmente carcinogénicos y mutágenos por exposición pulmonar. Además la ingestión de importantes cantidades de este metal puede provocar problemas renales y alergias cutáneas por contacto.

Cromo

Es un elemento metálico de color gris, que puede presentar un intenso brillo. Es uno de los elementos de transición del sistema periódico.

Este elemento fue descubierto en 1797 por el químico francés Louis Nicolas Vauquelin, que lo denominó cromo (del griego *chroma*, 'color') debido a los múltiples colores de sus compuestos.

El cromo es un elemento común y ocupa el lugar 21 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. El cromo puede reemplazar en parte al aluminio o al hierro en muchos minerales a los que da sus exclusivos colores. Muchas de las gemas preciosas deben su color a la presencia de compuestos de cromo. Los minerales aptos para su posterior manipulación son poco comunes; la cromita (FeCr_2O_4) es el más importante.

En las sales crómicas y en la cromita, el cromo tiene una valencia de +3. La mayoría de estos compuestos son de color verde, pero algunos son de color rojo o azul. El óxido de cromo (III) (Cr_2O_3) es un sólido verde. En cromatos y dicromatos, el cromo tiene una valencia de +6. El dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) es un sólido rojo, soluble en agua; el cromato de plomo (PbCrO_4) es un sólido insoluble, muy usado como pigmento, llamado amarillo de cromo. El verde cromo es una mezcla de amarillo de cromo y azul prusia.

Más de la mitad de la producción total de cromo se destina a productos metálicos, y una tercera parte es empleada en refractantes. El cromo está presente en diversos

catalizadores importantes. Principalmente se utiliza en la creación de aleaciones de hierro, níquel o cobalto. Al añadir el cromo se consigue aumentar la dureza y la resistencia a la corrosión de la aleación. En los aceros inoxidable, constituye el 10% de la composición final. Debido a su dureza, la aleación de cromo, cobalto y wolframio se emplea para herramientas de corte rápido de metales. Al depositarse electrolíticamente, el cromo proporciona un acabado brillante y resistente a la corrosión. Debido a ello se emplea a gran escala en el acabado de vehículos. El amplio uso de la cromita como refractante se debe a su alto punto de fusión, su moderada dilatación térmica y la estabilidad de su estructura cristalina.

1.3. Eliminación de carbono mediante un proceso aerobio

1.3.1. Conversión biológica de la materia orgánica

Los procesos biológicos, relacionados con la conversión de la materia orgánica presente en el agua residual, son: hidrólisis, crecimiento de microorganismos y muerte de microorganismos. Además, habría que incluir procesos físicos como la adsorción, floculación biológica que en mayor o menor medida pueden afectar a la eliminación de materia orgánica.

Hidrólisis.

Los procesos de hidrólisis transforman las moléculas orgánicas de mayor peso molecular en moléculas de menor peso molecular que sirven como sustrato a los microorganismos. Los procesos de hidrólisis transcurren a menor velocidad que los procesos de crecimiento de microorganismos. En consecuencia, en la mayor parte de los procesos de tratamiento biológico, constituyen la etapa limitante. Los procesos de hidrólisis son menos conocidos que los procesos de crecimiento y en términos cinéticos se describen mediante reacciones de orden uno respecto a la concentración de materia orgánica hidrolizable, bien se trate de sólidos suspendidos (X_s) o sólidos disueltos (S_s):

$$R_{V,X_s} = K_h \cdot X_s \quad \text{Ec. 1.5}$$

$$R_{v,s} = K_h \cdot S_s \quad \text{Ec. 1.6}$$

Otros modelos cinéticos se basan en expresiones de tipo Monod (Henze y col., 1995)

$$R_{v,xs} = K_{hx} \cdot \frac{X/X_s}{K_x + (X/X_s)} \cdot X \quad \text{Ec. 1.7}$$

donde K_{hx} es la constante de hidrólisis

K_x es la constante de saturación para hidrólisis

X es la concentración de biomasa

Las constantes de hidrólisis son superiores con oxígeno, como aceptor final de electrones, que con nitrato y similares a las de los procesos anaerobios. Los valores de las constantes para la hidrólisis de sólidos suspendidos son inferiores a las de los sólidos disueltos (Tabla 1.3)

Tabla 1.3. Constantes de hidrólisis para la materia orgánica para distintos aceptores finales de electrones

Aceptor final de electrones	K_h (X_s) d^{-1}	$K_h(S_s)$ d^{-1}	K_{hx} $KgDQO(X_s)Kg^{-1}$ $^1DQO(B)d^{-1}$	K_x $KgDQO(X_s)Kg^{-1}$ $^1DQO(X)$
O_2	3-20	0,6-1,4	0,6-1,4	0,02-0,05
NO_3^-	1-15	0,15-0,4	0,15-0,4	0,02-0,05
Sin O_2 ni NO_3^-	2-20	0,3-0,7	0,3-0,7	0,02-0,05

Crecimiento

Los microorganismos presentes en los procesos de tratamiento utilizan un reducido número de moléculas simples para el crecimiento (acético, metanol, glucosa, amonio, etc.). Habitualmente se utiliza la expresión de Monod para describir la velocidad de consumo de sustrato empleado en el crecimiento de los microorganismos.

Muerte celular

Los microorganismos vivos tienen una determinada velocidad de muerte en función de la duración de su ciclo vital. La muerte de microorganismos no cambia el contenido en materia orgánica total del sistema pero sí afecta a su naturaleza incrementando la cantidad de materia orgánica biodegradable. El proceso se describe adecuadamente mediante una cinética de orden uno respecto a la concentración de biomasa X (1.8):

$$R_{v,x} = b \cdot X \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde: b es la constante de muerte celular y $R_{v,x}$ es la velocidad de muerte celular

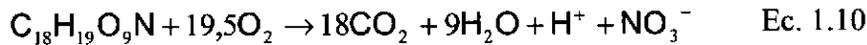
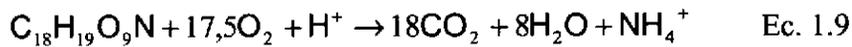
1.3.2. Conversión heterótrofa aerobia de materia orgánica

Reacciones

La materia orgánica alimentada a un proceso de tratamiento biológico aerobio puede experimentar alguno de los siguientes procesos:

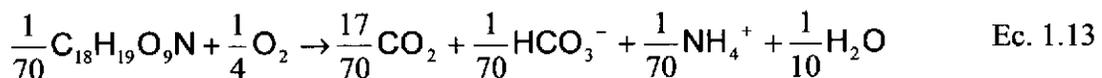
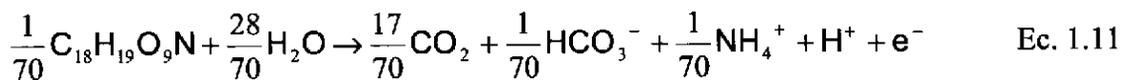
- Oxidación hasta CO_2 y nutrientes en forma de compuestos de N, P y S
- Asimilación en la síntesis de nuevos microorganismos
- No experimentar cambios indicando que esta materia orgánica no es biodegradable (materia inerte)
- Transformación en otras sustancias orgánicas

Desde el punto de vista práctico sólo interesa la cantidad total de materia orgánica presente estimada normalmente como DQO o DBO_5 . Sólo en casos concretos, como en aguas residuales que contengan compuestos tóxicos, se analizan individualmente estos compuestos. Asumiendo que la materia orgánica tiene la siguiente composición química general, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}$ (Pöpel, 1988) y que es oxidada hasta CO_2 , se puede plantear las siguientes expresiones (1.9 y 1.10) considerando o no la nitrificación, respectivamente.



Para las reacciones 1.9 y 1.10 el consumo de oxígeno resulta ser de 1,42 y 1,59 kg O₂ Kg⁻¹ de materia orgánica, respectivamente. Si se expresa en DQO el valor es idéntico en ambos casos (1,42 Kg O₂ Kg⁻¹ de materia orgánica) ya que el amonio no se oxida en las condiciones del análisis de la DQO.

El rendimiento energético resultante de la oxidación de la materia orgánica combinando las reacciones (1.11) y (1.12) para obtener la expresión (1.13).



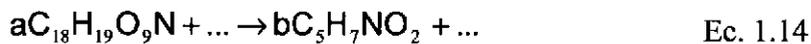
La materia orgánica presente en las aguas residuales se encuentra principalmente en forma de carbonohidratos, grasas y proteínas que en cuanto a peso presentan distintas proporciones de carbono y nitrógeno por lo que el consumo de oxígeno varía significativamente de una sustancia a otra como puede observarse en la Tabla 1.4. Las variaciones afectan principalmente al consumo de oxígeno para su oxidación y en el contenido de nitrógeno.

Tabla 1.4. Composición promedio de la materia orgánica contenida en el agua residual

Sustancia	Fórmula	Consumo de O ₂ (Kg O ₂ Kg ⁻¹ sustancia)	N/C (% en peso)
Carbohidrato	C ₁₀ H ₁₈ O ₉	1,13	0
Aceites y grasas	C ₈ H ₁₆ O ₂	2,03	0
Proteínas	C ₁₄ H ₁₂ O ₇ N ₂	1,20	16,6
Composición promedio	C ₁₈ H ₁₉ O ₉ N	1,42	6,50

1.3.3. Coeficiente de rendimiento

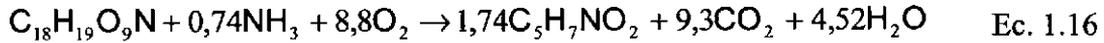
No es posible transformar totalmente la materia orgánica contenida en el agua residual en nuevos microorganismos (crecimiento) ya que una fracción se destina a la obtención de energía (catabolismo). Además, la eficacia en el aprovechamiento de la energía liberada por parte de los microorganismos se estima entre el 55 y el 60%. En términos de energía, la constante de rendimiento máximo (Y_{max}) se sitúa entre 0,55 y 0,6. En un proceso biológico el valor de la constante de rendimiento observada (Y_{obs}) oscila entre valores negativos (muerte celular) e Y_{max} , dependiendo del diseño del proceso y de la cantidad de materia orgánica disponible (carga orgánica). El valor de Y_{obs} puede ser mayor que Y_{max} en procesos donde exista acumulación de materia orgánica. Si se conoce el valor de la constante de rendimiento se puede plantear la reacción de transformación de la materia orgánica en biomasa (C₅H₇NO₂) según la reacción (1.14) pudiendo calcular el coeficiente de rendimiento observado a partir de los valores de los coeficientes estequiométricos (1.15)



$$Y_{obs} = \frac{b \cdot PM_{biomasa}}{a \cdot PM_{m.org.}} \quad \text{Ec. 1.15}$$

Siendo PM el peso molecular

Si se admite un valor de Y_{obs} de 0,5 Kg biomasa Kg^{-1} materia orgánica obtendríamos un valor de “b” de 1,74 para un valor de “a” igual a 1. Así en ese caso la ecuación 1.14 queda ajustada introduciendo el oxígeno necesario y la fuente de nitrógeno (1.16).



Las constantes de rendimiento se expresan habitualmente en términos de DQO; así en nuestro caso el valor de la DQO para la materia y la biomasa es el mismo (1,42 Kg O_2 Kg^{-1} materia orgánica o biomasa) con lo que $Y_{obs}=0,5$ Kg DQO(X) Kg^{-1} DQO (S); donde (X) hace referencia a la biomasa y (S) al sustrato.

Cinética

La conversión del sustrato puede describirse mediante una reacción de primer orden respecto a la concentración de biomasa según la expresión (1.17)

$$R_{v,s} = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{obs}}{Y_{max}} - b \quad \text{Ec. 1.17}$$

Donde $R_{v,s}$ es la velocidad de eliminación de sustrato por unidad de volumen

μ_{obs} es la velocidad de crecimiento observada

X es la concentración de biomasa

Y_{max} es la constante de rendimiento máximo

b es la constante de muerte celular

El valor de la velocidad de crecimiento observada está influido por: la concentración de sustrato (S), la concentración de oxígeno (S_{O_2}), el pH, la temperatura (T), etc. La dependencia del crecimiento con el sustrato se describe habitualmente haciendo uso de la expresión empírica de Monod (1.18) que en muchas situaciones puede aproximarse a un modelo cinético de orden cero (1.19) o de orden uno (1.20)

$$r_{obs} = r_{max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad \text{Ec. 1.18}$$

Donde μ_{obs} es la velocidad de crecimiento observado

μ_{max} es la velocidad de crecimiento máxima

S es la concentración de sustrato en el reactor

K_s es la constante de saturación para el sustrato

Modificaciones de la expresión cinética de Monod

$S \gg K_s$ $\mu_{obs} = \mu_{max}$ cinética de orden cero Ec. 1.19

$S \ll K_s$ $\mu_{obs} = \mu_{max} \cdot S/K_s$ cinética de orden 1 Ec. 1.20

1.3.4. Microorganismos

La composición de microorganismos heterótrofos varía ampliamente entre plantas de tratamiento debido a la diferencia en la composición de las aguas residuales y al diseño y operación de las mismas. Sin embargo, la experiencia demuestra como las velocidades de consumo de materia orgánica son similares a pesar de las diferencias en la composición de la biomasa. La composición de ésta puede tomarse de los valores de la Tabla 1.5 dada por Henze y col. (1995).

Tabla 1.5 Composición típica de la biomasa heterótrofa en proceso aerobio de fangos activos.

Género	Abundancia relativa (%)
<i>Comamonas-pseudomonas</i>	50
<i>Flavobacterium</i>	14
<i>Paracoccus</i>	12
<i>Alcaligenes</i>	6
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	2
<i>Aeromonas</i>	2
<i>Micrococcus</i>	2

1.3.5. Efecto de los factores medioambientales

Temperatura

La dependencia con la temperatura para un proceso biológico puede expresarse como una función exponencial (1.21)

$$\mu_{max}(T) = \mu_{max}(20^\circ\text{C}) \cdot \exp(K(T-20)) \quad \text{Ec. 1.21}$$

Para los procesos aerobios la expresión es válida entre 0 y 32 °C. Para temperaturas entre 32 y 40 °C la velocidad permanece constante y, a partir de 40 °C, desciende drásticamente hasta hacerse cero para temperaturas en torno a 45 °C. El proceso aerobio en rango termófilo (50 °C-60 °C) es posible obteniéndose velocidades aproximadamente un 50% mayores respecto a las obtenidas a 35°C.

Oxígeno

La dependencia de la velocidad con la concentración de oxígeno puede escribirse mediante una expresión tipo Monod (1.22)

$$r_{\text{obs}} = r_{\text{max}} \cdot \frac{S_{\text{O}_2}}{S_{\text{O}_2} + K_{S_{\text{O}_2}}} \quad \text{Ec. 1.22}$$

donde S_{O_2} es la concentración de oxígeno en el reactor

$K_{S_{\text{O}_2}}$ es la constante de saturación para el oxígeno

Combinando la ecuación anterior con la ecuación (1.18) obtendremos la siguiente expresión doble de Monod para el sustrato orgánico y el oxígeno:

$$r_{\text{obs}} = r_{\text{max}} \cdot \frac{S}{S + K_s} \cdot \frac{S_{\text{O}_2}}{S_{\text{O}_2} + K_{S_{\text{O}_2}}} \quad \text{Ec. 1.23}$$

El valor de la constante de saturación para el oxígeno ($K_{S_{\text{O}_2}}$) depende del tamaño del flóculo, del espesor de la biopelícula y de la temperatura. Este parámetro refleja las limitaciones a la difusión del oxígeno dentro de los flóculos o en las biopelículas.

pH

Los procesos biológicos dependen fuertemente del pH. La velocidad de crecimiento es máxima a un determinado valor de pH (pH óptimo) que depende del tipo de especies que intervienen y del proceso que tenga lugar. La dependencia de la velocidad máxima con el pH puede expresarse según la ecuación 1.24 (Henze y col., 1995):

$$r_{\max}(pH) = r_{\max}(pH_{\text{óptimo}}) \cdot \frac{K_{pH}}{K_{pH} + I} \quad \text{Ec. 1.24}$$

Donde K_{pH} es la constante de pH
 $I = 10^{(pH_{\text{óptimo}} - pH) - 1}$

En los procesos biológicos aerobios normalmente son valores bajos de pH los que provocan problemas, debiendo prestar atención al pH del agua residual. Además, determinados procesos biológicos pueden provocar descensos del pH como es el caso de la nitrificación, o incrementos en el pH como es el caso de la desnitrificación.

Sustancias tóxicas

Muchas sustancias como son los metales pesados, cianuro, compuestos organoclorados, compuestos volátiles aromáticos, etc., pueden actuar como tóxicos en la conversión aerobia de la materia orgánica. A la hora de evaluar el efecto tóxico de una sustancia hay que considerar no solo la concentración del agente tóxico sino, además, la posible aclimatización de la biomasa al compuesto tóxico. Los mecanismos de la inhibición pueden ser competitivos y no competitivos, también pueden ser reversibles o irreversibles. Las sustancias tóxicas actúan normalmente a nivel de membrana (impidiendo el transporte activo de substratos y/o productos con el medio), o actuando sobre las enzimas que intervienen en las reacciones metabólicas.

La inhibición reversible competitiva afecta a la cinética de crecimiento aumentando el valor de la constante de saturación de acuerdo con la expresión 1.25.

$$K'_S = K_S \cdot \frac{K_{SI} + C_I}{K_{SI}} \quad \text{Ec.1.25}$$

Donde K'_S es la constante de saturación con inhibición

K_S es la constante de saturación sin inhibición

K_{SI} es la constante de inhibición

C_I es la concentración del inhibidor

La inhibición no competitiva reversible disminuye la velocidad máxima de crecimiento y viene expresada por la ecuación 1.26

$$r'_{\max} = r_{\max} \cdot \frac{K_{SI}}{K_{SI} + C_I} \quad \text{Ec.1.26}$$

Donde r'_{\max} es la velocidad máxima con inhibición

r_{\max} es la velocidad máxima

Nutrientes

Conociendo la composición química de los microorganismos se puede calcular la cantidad de nutrientes que son necesarios para asegurar su crecimiento. En la Tabla 1.6 se muestra la composición típica de los microorganismos para procesos de tratamiento aerobio. Las concentraciones pueden variar considerablemente cuando se pretende eliminar determinados compuestos orgánicos favoreciendo el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos, o en el caso de procesos específicos como la eliminación biológica de fósforo.

El efecto del nitrógeno y el fósforo sobre la velocidad de crecimiento puede ser descrito mediante expresiones tipo Monod donde actúan como substratos limitantes, entendiendo que para concentraciones de éstos inferiores a la constante de saturación (K_{SN} y/o K_{SP}) la velocidad de crecimiento es baja.

Tabla 1.6. Requerimiento de nutrientes en microorganismos aerobios heterótrofos (Grady y col., 1999)

	g Kg ⁻¹ DQO en forma de biomasa
C	300-400
N	55-85
P	7-18
K, Ca	10
Mg	7
S	6
Na	3
Cl	3
Fe	2
Zn	0,2
Mn	0,1
Cu	0,02
Mo	0,004
Co	<0,0004

1.4. Fundamentos de la nitrificación

1.4.1. Razones que justifican la eliminación de nitrógeno

En muchos países, el nitrógeno figura entre los elementos cuya concentración debe controlarse, siendo los contenidos entre los elementos que se admiten en los vertidos, frecuentemente, muy bajos. A fin de preservar los sistemas biológicos, las nuevas Directivas comunitarias (91/271/CEE) obligan a depurar las aguas residuales de forma más efectiva, contemplando, además de la materia orgánica, la eliminación de nutrientes.

Existen razones de importancia que justifican la eliminación de compuestos de nitrógeno en las aguas residuales antes de su descarga al medio receptor final. Las principales son:

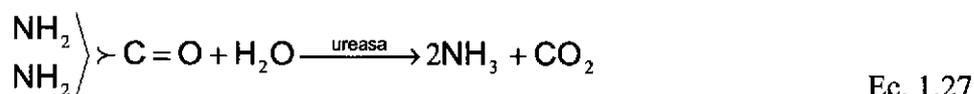
- Limitar la eutrofización en ríos y lagos, pues junto al fósforo, supone un importante nutriente para los organismos vegetales acuáticos. Esto produce un sobrecrecimiento de éstos y da lugar a desequilibrios entre los organismos y la calidad de las aguas.
- Limitar el consumo de oxígeno en los medios receptores, ya que la oxidación de 1 mg de nitrógeno amoniacal, se requieren 4,5 mg de oxígeno, aproximadamente.
- La presencia de oxígeno y de nitrógeno en las aguas puede tener efectos tóxicos o producir enfermedades como la metahemoglobina en bebés, también la aparición de nitrosaminas que son cancerígenas.
- En las aguas el ión amonio se encuentra en equilibrio con el amoniaco libre de tal manera que, si aumenta el pH y la temperatura, se incrementa la concentración de amoniaco libre. Éste tiene efectos tóxicos sobre los peces y otros seres vivos.
- Facilitar el empleo de las aguas residuales en aplicaciones industriales o domésticas, en las que la presencia de nitrógeno cause un perjuicio especial. Por ejemplo, la existencia de amonios en las aguas implica un mayor aporte de cloro para la desinfección al formar cloraminas que se descomponen; encareciendo este proceso.
- Las emisiones de los óxidos de nitrógeno a la atmósfera contribuyen al efecto invernadero. Esto sucede, por ejemplo, cuando no tiene lugar la desnitrificación de forma completa y se forma N_2O .

Por todas estas razones y a medida que las reglamentaciones ambientales se hacen más estrictas, se comprende la necesidad de la eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales.

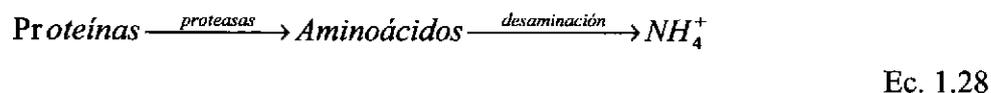
1.4.2. Amonificación

La amonificación es el proceso por el que los compuestos de nitrógeno orgánico son transformados hasta nitrógeno amoniacal. El proceso es realizado por la acción de una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos, etc.) todos ellos heterótrofos. En el agua residual el nitrógeno orgánico se encuentra principalmente en

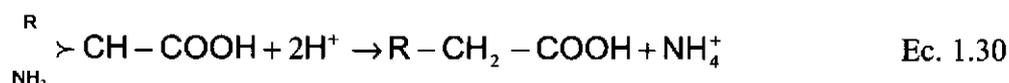
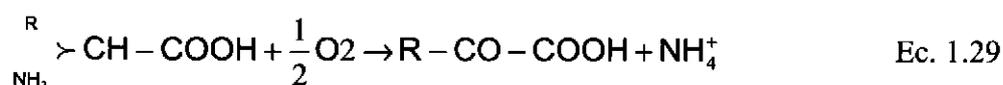
forma de proteínas y urea. La urea se transforma rápidamente mediante un proceso enzimático (1.27)



Las proteínas son mineralizadas de acuerdo con la siguiente secuencia:



La desaminación tiene lugar por vía oxidativa (1.29) o por vía red



El proceso global de amonificación está controlado por la hidrólisis de las proteínas y constituye la etapa limitante, en los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno, para aguas residuales con elevadas concentraciones en proteínas.

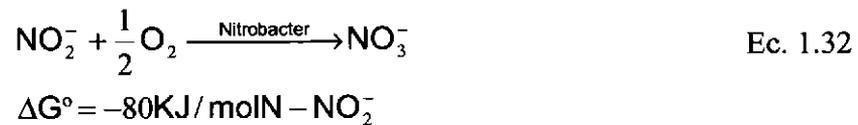
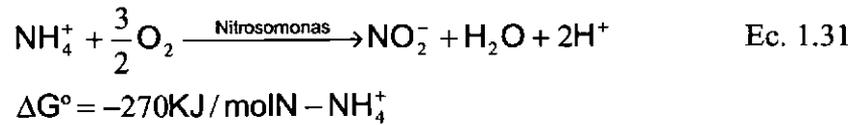
1.4.3. Nitrificación biológica

1.4.3.1. Microorganismos

La nitrificación biológica es el proceso mediante el cual los microorganismos transforman el nitrógeno amoniacal hasta nitrito y nitrato. Si bien se ha observado la capacidad de ciertos microorganismos heterótrofos para oxidar el nitrógeno (*Aspergillus* y *Arthrobacter*, etc.), los procesos de nitrificación son llevados a cabo por un reducido número de microorganismos autótrofos pertenecientes a la familia *Nitrobacteraaceae*. Dentro de esta familia se pueden diferenciar dos grupos: *Nitrosobacteria*, que utilizan el amonio como fuente energética, y *Nitrobacteria*, que obtienen la energía de la oxidación del nitrito. En la práctica, frente a un mismo sustrato utilizado como fuente de energía, la probabilidad de encontrar dos especies diferentes es muy baja (Belser, 1979). Así predominan en medio acuoso las especies bacterianas del género *Nitrosomonas* dentro

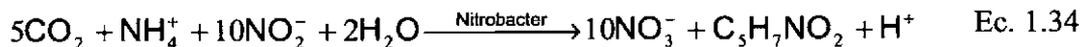
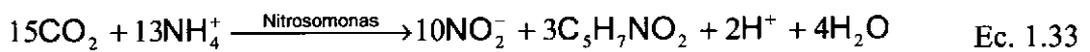
del grupo *Nitrosobacteria* y del género *Nitrobacter* dentro del grupo *Nitrobacteria*. En consecuencia los géneros bacterianos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son los únicos considerados en los procesos biológicos de nitrificación de aguas residuales.

El proceso tiene lugar en dos etapas.

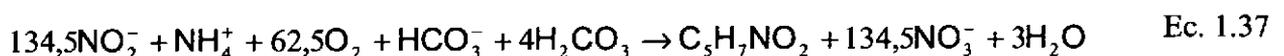
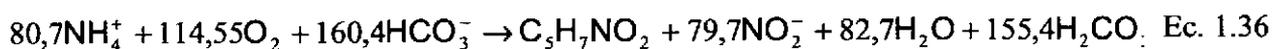


El bajo rendimiento energético de la oxidación del amonio y el nitrito tiene como consecuencia un bajo crecimiento de los microorganismos nitrificantes. Este es el aspecto fundamental a la hora de diseñar los procesos de nitrificación.

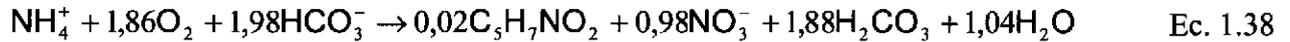
Las bacterias nitrificantes son autótrofas utilizando el CO₂ como fuente de carbono. El CO₂ es reducido, para entrar a formar parte de los microorganismos, a través de la oxidación de amonio o nitrito.



Combinando las ecuaciones de crecimiento (1.33 y 1.34) junto con el equilibrio en medio acuoso carbonato-dióxido de carbono (1.35) se obtienen las ecuaciones de crecimiento con bicarbonato como fuente de carbono mineral (1.36 y 1.37).

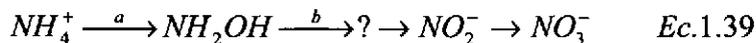


Combinando las expresiones 1.36 y 1.37, obtenemos la expresión global para la nitrificación expresada en la siguiente ecuación:



A partir de las expresiones 1.36 y 1.37 obtenemos el coeficiente de rendimiento máximo para *Nitrosomonas* $Y_{\max, \text{NH}_x} = 0,1 \text{ g SSV g}^{-1}\text{N-NH}_4^+$ (0,14 g DQO(X) $\text{g}^{-1}\text{N-NH}_4^+$ y *Nitrobacter* $Y_{\max, \text{NO}_2} = 0,06 \text{ g SSV g}^{-1}\text{N-NO}_2^-$ (0,085 g DQO(X) $\text{g}^{-1}\text{N-NO}_2^-$).

La oxidación de amonio hasta nitrito tiene lugar en varias etapas mientras que la oxidación de nitrito tiene lugar en una sola etapa (1.39). No se conoce el producto intermedio entre la hidroxilamina y el nitrito:



Las reacciones a y b son inhibidas selectivamente por tiourea e hidrazina respectivamente (Sharma y Ahlert, 1977). La tiourea se emplea para inhibir la nitrificación durante el análisis de la DBO y durante los ensayos de respiración para la biomasa aerobia.

1.4.3.2. Cinética de la nitrificación.

Influencia de la concentración de substratos

La velocidad de consumo de substrato nitrogenado depende de la concentración de todos los substratos que intervienen en el proceso: nitrógeno amoniacal o nitrito, carbono mineral y oxígeno. La dependencia con cada uno de los substratos puede expresarse mediante una cinética tipo Monod obteniendo la ecuación de la velocidad de consumo de substrato nitrogenado (1.40). Concentraciones por debajo de la constante de saturación (constante de velocidad mitad) dan lugar a fenómenos de limitación por substrato, mientras que concentraciones superiores a las constantes de saturación dan lugar a velocidades máximas de crecimiento pudiendo existir fenómenos de inhibición por substrato.

$$R_{X,N} = -\frac{1}{X} \frac{dN}{dt} = \frac{r_{\max}}{Y_{obs}} \cdot \frac{N}{N + K_N} \cdot \frac{O_2}{O_2 + K_{O_2}} \cdot \frac{CO_2}{CO_2 + K_{CO_2}} - b \quad \text{Ec.1.40}$$

En la Tabla 1.7 se recogen los valores de las constantes cinéticas para nitrificación. Los intervalos de variación en los valores son importantes especialmente para los valores de velocidad máxima de rendimiento, coeficiente de rendimiento y constantes de saturación de sustrato, debido a las diferentes condiciones experimentales en que han sido obtenidas (Villaverde, 1994). Los valores promedio provienen del trabajo de Wiesmann (1994), elaborados a partir de recopilación bibliográfica y medidas propias, a 20°C y pH 8. Según estos últimos datos la velocidad de crecimiento de *Nitrobacter* es superior a la de *Nitrosomonas*, aunque se observa para las primeras valores mayores de la constante de saturación. No se han encontrado resultados acerca de valores de la constante de saturación para el CO₂.

1.4.3.3. Limitación de sustratos

Como consecuencia de la secuencialidad de las reacciones de oxidación de amonio y nitrito la actividad de *Nitrobacter* está condicionada por la actividad de *Nitrosomonas*. En consecuencia los fenómenos de limitación de sustrato tendrán, en general, mayor efecto sobre las *Nitrobacter*. Esto se reflejará en valores más altos de las constantes de saturación para *Nitrobacter*. Como consecuencia, en procesos de nitrificación que transcurran con limitación de sustrato, se producirá acumulación de nitrito. Para el oxígeno, concentraciones inferiores a 0,5 mg O₂ dm⁻³ provocan la acumulación de nitrito (Jayamohan y Oghaki, 1988; Hanaki y Wantawin, 1990). En condiciones limitantes de carbono inorgánico Jones y Paskins (1982) también observaron acumulación de nitrito.

Tabla 1.7. Constantes cinéticas de microorganismos nitrificantes

Parámetro	Nitrosomonas		Nitrobacter	
	Intervalo	Valor Promedio	Intervalo	Valor Promedio
μ_{\max} (d ⁻¹)	0,96-1,92	0,77	0,48-1,44	1,08
Y_{obs} (g SSV g ⁻¹ N)	0,04-0,13	0,15	0,02-0,07	0,042
b (d ⁻¹)	0,048-0,1	0,048	0,048-0,1	0,048
K_N (mg N dm ⁻³)	0,06-5,6	0,7	0,06-8,4	1,3
K_{O_2} (mg O ₂ dm ⁻³)	0,25-1,3	0,3	0,25-1,84	1,1

1.4.3.4. Inhibición por sustrato

Los posibles mecanismos de inhibición por sustrato son, por una parte, el fenómeno de saturación de los puntos activos del enzima por moléculas de sustrato; y por otra parte el desplazamiento de los equilibrios químicos que regulan la concentración de sustrato y que provocan variaciones de pH, potencial Redox, presión osmótica y/o transporte activo en la membrana (bomba Na⁺-K⁺).

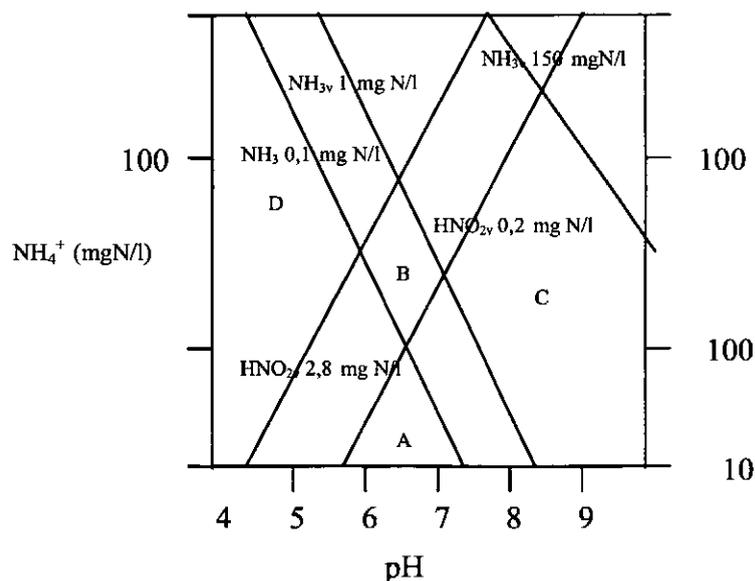


Figura 1.1. Efecto de NH_3 y HNO_2 sobre la nitrificación y la nitratación. Zona A sin inhibición; zona B inhibición parcial de *Nitrobacter*; zona C inhibición total de *Nitrobacter* por amonio libre, zona D inhibición total de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* por ácido nitroso libre; zona E inhibición total de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* por amonio libre.

En cuanto al oxígeno Jones y Paskins (1982) observaron un descenso en la nitrificación desde el 95% al 20% al incrementar la concentración de oxígeno disuelto de 24 a 39 mg O₂ dm⁻³. Sin embargo, Sharma y Ahlert (1977) afirmaron que no existe inhibición de la nitrificación para valores de hasta 60 mg O₂ dm⁻³. Estas situaciones son excepcionales ya que en la práctica se trabaja en condiciones de sustrato limitante, con concentraciones entre 2 y 4 mg O₂ dm⁻³, y las concentraciones anteriores sólo se alcanzan en plantas que utilizan oxígeno puro o aire enriquecido.

En cuanto al sustrato nitrogenado los trabajos de Sharma y Ahlert (1977) parecen confirmar que son las formas no ionizadas NH₃ y HNO₂ los sustratos para *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Por otro lado son las especies no ionizadas las responsables de la inhibición de las bacterias nitrificantes (Anthonisen y col., 1976), encontrándonos en la situación donde una misma especie actúa como sustrato a bajas concentraciones. Dado que los equilibrios NH₃/NH₄⁺ y HNO₂/NO₂⁻ dependen del pH y la temperatura (Ford, 1980) la situación de inhibición queda descrita por la Figura (1.1). Estos resultados fueron obtenidos por Anthonisen y colaboradores (1976) para cultivos en suspensión. A partir de la gráfica se puede concluir que *Nitrobacter* muestran mayor sensibilidad por el amonio libre que *Nitrosomonas*. Así en la zona C tendrá inhibición selectiva de *Nitrobacter* y en consecuencia acumulación de nitrito. En la zona de inhibición parcial, B, el porcentaje de nitrificación no se ve afectado pero el proceso transcurrirá a menor velocidad.

1.4.3.5. Influencia de los parámetros físico-químicos

Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto tiene un efecto significativo tanto en el proceso de nitrificación como en el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Considerando que el oxígeno puede ser un sustrato limitante, su efecto sobre la nitrificación puede modelizarse según la cinética de Monod.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \quad \text{Ec. 1.41}$$

Donde; S_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto (mg/L),

K_{O_2} es la constante de saturación media para el oxígeno.

Los valores de K_{O_2} encontrados en la bibliografía varían entre 0.15 y 2 mg/L debido a que la concentración de oxígeno en la disolución no se corresponde necesariamente con la que existe en el interior del flóculo microbiano, donde se realiza la transformación química. Su valor depende de la dimensión, del grado de mezcla y de la velocidad de difusión del oxígeno dentro del flóculo.

La máxima velocidad de crecimiento de las bacterias nitrificantes se consigue para valores de 7 mg/L. A valores inferiores a 0.2 mg/L ya no hay crecimiento.

Hwang y col. (2000) encontraron que no se producía nitrificación por debajo de 0.4 mg/L. La limitación de oxígeno inhibe fuertemente la oxidación de nitrito a nitrato, la oxidación de amonio a nitrito no se ve tan afectada, esto da lugar a la acumulación de nitrito en procesos con baja cantidad de oxígeno disuelto (Hanaki y col., 1990).

Temperatura

La variación de los parámetros cinéticos con la temperatura muestra un comportamiento tipo Arrhenius (Knowles, 1965; Painter y Loveless, 1983; Wiessman, 1994) donde la actividad es prácticamente nula por debajo de 10°C. El intervalo óptimo de crecimiento para Nitrosomonas y Nitrobacter se sitúa entre 20 y 30°C. A partir de temperatura de 35°C la velocidad disminuye progresivamente hasta cero. Por otra parte, la diferente actividad de Nitrosomonas y Nitrobacter, da lugar a comportamientos diferentes, así entre 10-15°C la actividad de Nitrosomonas es superior a la actividad de Nitrobacter produciendo acumulación de nitrito (Randall y Buth, 1984). Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a cambios bruscos de temperatura. Aumentos bruscos de temperatura hacen que el aumento en la velocidad máxima de crecimiento sea menor de lo esperado. Al contrario, descensos bruscos de temperatura provocan que la caída en la actividad de los microorganismos sea mayor de lo esperado (Henze y Harremöes, 1978).

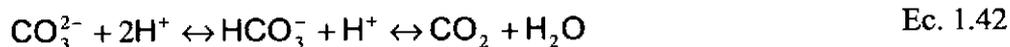
La temperatura influye también sobre los equilibrios químicos que intervienen en el proceso, de forma que a mayores temperaturas aumenta la concentración de NH_3 y

HNO₂ (Ford, 1980) acentuando los fenómenos de inhibición anteriormente comentados (Anthonisen y col., 1976).

pH

La influencia del pH en la nitrificación está en relación con tres aspectos:

- Efecto del pH sobre la propia actividad de las bacterias nitrificantes, debido a su influencia en las reacciones enzimáticas, afectando al valor de los parámetros cinéticos. El intervalo óptimo de variación se encuentra entre 7,5 y 8. Sutton y Jank (1976) dan valores superiores del intervalo óptimo, entre 8 y 9. Esta aparente discrepancia entre los valores se debe a que el valor del pH en el interior de los flóculos y biopelículas es menor que el valor medio en la fase líquida.
- Efecto del pH sobre los equilibrios químicos NH₃/NH₄⁺ y HNO₂/NO₂⁻ (Ford, 1980). El aumento del pH provoca el desplazamiento hacia zonas de inhibición por NH₃ (Concentration) en el gráfico de Anthonisen, mientras que, valores bajos del pH provoca el desplazamiento hacia zonas de inhibición por HNO₂ (D).
- Efecto del pH sobre el equilibrio que regula las especies químicas en que puede encontrarse el carbono inorgánico: carbonato, bicarbonato y dióxido de carbono (1.42).



A valores de pH > 8 el equilibrio se encuentra desplazado mayoritariamente hasta carbonato, poco soluble y difícilmente asimilable por los microorganismos, y a pH bajo la especie predominante es el CO₂, que se desorbe con facilidad del sistema. Ambas situaciones provocan una limitación de carbono inorgánico.

Alcalinidad

La nitrificación reduce la alcalinidad del agua. Basándose en la ecuación estequiométrica (1.38) la oxidación de amonio hasta nitrato es la responsable de un consumo de alcalinidad estimado en $7,14 \text{ g CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$. Este significativo consumo de alcalinidad debe tenerse en cuenta para evitar la acidificación del medio.

Concentración de amonio y nitrito

Además de ser sustratos en el proceso para las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, las formas no ionizadas (NH_3 y HNO_2) actúan como inhibidores en la nitrificación. Las *Nitrobacter* son más sensibles, concentraciones de 1 a 5 mg NH_3/L inhiben la oxidación del NO_2^- pero no la del NH_4^+ (Abeling y col., 1992). Esto da lugar, en procesos en los que el pH no está controlado y haya concentraciones de NH_3 libre o HNO_2 sin disociar a acumulación de NO_2^- . Anthonisen y col. (1976) indicaron que concentraciones a partir de 10 mg NH_3/L inhibían la actividad de las *Nitrosomonas*. Se han conseguido elevadas conversiones de NH_4^+ a NO_3^- trabajando con altas velocidades de carga de amonio, hasta de $7.7 \text{ g N-NH}_4^+/\text{L}\cdot\text{d}$ (Campos, 1999).

çeçen y Göneng (1994) estudiaron el efecto de la concentración de amonio sobre la cinética del proceso de nitrificación. A concentraciones por debajo de $1 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ sigue una cinética de primer orden, entre 1 y $4 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ de orden $\frac{1}{2}$ y a concentraciones mayores es independiente de la concentración.

Sustancias tóxicas

Los procesos de nitrificación pueden ser inhibidos por un diverso número de sustancias aunque las bacterias nitrificantes no son más sensibles a los compuestos tóxicos que otras bacterias (por ejemplo heterótrofas). Sin embargo, la menor velocidad de crecimiento de las bacterias nitrificantes, provoca que en situaciones de inhibición, aunque la concentración de agente inhibidor no provoque la inhibición total, el lavado de biomasa nitrificante del reactor disminuye la capacidad total de nitrificación (Fenger, 1970).

La inhibición por metales depende mucho de sí se trabaja con cultivos puros o mixtos (nitrificantes y heterótrofos). Para una misma concentración la inhibición es menor en cultivos mixtos que en cultivos puros debido a que la actividad de la especie metálica es mayor en medio acuoso que en los flóculos. Algunos compuestos orgánicos, como compuestos azufrados, anilinas, fenoles y cianuro, parecen tener un efecto inhibitorio importante en la nitrificación (Tomlinson y col., 1966).

1.5. Eliminación simultánea de carbono y nitrógeno

La eliminación simultánea de carbono y nitrógeno mediante procesos biológicos puede implicar la coexistencia de varios procesos biológicos dentro de un mismo biorreactor. Las transformaciones biológicas de los substratos carbonosos y nitrogenados tienen lugar de forma secuencial o simultánea dentro del mismo biorreactor. Así, por ejemplo, la transformación de materia carbonosa tiene lugar mediante una serie de etapas secuenciales, la nitrificación y la oxidación biológica de materia carbonosa tienen lugar de manera simultánea. En los procesos que transcurren de forma secuencial es importante determinar la etapa controlante del proceso. Mientras, en los procesos que transcurren de forma simultánea, el interés es el estudio de la influencia de los factores ambientales sobre la transformación más sensible a los mismos, así como la posible competencia por un determinado substrato. Como consecuencia es necesario conocer y evaluar las posibles transformaciones biológicas y como interaccionan los microorganismos que participan en las mismas.

Sobre la base de las ecuaciones y parámetros cinéticos para la oxidación heterótrofa de materia carbonosa y para la nitrificación comentados en secciones precedentes se observó que los coeficientes cinéticos son bastante diferentes para microorganismos heterótrofos y autótrofos. En consecuencia el crecimiento simultáneo de ambos tipos de microorganismos en un mismo reactor que trata agua residual con carbono y nitrógeno amoniacal viene condicionado por los parámetros cinéticos y las condiciones medioambientales. Así, en general, se admite que los microorganismos autótrofos son más sensibles a los factores ambientales (oxígeno, pH, T, potencial redox) que los microorganismos heterótrofos.

Tabla 1.8. Comparación de parámetros para microorganismos heterótrofos y autótrofos (Wiesmann, 1994)

Parámetro*	Heterótrofo	Autótrofo
$\mu(d^{-1})$	7,2	0,8
K_s (mg S dm^{-3})	100	0,7
B (d^{-1})	0,24	0,05
Y (mg SSV mg^{-1} S)	0,43	0,15
K_{O_2} (mg O_2 dm^{-1})	0,08	0,3

*pH 8 y 20°C

Comparando los valores típicos de la velocidad máxima de crecimiento para las bacterias heterótrofas y autótrofas, recogidos en la Tabla 1.8, observando que su valor para los microorganismos autótrofos es de un orden de magnitud inferior que el correspondiente valor para heterótrofos, en consecuencia, el tiempo de retención de sólidos (TRS) mínimo para las bacterias nitrificantes será de un orden de magnitud superior. Esto implica que las bacterias nitrificantes pueden ser lavadas en biorreactores que operan en condiciones que aseguran el crecimiento de bacterias heterótrofas. Este fenómeno de lavado se agrava considerando la mayor sensibilidad de las bacterias autótrofas ante la concentración de oxígeno que presentan valores de K_{O_2} superiores respecto a las bacterias heterótrofas. El mayor valor de μ_{max} y el menor valor de K_{O_2} de las bacterias heterótrofas hacen que estas sean capaces de sobrevivir en biorreactores con TRS y concentraciones de oxígeno que puede causar el lavado de los microorganismos nitrificantes. En otras palabras, las bacterias heterótrofas controlan la concentración de oxígeno disuelto cuando el suministro de oxígeno al biorreactor es suficiente para cubrir las necesidades de ambos grupos de microorganismos. En consecuencia la eliminación de carbono puede ocurrir sin impedimentos mientras que la nitrificación no tiene lugar. Así es posible diseñar biorreactores con TRS y concentración de oxígeno disuelto que permita únicamente la oxidación de materia carbonosa o la combinación de oxidación de materia carbonosa y nitrificación, pero en ningún caso únicamente la nitrificación sin que tenga lugar la oxidación de la materia carbonosa del medio.

Comparando los valores del coeficiente de rendimiento celular y considerando la concentración de materia carbonosa y nitrogenada presente en el agua residual es

evidente que la cantidad de biomasa heterótrofa formada es muy superior a la cantidad de biomasa autótrofa formada. Expresando la concentración de biomasa como el contenido en sólidos suspendidos volátiles, y considerando la fracción de estos sólidos no activa (materia particulada inerte, productos de la descomposición endógena, nos lleva a la consecuencia que la fracción de los sólidos suspendidos representada por los microorganismos autótrofos será muy baja. Pese a la menor proporción de microorganismos autótrofos, éstos tienen un mayor peso en la cantidad de oxígeno necesario que habrá que suministrar al biorreactor debido al mayor cambio en el estado de oxidación que implica la oxidación de amonio hasta nitrato y al menor coeficiente de rendimiento celular. Esto implica que aunque la concentración de autótrofos es mucho menor, los requerimientos de oxígeno son del mismo orden que para los microorganismos heterótrofos, aunque estos estén en mayor proporción.

Otro aspecto a considerar es el relacionado con los valores del coeficiente de velocidad mitad. Así las bacterias autótrofas presentan valores de K_s muy bajos. Esto implica que en un reactor de mezcla completa la concentración de amonio en el medio será baja siempre que el valor de TRS sea lo suficientemente elevado para asegurar el crecimiento de las bacterias autótrofas. Por otra parte la concentración de amonio aumentará rápidamente cuando el valor de TRS sea bajo haciéndose máxima esta concentración coincidiendo con el lavado total de biomasa autótrofa. En este sentido el proceso de nitrificación funciona como un proceso de todo o nada. Sin embargo, no en todas las situaciones el proceso de nitrificación funciona de esta manera (todo o nada). Así en situaciones donde se producen picos de carga en nitrógeno amoniacal la nitrificación es parcial aunque no se produzca lavado de biomasa nitrificante. Otra situación donde la nitrificación puede ser parcial es en el caso del tratamiento de efluentes con elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal, en donde se pueden dar fenómenos de inhibición por sustrato o por producto. Finalmente hay que considerar el efecto de la temperatura y el pH. La dependencia de la velocidad de crecimiento con el pH y la temperatura es más acusada para los microorganismos autótrofos. De este modo el TRS se elegirá lo suficientemente elevado para asegurar la nitrificación total a la temperatura más baja esperada. De manera análoga ocurre con el pH aunque en este caso hay que considerar efectos adicionales. La nitrificación supone el consumo de alcalinidad, de tal forma que si no existe alcalinidad suficiente en la alimentación se producirá el descenso en el pH. El descenso en el pH se debe a que el consumo no es

compensado por la baja producción de alcalinidad, relacionada con la adsorción del CO₂, producida en la oxidación de materia carbonosa. Como ya se ha comentado el descenso en el pH provoca el desplazamiento del equilibrio carbonato-bicarbonato disminuyendo la concentración de carbono inorgánico necesario para el crecimiento de los microorganismos autótrofos. Por el contrario, una excesiva adición de alcalinidad en la alimentación que provoque valores elevados del pH en combinación con elevadas concentraciones de sustrato (NH₄⁺) y producto (NO₂⁻) aumenta la concentración de las formas no cargadas de estas sustancias que inhiben selectivamente a las bacterias nitrificantes, especialmente *Nitrobacter*.

1.6. Referencias

Abeling U. and Seyfried C.F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of potato-strach wastewater. *Water Science and Technology* 28 (2); 165-176.

Albert R.E. (EPA 1978). Carcinogen Assesment Group's Final Rep. On Population Risk to ambient Benzene Exposure.

Álvarez, P.J.J. and Vogel, T.M. (1991). Substrate interactions of benzene, toluene and p-xylene during microbial degradation by pure cultures aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 57; 2981-2985.

Arvin, E.; Jensen, B.K. and Gunderssen, A.T. (1989). Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Applied and Environmental Microbiology* 55; 3221-3225.

Annadurai, G.; Mathalai, S.; Murugesan, T. (1999). Box-Behnken design in the development of optimized complex medium for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NICM 2174). *Bioprocess Engineering* 21; 415-421.

Annadurai, G.; Mathalai, S.; Murugesan, T. (2000). Design of experiments in the biodegradation of phenol using immobilized *Pseudomonas pictorum* (NICM-2077) on activated carbon. *Bioprocess Engineering*. 22 (3); 101-107.

Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. and Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollut Control Fed* 48; 835-852.

Babor, J.A.; Ibarz, J. (1970). Química general moderna, 6º edición. Ed. Marín, Barcelona.

Bauer, D. (Chem. Rundschau 32, Nr. 41, 10. Oct. 1979) Meet. Achema, 1979.

Belser L.(1979). Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Review Microbiology* 33; 309-333.

Bokina A.I. (1976). Investigation to the mechanism of action, atmospheric pollutants on the central nervous system and comparative evaluation of methods of study. *Environmental Health Perspect* 13; 37-42.

Campos J.L., Garrido J.M., Méndez R., Lema J.M. (1999). Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresource Technology* 68; 141-148.

Çeçen F., Gönenç I.E. (1994). Nitrogen Removal characteristics of nitrification and denitrification filters. *Water Science and Technology* 34 (10); 35-41.

Cookson, J.T.Jr. (1995). Bioremediation engineering design & application. McGraw-Hill, Inc., New York, NY.

Cotoruelo, L.M.; Marqués, Mª.D. (2000). Eliminación de nutrientes en aguas residuales. II Eliminación del nitrógeno. *Ingeniería Química, Febrero*; 161-166.

Dean B.J. (1978). Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research* 47; 75-97.

Devine, Kate (1995). Bioremediation Market: yesterday, today and tomorrow. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons. Edited by Robert E. Hinchee, Jeffrey A. Kittel and H. James Resisinger. *Battelle Press*. 50-60.

Duff, S.B.J.; Kennedy, K.J.; Brady, A.J. (1995). Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Research* 29 (2); 694-651.

Evans, P.J.; Mang, D.T. and Young, L.Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 57; 450-454.

Fenger B. (1970). Aktieverede slamanlaeg og biologiske filtre. *Stads og havneingenioren* 61; 47-54.

Fodor, G.G. (1972). Toluene. Schädliche Dämpfe, VDI-Verlag, Düsseldorf.

Ford D.L. (1980). Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *Journal Water Pollut Control Fed* 52 (11); 2726-2746.

Grady, C.P.; Dagger, G.T. And Lim, H.C. (1999). Biological wastewater treatment. 2^a Ed. Marcel Dekker; Inc. New York.

Ha, S.R.; Vinitinantharat, S. (2000). Competitive removal of phenol and 2,4-diclorophenol in biological activated carbon system. *Environmental Technology* 21; 387-396.

Hanaki K. and Wantawin C. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended growth reactor. *Water Research* 24; 297-302.

Henze M. and Harremoes P. (1978). Biological denitrification of sewage: a literature review. *Water Technology* 8 (4/5); 509-555.

Henze M., Harremöes P., Jansen J.C. and Arvin E. (1995). Wastewater treatment. Biological and chemical processes. Springer-Verlag, Berlín.

Hwang, S. and Hanaki K. (2000). Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. *Bioresource Technology* 71; 159-165.

Jayamohan S. and Oghaki S. (1988). Effect of DO on kinetics on nitrification. *Water Research* 6; 141-150.

Jones G.J. and Paskins A.R. (1982). Influence of high partial pressure of carbon dioxide and/or oxygen on nitrification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32; 213-223.

Kennes, C.; Cox, H.; Doddema, M. and Harder, W. (1996). Design and performance of biofilters for the removal of alkylbenzene vapors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66 (3); 300-304.

Kennes, C.; Lema, M. y Veiga, M.C. (1994). Biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos". *Ingeniería Química* 302; 119-123.

Kibret, M.; Somitsch, W. and Robra, K.H. (2000). Characterization of a phenol degrading mixed population by enzyme assay. *Water Research* 34 (4); 1127-1134.

Knowles G., Downing A. L. and Barret M.J. (1965). Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with aid of an electronic computer. *Journal of Genetic Microbiology* 38; 263-278.

Kovalick, W.W. (1991). Removing impediments to the use the bioremediation and other innovative technologies. *Environmental Biotechnology For Waste Treatment*. Edited by Sayler, G.S.; Fox, R. and Blackburn, J.W. Plenum Press.

Lehmann, H. (Shell) (1979). Untersuchungen von Tankstellen personal auf Benzolexposition. *Erdöl und Kohle-Erdgas-Petrochemie* 32; 331.

Lehninger, A.L. (1984). Principios de bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona.

Merck Index The (1996). Ed. Budavari, S. 12th ed. Merck Research Laboratorios. Merck & Co., Inc. Whitehouse station, New Jersey, USA.

Monod J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review Microbiology* 3; 371-376.

Morrison, R.T.; Boyd, R.N. (1990). Química orgánica, 5ª edición. Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington.

Nakamura, Y.; Sawada, T. (2000). Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75; 137-142.

Nakhla, G.F.; Al-Harazin, I.M.; Farooq, S. (1995). Organic loading effects on the treatment of phenolic wastewaters by a sequencing batch reactors. *Water Environmental Research* 65 (5); 686-689.

Painter H.A. and Loveless J.E. (1983). Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated sludge process. *Water Research* 17 (3); 237-248.

Pöpel F. (1988). Lehrbuch für abwassertechnik und gewässerchutz. Deutscher Fachschriften-Verlag, Wiesbaden.

Radojiac B. (1975). Determination of urinary phenol in a group of workers occupationally exposed to benzene. *Arch. Hig. Rada Toksikol* 26; 209-212.

Randall C.W. and Buth D. (1984). Nitrite build-up in activated sludge resulting from combined temperature and toxicity effects. *Journal Water Pollut Control Fed* 56 (9); 1045-1049.

Reisinger, H.J. (1995). "Hydrocarbon bioremediation- an overview". Edited by Hinchey, R.E.; Jeffrey, A.K. and Reisinger, H.J. Editorial Battelle Press.

Sato A. (1975). Kinetic studies on sex difference in susceptibility to chronic benzene intoxication with special regard to body fat content. *British Journal of Industrial Medicine* 32; 321-328.

Sayler, G.S. and Fox, R. (1991). Environmental Biotechnology: Preceptions, reality, and applications". *Environmental Technology*. For Waste Treat. Edited by Sayler, G.S.; Fox, R. and Blackburn, J.W.

Sharma B. And Ahlert R.C. (1977). Nitrification and nitrogen removal. *Water Research* 11; 897-925.

Söhngen, N.L. (1913). Benzin, petroleum, paraffinol und paraffin als kohlenstoff-und energiequelle für mikrobien. *Zentralbl Bakteriol, Parasiteuk Abt II*. 37, 595-606.

Sutton P.M. and Jank B.E. (1976). Design considerations for biological carbon removal nitrification systems. In Process research program for the abatement of municipal pollution under provisions of Canada-Ontario agreement on Great Lakes water quality, 206-249.

The Handbook of Environmental Chemistry. Volume 3 Part B Anthropogenic Compounds. Edited by O. Hutzinger. Germany 1982.

Thomas, J.M.; Gordy, V.R.; Fiorenza, S. and Ward, C.H. (1990). Biodegradation of BTEX in subsurface materials contaminated with gasoline: Granger, Indiana. *Water Science and Technology* 6; 53-62.

Tokunaga R., Shogo T., Mariko O., Toshio I., Kunihito S., Miyoko H. and Masayuki I. (1974). Evaluation of the exposure to organic solvent mixture. *Int. Arch. Arbeitsmed* 33; 257-267.

Tomlinson T.G., Boon A.G. and Trotman G.N.A. (1966). Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *Journal of Applied Bacteriology* 29; 266-291.

Veiga, M.C.; Fraga, M.; Amor, L. y Kennes, C. (1996). "Tecnologías actuales para el tratamiento de aire contaminado con compuestos orgánicos volátiles: la biofiltración". *Retema*; 65-70.

Villaverde S. (1994). Parámetros controlantes del crecimiento y actividad de la biopelícula nitrificante en biofiltros sumergidos. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.

Wang, S.J.; Loh, K.C. (1999). Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme Microbial Technology* 25; 177-184.

Ware, G.W. (1988). "Reviews of environmental contamination and toxicology". 106; 1-19.

Wiesmann U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 51; 113-154.

Zabol Moskwa (1979). Nr. 2; cit. Medizin in Osteuropa, Freie Universität Berlin, 10, Aug. 1979; U.W.D.-Umweltschutzdienst, Düsseldorf 9, Nr. 24, 29.

Capítulo 2. Materiales y métodos

CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos

En este capítulo se describen los materiales y las técnicas analíticas utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo.

La cuantificación de los compuestos se realiza mediante el método del patrón externo utilizando curvas de calibrado en las que se presenta el área frente a la concentración.

2.1 pH

Las medidas del pH se realizan utilizando un electrodo INGOLD U 402-S7, conectado a un medidor pH/mV Crison 507. Previamente se realizaron calibrados empleando para ello disoluciones tampón Crison de pH 4,00 y pH 7,02 a 20°C.

2.2 Sólidos en suspensión totales y volátiles (SST y SSV)

La determinación se realiza siguiendo el método descrito en el Estándar Métodos (APHA, 1998). Según este método se filtra una alícuota de muestra sobre un filtro de fibra de vidrio Albet GF/C 4,7 cm de diámetro y 1,2 μm de tamaño de poro previamente calcinado durante media hora a 550°C. A continuación se pesa y se filtra una cantidad predeterminada de muestra y se seca en una estufa a 110°C durante una hora; se deja enfriar y se calculan los SST por diferencia de pesada. Posteriormente se vuelve a calcinar otros 30 minutos a 550°C. Los SSV se determinan por diferencia de pesada entre el filtro seco y el finalmente calcinado. Todo este procedimiento se realiza por duplicado.

2.3 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto se determina mediante un electrodo selectivo de oxígeno, Cell Ox 325, conectado a un medidor Crison Oxi 330. Se realiza el calibrado diariamente de manera automática.

2.4 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Este parámetro se determina a partir de un método semimicro derivado del descrito en el Estándar Métodos (APHA, 1998). Se define como la cantidad de oxígeno ($\text{mg O}_2/\text{L}$) necesaria para la oxidación de toda la materia orgánica y de los compuestos oxidables contenidos en un volumen determinado de muestra.

En todos los casos se halla la DQO soluble. El procedimiento empleado en todos los casos fue el correspondiente a altas concentraciones (>100 ppm). Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica contenida en una muestra con una mezcla de dicromato potásico y ácido sulfúrico, realizándose una digestión de dos horas. El dicromato en exceso se valora con sulfato amónico ferroso. Dado que su concentración varía con el tiempo, cada vez que se realiza un grupo de determinaciones se valora el sulfato amónico ferroso. El análisis de las muestras y la valoración del blanco son realizadas por duplicado.

2.5 Determinación de nitrito y nitrato

Para la determinación del nitrito y nitrato se utiliza la técnica de electroforesis capilar (Amram y col., 1992; Harold y col., 1993) basada en las diferencias existentes entre las movilidades electroforéticas de iones bajo la influencia de un flujo electroosmótico. En esta técnica, la aplicación de una corriente eléctrica a un capilar crea un campo eléctrico que provoca una migración de los iones. La velocidad de esta migración depende de la carga y de la masa de las especies cargadas.

Las medidas se realizaron en un equipo Hewlett-Packard^{3D} CE, con un capilar de sílice termostatzado a una temperatura de 30°C ; su longitud efectiva es de 40 cm y de $50\ \mu\text{m}$ de diámetro interno. El voltaje aplicado es de 30 KV con polaridad negativa. Es empleada una disolución tampón de fosfato a pH 8 preparada a partir de dos disoluciones de 100 mM de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (Fluka), relación 10:1 y filtrándolas con un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$. También son filtradas las disoluciones de calibrado y las muestras. El tampón es sonicado durante 5 minutos para desgasificarlo, además deben ser eliminadas, si existen, las burbujas presentes en los viales.

El calibrado es realizado por separado a partir de disoluciones de 100 mg/L de N-NO_3^- y N-NO_2^- que han sido preparadas con KNO_3 y NaNO_2 . En todas las disoluciones es empleada agua de la calidad Mili-Q. La detección es realizada a una longitud de onda de 224 nm y 450 nm para la de referencia, a la que el analito no absorbe; la muestra es inyectada a 200 mb-s, siendo el volumen inyectado de 0,4 ml.

En las Figuras 2.1 y 2.2 es presentado un calibrado típico para la determinación de estos iones empleando esta técnica. En la Figura 2.3 es presentado un electroferograma obtenido en las condiciones anteriormente descritas. El calibrado es actualizado diariamente.

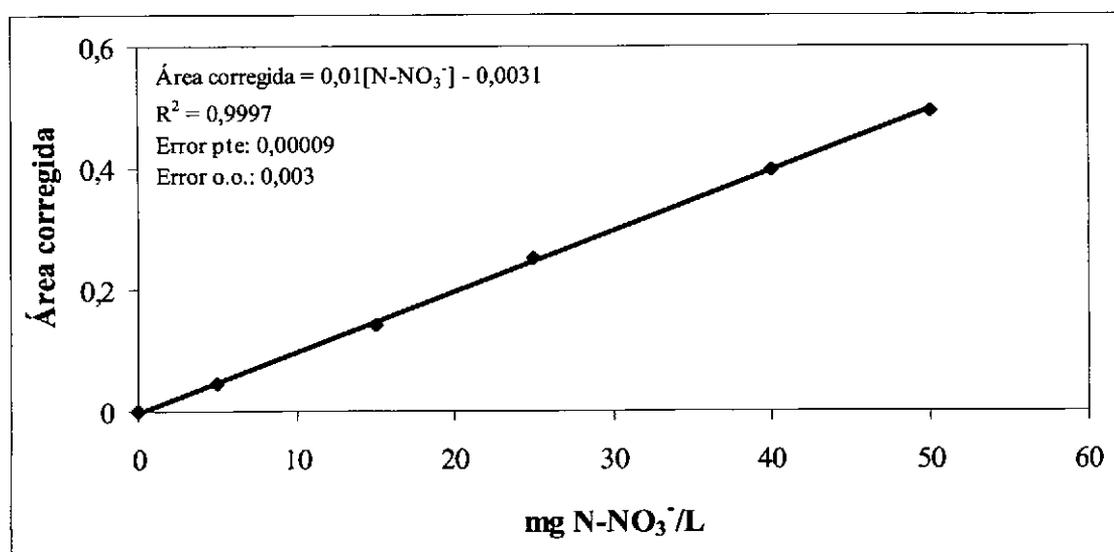


Figura 2.1. Gráfico correspondiente al calibrado de nitrato.

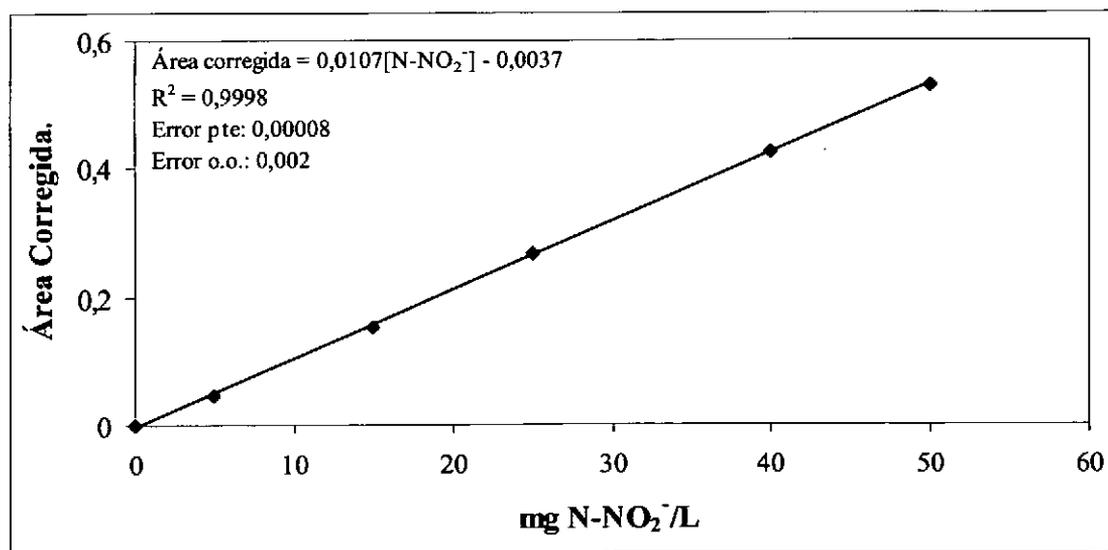


Figura 2.2. Gráfico correspondiente al calibrado de nitrito.

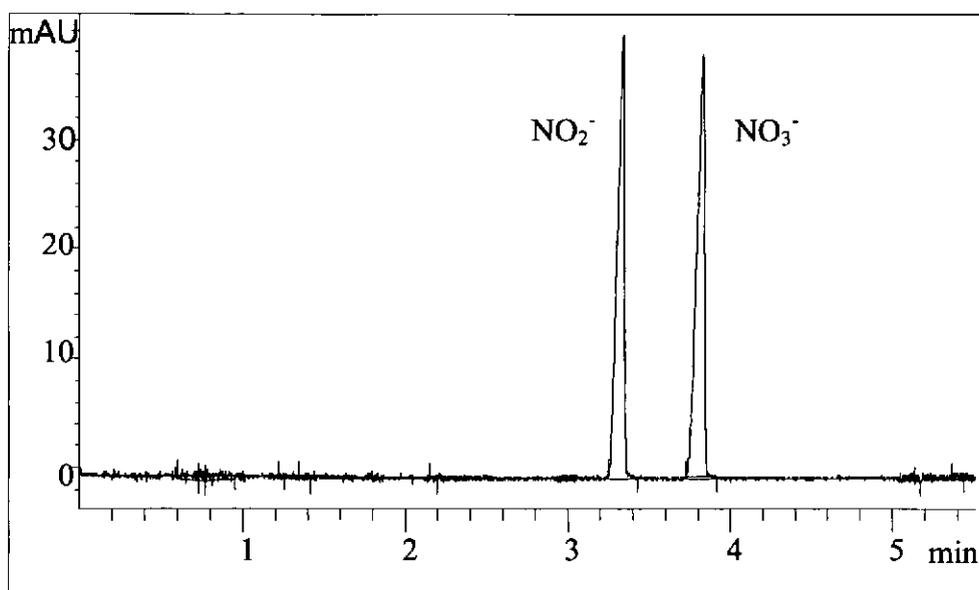


Figura 2.3. Electroferograma típico de nitrito y de nitrato.

También se ha realizado la determinación de nitrito y nitrato según los métodos descritos en el Estándar Métodos (APHA, 1998). La determinación del ión nitrato se realiza mediante medidas de absorbancia a 220 nm. Para determinar la concentración real de nitrato se realiza, además, una medida a 275 nm, en la que no se produce absorción por el nitrato para eliminar la interferencia de la materia orgánica que absorbe a las dos longitudes de onda. Para la determinación del ión nitrito se utiliza una técnica colorimétrica basada en la formación de un colorante azopúrpura, formado por acoplamiento a pH ácido de la sulfanilamida diazotada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, cuya absorbancia es medida a 543 nm. En ambas medidas es utilizado un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 11.

En la Figura 2.4 es mostrado un calibrado representativo para la determinación de NO₃⁻ mediante la técnica espectrofotométrica. El calibrado es actualizado con cada cambio de reactivo.

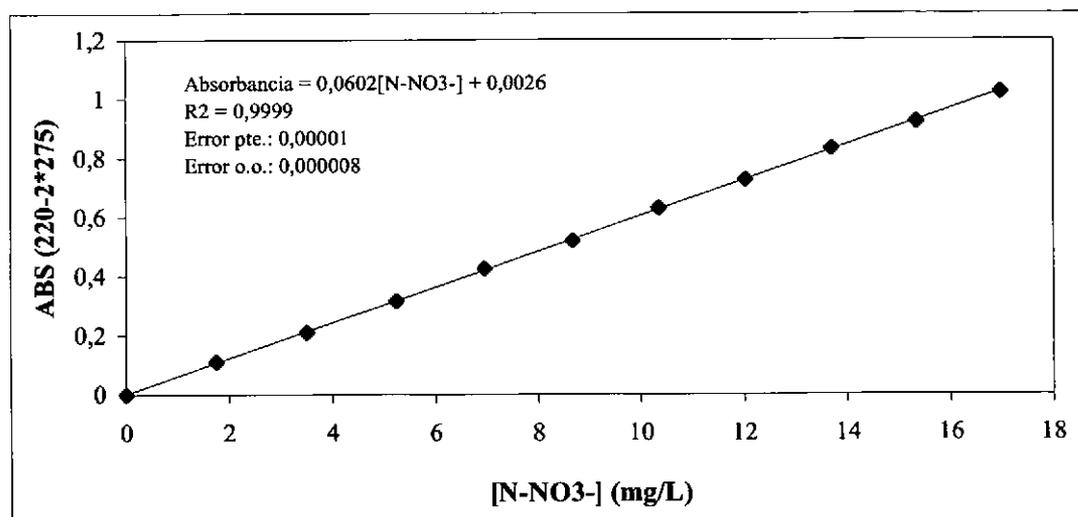


Figura 2.4. Gráfica correspondiente al calibrado típico de nitrato por espectrofotometría.

2.6 Determinación de los BTEX

la cuantificación de los compuestos orgánicos benceno, etilbenceno, tolueno e isómeros del xileno (BTEX), es realizado mediante la cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890 serie II, dotado de un detector de ionización de llama (FID).

La columna empleada es capilar de fase TR-WAX de 50 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno. La inyección de las muestras es realizada manualmente a través de una jeringa especial para gases.

El gas portador empleado ha sido el helio con un caudal de 2 mL/min. El helio también ha sido utilizado como gas auxiliar con un caudal de 20 mL/min. La temperatura del detector e inyector durante el análisis fue de 250 °C. La temperatura de la columna aumenta de 60 a 96 °C con una rampa de 1 °C/min. El flujo de aire ha sido de 160 mL/min y el de hidrógeno de 50 mL/min. El volumen de inyección es de 0,1 ml.

Para reducir los tiempos de retención, debido a que al final no se decidió estudiar todos los isómeros del xileno, sólo se ha estudiado el más recalcitrante, el *o*-xileno, se modificó el método de determinación de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno. Para ello se utiliza un programa de horno isoterma, a 175 °C, y no se emplea "Splitless". El tiempo se redujo a unos 10 min respecto a las condiciones iniciales de operación.

De forma rutinaria se miden las concentraciones de los tóxicos a lo largo del tiempo. Previamente a la inyección en el cromatógrafo se extrae 1 mL de la fase gas de la muestra. Para ello se utiliza una jeringa de plástico estéril con conexión luer, de 1 mL y aguja desmontable. Con la jeringa de gases se extraen 200 μ L de gas contenido en la jeringa anterior y se inyectan en el cromatógrafo.

La cuantificación de los BTEX se realiza mediante el método del patrón externo, como ya se ha mencionado en el comienzo de este capítulo. La concentración se calcula a partir de una recta de calibrado donde se representa el área de los picos de patrones de concentración conocida frente a la concentración en la fase gas de los mismos.

La concentración de tóxico en la fase líquida se calcula en función de la relación de equilibrio que existe con la concentración en la fase gas (la concentración real medida). Este equilibrio se rige por la ley de Henry.

2.7 Nitrógeno amoniacal

Para determinar el contenido en Nitrógeno amoniacal (N-NH₃), se empleó un electrodo, ión selectivo de amonio, Metler Toledo, conectado a un medidor pH/mV CRISON 506.

El nitrógeno amoniacal (NH₄⁺ y NH₃ (ac)), se convierte en NH₃ (g) elevando el pH por encima de 11, con una base fuerte. Este se difunde al través de la membrana hidrófoba del electrodo.

El calibrado del electrodo se hizo utilizando disoluciones patrón de NH₄Cl. Dando una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de amoniaco en disolución y la medida, en mV, del equipo. Debido a la falta de linealidad en todo el rango de concentraciones, se tuvo que emplear dos rectas de calibrado: uno para concentraciones bajas y otro para las altas.

En la Figura 2.5 se muestra como ejemplo una recta de calibrado del logaritmo de la concentración de N-NH₃ frente al potencial en mV.

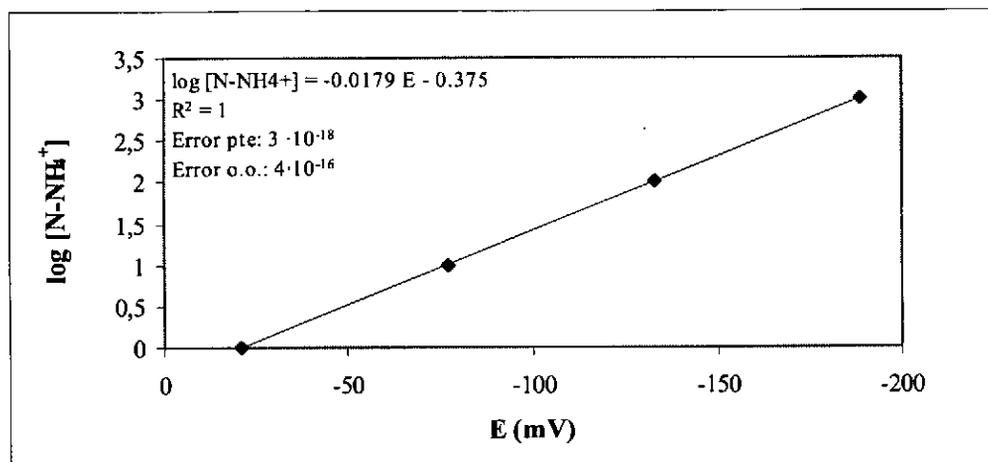


Figura 2.5. Gráfica de calibrado de amoníaco de bajas concentraciones.

2.8 Determinación de fenol

El fenol es determinado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Esta técnica es un método físico de separación en el que los componentes a separar se dividen en dos fases, una fase móvil y otra fase fija sobre un soporte. La fase móvil va solubilizando a los componentes, de modo que éstos son eluidos a distintos tiempos en función de la fuerza con la que están retenidos a la fase estacionaria y su grado de solubilidad en la fase móvil. Para ello ha sido utilizado un equipo Hewlett-Packard Series 1100 con una columna C-18 ODS de 25 cm de longitud y con detección UV "Diode-Array". Las condiciones de medida han sido las que se mencionan a continuación:

- fase móvil: metanol/agua (60%/40%), 1 mL/min.
- Volumen de inyección de 20 μ L con lavado entre cada inyección.
- Longitudes de onda de detección: 275 nm, 254 nm, 280 nm.

El calibrado y la cuantificación se realiza teniendo en cuenta los valores a 275 nm.

Los patrones han sido realizados a partir de una disolución madre de fenol (Merk) de 1000 mg/L. Para la fase móvil se empleó metanol (calidad HPLC) y agua calidad Milli-Q, ambos disolventes filtrados con un filtro de 0,45 μ m de membrana de Nylon.

En las Figuras 2.6 y 2.7 se presenta un típico cromatograma y un calibrado representativo para la determinación de fenol. El calibrado se actualiza con cada preparación de la disolución madre de fenol, a partir de la cual, se realizan los ensayos o se alimenta el reactor.

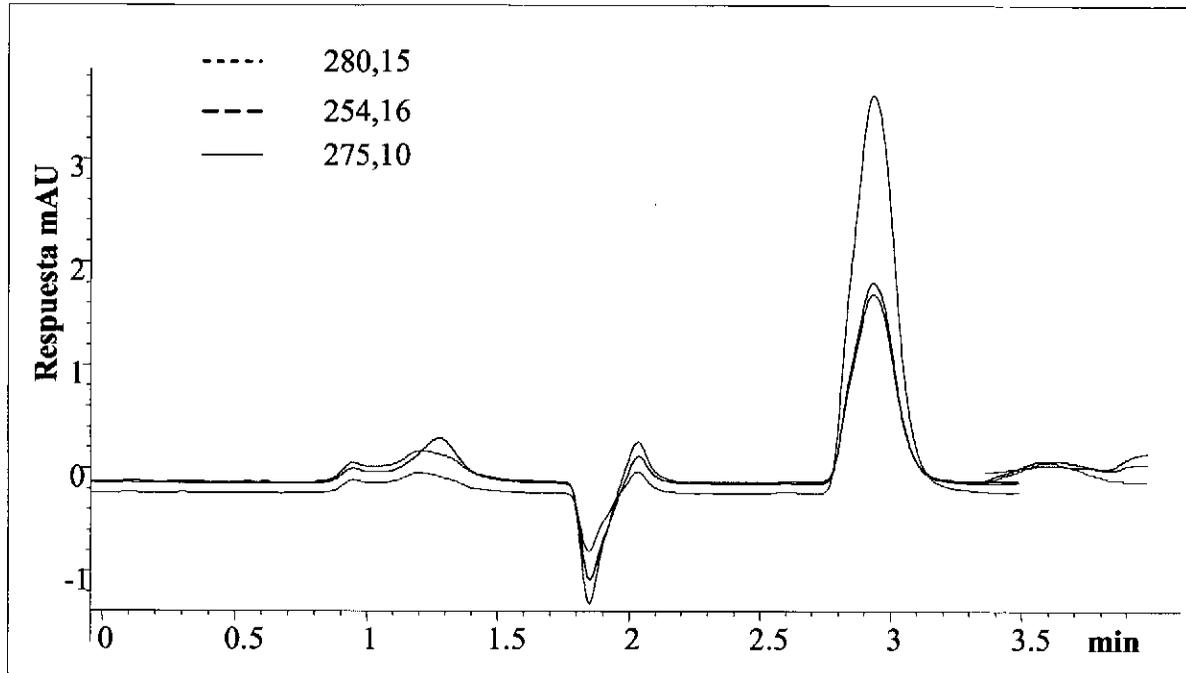


Figura 2.6. Cromatograma típico de fenol.

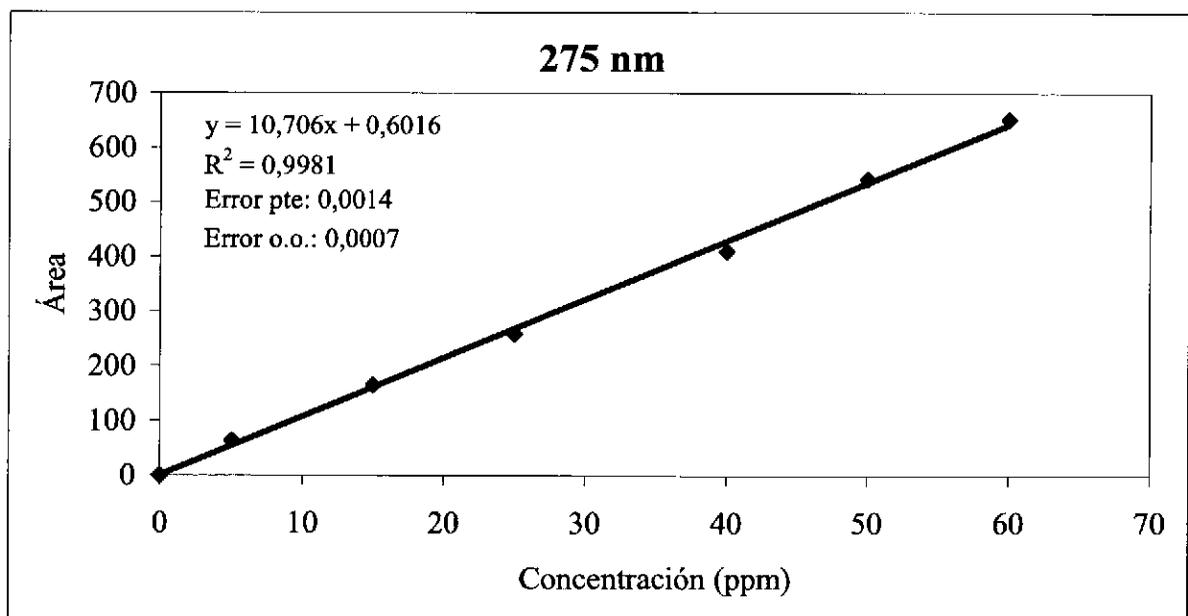


Figura 2.7. Gráfica de calibrado de fenol.

2.9 Determinación de metales

Para la determinación de metales pesados se emplea la técnica de espectroscopía de absorción atómica de llama, en la que una disolución de la muestra es pulverizada en una llama mediante un nebulizador, el cual transforma la disolución en un aerosol constituido por diminutas gotas de líquido que se introducen en la llama. A continuación tiene lugar una serie de procesos que dan como resultado una mezcla de átomos iones elementales gaseosos. Los átomos en estado gaseoso de un elemento son capaces de absorber radiación de las longitudes de onda características de las transiciones electrónicas del estado fundamental a estados excitados superiores.

En este trabajo se ha empleado un espectrofotómetro de absorción atómica *Instrumentation laboratory (IL)* modelo 251, y como fuente una lámpara de cátodo hueco del metal a analizar. Se han analizado muestras tanto del efluente, influente como del reactor, filtrándose cada muestra por una membrana de 0,45 μm de poro y añadiendo a continuación 100 μL de HNO_3 concentrado, por 10 mL de muestra. Las distintas disoluciones se preparan con agua acidulada (1,5 mL HNO_3/L), la misma que servirá para el blanco. Se realizan los calibrados a diario, con patrones de calidad Panreac del 99,8% de pureza y también son diluidos en agua acidulada y cada ocho muestras es introducido un patrón para ver la estabilidad y reproducibilidad del equipo.

Las muestras son preparadas en tubos de ensayo de polipropileno. Para los distintos tipos de muestras analizadas se hicieron pruebas de cuantificación por el método de adiciones, comparando los resultados con los del calibrado con el patrón. Únicamente las muestras de la digestión dieron una diferencia significativa, así que la cuantificación de estas muestras se realizó por el método de las adiciones. En las Figuras 2.8 y 2.9 se puede apreciar la diferencia en la pendiente entre un calibrado con patrones y de una adición.

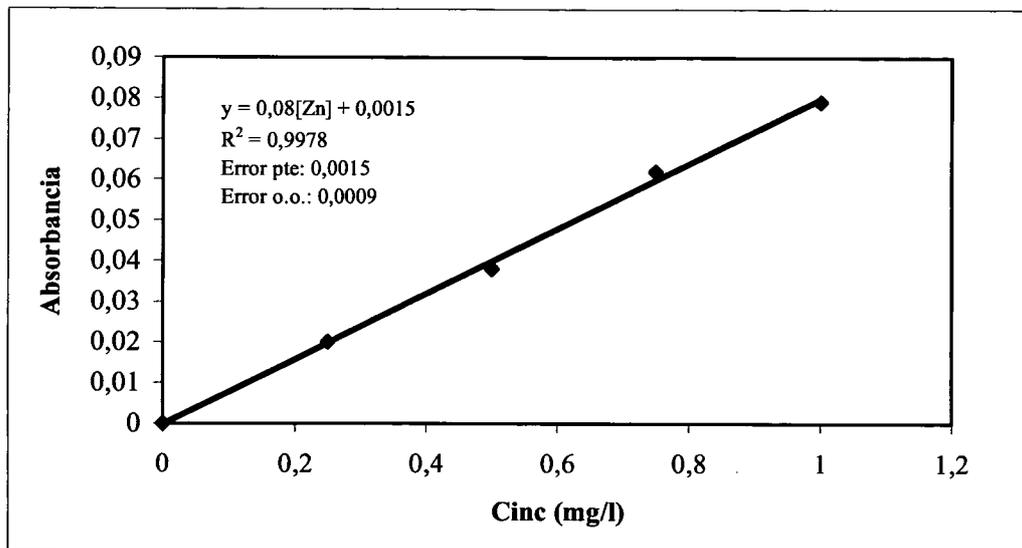


Figura 2.8. Calibrado típico de Zinc.

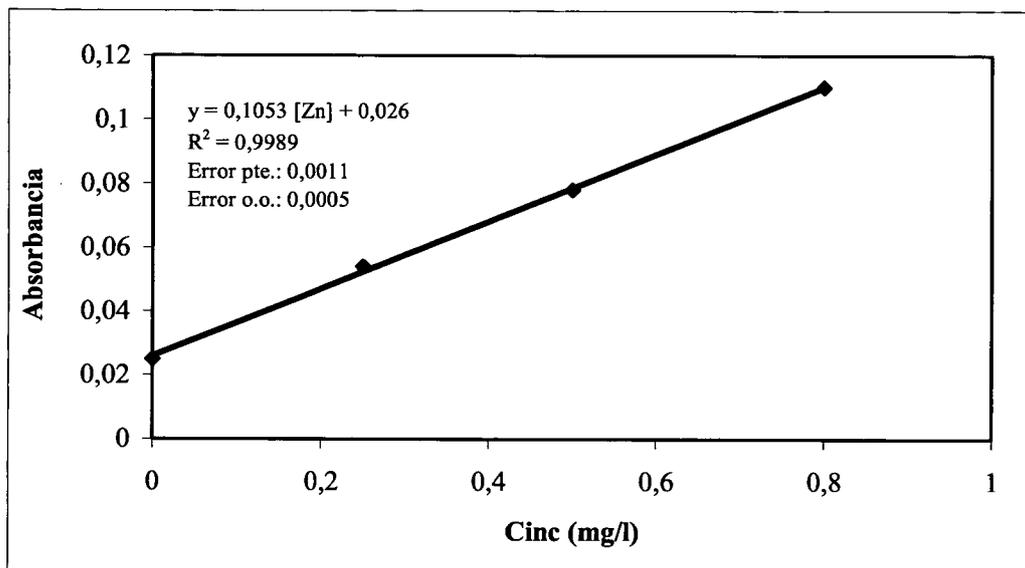


Figura 2.9. Recta de calibrado de adición típica para una muestra de digestión.

2.10 Ensayos en discontinuo

2.10.1 Ensayos de biodegradación aerobia de BTEX

Estos ensayos se realizan en tubos de vidrio Pyrex de 20 mL con tapón de techo de vitón de aproximadamente 4 mm de espesor.

Para la realización de los ensayos se introduce el medio y luego los microorganismos, las cantidades de cada uno han sido de 4,5 mL y 0,5 mL respectivamente. Después ha

sido añadido el contaminante. Para el blanco se esteriliza el medio con los microorganismos. La densidad óptica del inóculo es de 0,3 observándose a una longitud de onda de 660 nm.

Los microorganismos se hacen crecer en medio líquido. Este medio consta de las sustancias mostradas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Composición del medio líquido donde crecen los microorganismos.

Medio	Cantidad
KH ₂ PO ₄	4,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
NH ₄ Cl	2 g
Solución de vitaminas	2 mL
Solución de minerales	2 mL

Estas cantidades son para un litro de agua destilada, elevando esta disolución a un pH entre 5,8-6, siendo este pH el óptimo para su crecimiento.

2.10.2 Ensayos en medio aerobio con fenol

Con la realización de estos ensayos se pretende estudiar la degradación del fenol en medio aerobio y determinar su influencia en el proceso de nitrificación.

Los ensayos se llevan a cabo en viales de 500 mL de volumen total siendo el volumen del ensayo de 100 mL. Los viales se mantienen en un agitador orbital a 200 rpm y a 20 °C. Los lodos procedentes del reactor aerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria productora de resinas sintéticas, son inoculados en los viales con una concentración de 3,5 g SSV/L. Se añade además 10 mL de una disolución de nutrientes cuya composición se especifica en la Tabla 2.2 y 0,05 mL de una disolución de micronutrientes. Con el fin de proporcionar la alcalinidad adecuada y mantener el pH en torno a un valor de 7,5 se añaden 5000 mg/L de alcalinidad como CaCO₃ en total. Para este fin es empleado el NaHCO₃.

Tabla 2.2. Concentración específica de nutrientes.

Compuesto	Concentración (g/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12
KH ₂ PO ₄	0,25
NH ₄ Cl	1,18
NaCl	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,96

Para el estudio de la nitrificación son adicionados en los viales 250 mg N-NH₄⁺/L, aportados por la disolución de nutrientes y por el cloruro amónico añadido. Finalmente es añadido el tóxico, fenol a partir de la disolución madre, de la cual, también se ha realizado el calibrado. A continuación los viales son sellados y se inyecta una sobrepresión de aire (0,25 de presión de salida durante 60 segundos) para asegurar una cantidad suficiente de oxígeno disuelto, necesaria para degradar el fenol y que tenga lugar el proceso de nitrificación. Las concentraciones de N-NO₃⁻ y de fenol se miden a tiempo cero y se sigue su evolución a lo largo del tiempo. La concentración es determinada en el sobrenadante que es recogido tras haber sido centrifugado la muestra durante 5 min a 4000 rpm.

Todos los ensayos son realizados por duplicado y con biomasa esterilizada para controlar que no exista algún tipo de pérdida por volatilización o transformación química. También se ha seguido el control sin introducción de tóxico, con la finalidad de determinar el grado de nitrificación que pueda producir el lodo a emplear.

A continuación se describe la secuencia de los pasos que se han seguido para la puesta en marcha de los ensayos:

- Adición de nutrientes.
- Adición de micronutrientes.
- Adición de lodos.
- Adición del agua de dilución.
- Adición de NaHCO₃.
- Ajuste y medida del pH.

- Medida del oxígeno disuelto.
- Adición de NH_4Cl .
- Adición del contaminante.
- Sellado de los viales.
- Suministro adicional de aire.
- Toma de muestra inicial.
- Introducción de los viales en una cámara termostatzada a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y a 200 rpm.

2.10.3 Ensayo aerobio en un reactor de lodos activos

Para estudiar la biodegradación en continuo del fenol y estudiar su influencia en la nitrificación se ha realizado un ensayo en un reactor de lodos activos en condiciones aerobias. Se ha utilizado el cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y el propio fenol como fuente de carbono.

2.10.3.1 Descripción del equipo

La instalación empleada se corresponde con un sistema típico de lodos activos (Figura 2.10), su construcción se realizó en metacrilato y sus dimensiones se especifican en la Tabla 2.3. En este montaje hay un tanque de aireación donde se produce la oxidación de la materia orgánica y nitrogenada, y un sedimentador posterior donde es producida la separación de las fases líquida y sólida.

Tabla 2.3. Dimensiones del reactor de lodos activos.

Tanque de aireación	Diámetro	$8,5 \cdot 10^{-2}$ m
	Altura	$26 \cdot 10^{-2}$ m
Sedimentador	Diámetro	$6 \cdot 10^{-2}$ m
	Altura	$43 \cdot 10^{-2}$ m
Volumen total (tanque de aireación y sedimentador) 2,1 L		
Volumen efectivo (tanque de aireación y sedimentador) 1,8 L		

La biomasa heterótrofa y nitrificante se encuentra en el tanque de aireación; la alimentación a este tanque se realiza en continuo o mediante una bomba peristáltica. En éste es producido el contacto entre el agua sintética y la biomasa para que así tenga lugar la oxidación de la materia orgánica y nitrogenada. El aire es suministrado mediante una bomba de aireación conectada a un difusor de vidrio poroso situado en el fondo del tanque, de manera que así es asegurada una distribución homogénea del mismo contribuyendo a mejorar el grado de mezcla.

Al sedimentador llega la mezcla lodo-agua tratada en la zona de aireación; en él es producida la decantación del lodo biológico que se separa del agua. En la zona inferior es acumulada la biomasa y por la parte superior sale el agua tratada. El sedimentador secundario asegura una completa clarificación de la misma.

La recirculación de los lodos desde el fondo del sedimentador al tanque de aireación está causada por el arrastre de una corriente de aire que es inyectada en la parte inferior de línea de retorno de lodos, mediante un tubo situado en el interior de la misma. Este proceso está temporizado; la inyección de aire es realizada durante un minuto mediante una bomba conectada a un temporizador permaneciendo parada durante diez minutos. Este proceso mejora la sedimentabilidad de los lodos además de contribuir a optimizar la aireación de la biomasa y el grado de mezcla.

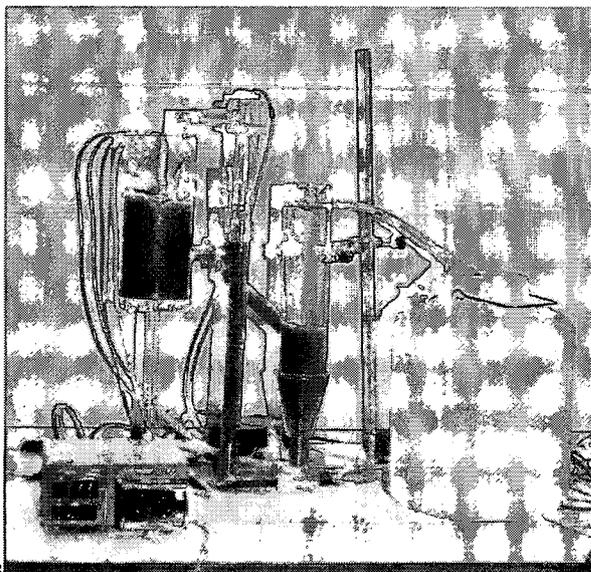


Figura 5.10. Sistema de lodos activos

2.11. Referencias

Amram M.B., Lakkis M.D., Lagarde, F., Leroy M.J.F., López-Sánchez J.F. Rauret G. (1992). Separation of bromide, bromate, iodide, iodate, nitrite, nitrate and selenite anions by capillary zone electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry* 35; 420-423.

APHA-AWWA-WPCF (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20th ed., Washington DC, USA.

Harold M.P., Wojtusik M.J., Riviello J. and Henson P. (1993). Parametres influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* 640; 463-471.

Capítulo 3. Eliminación de alquilbencenos con cepas puras y cultivos mixtos

Capítulo 3. Eliminación de alquilbencenos con cultivos mixtos y con cepas puras.

3.1. Introducción

El benceno y los alquilbencenos son contaminantes comunes en la atmósfera, junto con otros compuestos provenientes de una contaminación por flujo de gases o de bien otros procesos de remediación específicos del suelo. Estos compuestos pueden ser degradados biológicamente (Smith 1990). Además de las tecnologías de tratamiento físico-químico convencionales, las técnicas biológicas han sido optimizadas y desarrolladas muy recientemente para los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) y, en particular, para alquilbencenos como contaminantes atmosféricos obteniéndose unos resultados prometedores (Kennes & Thalasso 1998; Van Groenestijn & Hesselink 1993). En contra de las diferentes alternativas biológicas, la biofiltración es la técnica más ampliamente utilizada principalmente como resultado de la facilidad con la que los reactores pueden ser manejados y desarrollados, y también por ser una tecnología de bajo coste (Kennes & Thalasso 1998; Leason & Winer 1991; Van Groenestijn & Hesselink 1993).

La naturaleza de los sistemas microbianos desarrollados en los biofiltros no ha sido en muchos casos descritos y es escasa la información que ha sido publicada respecto a la caracterización biocatalítica y a la actividad de organismos específicos en los biofiltros. Incluso cuando un reactor se inocula con cultivos puros en la puesta en marcha y dado que los biofiltros operan bajo condiciones no estériles; nuevas cepas no definidas pueden desarrollarse y al final juegan un papel importante que se ha de tener en cuenta (Fritsche & Lechner 1992). De acuerdo con los datos de la bibliografía los microorganismos que se encuentran en mayor proporción en las biopelículas durante el tratamiento de los vapores de los alquilbencenos en los bioreactores pertenecen al género de las *Pseudomonas*, y puede ser debido al crecimiento natural o como resultado de la inoculación inicial (Ergas y col. 1994, 1995; Mirpuri y col. 1997; Pedersen y col. 1997; Vier y col. 1996). Este extenso género también ha sido identificado como un eficiente degradador de compuestos bencénicos en estudios de biorremediación en aguas subterráneas (Álvarez & Vogel 1991; Chang y col. 1993).

Se han publicado características cinéticas de los microorganismos pertenecientes a la biomasa de los biorreactores utilizados para el tratamiento del residuo gaseoso (Pedersen y col. 1997). No se duda de que otras especies microbianas pueden dominar en algunos casos, como especies eucariotas, las cuales fueron encontradas en grandes concentraciones en biofiltros que trataban vapores alquilbencénicos (Páca & Koutský 1994; Veiga y col. 1997). En muchos casos la degradación de los compuestos contaminantes tiene lugar mediante el cometabolismo de varias cepas de microorganismos en vez de una sola clase de microorganismos (Ergas y col. 1994).

El objetivo de este estudio fue caracterizar cinéticamente la degradación de los compuestos orgánicos volátiles provenientes de un biofiltro. Se analizó la composición microbiana a partir de la biocatálisis del biofiltro, además de llevar a cabo la caracterización de su actividad para la determinación de los parámetros cinéticos en los ensayos en discontinuo. También se analizó la influencia que ejercen el pH, las vitaminas y sales minerales sobre el crecimiento y la degradación de los alquilbencenos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. El cultivo microbiano y el medio

El cultivo microbiano no definido empleado originalmente se obtuvo de un biofiltro que operaba con compuestos bencénicos, bajo condiciones de estado estacionario. Los cultivos puros y la mezcla de microorganismos fueron obtenidos después de aislarlos de la mezcla de cultivos no definidos. El crecimiento y los ensayos de biodegradación fueron realizados con un medio mineral sintético, conteniendo los siguientes nutrientes en un litro de agua desionizada: 4,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 2 g NH_4Cl y 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ además de 2 mL de una solución de vitaminas y minerales (Kennes y col. 1996). El medio de cultivo fue esterilizado y las soluciones de minerales y vitaminas fueron añadidas a través de un filtro esterilizado una vez realizada la inoculación del medio. A continuación se introdujo la cantidad necesaria de una mezcla de alquilbencenos para poder alcanzar la concentración de sustrato final.

3.2.2. Inoculación y experimentos de biodegradación

Los viales para los ensayos en discontinuo se mantuvieron en un incubador orbital a 30°C de temperatura y con rotación constante de 200 rpm. Todos los viales fueron inoculados con la misma cantidad de biomasa estimada por la medida de la absorbancia inicial a 660 nm, por el peso seco o por la concentración de proteínas. El consumo del substrato fue seguido por el análisis de las concentraciones de alquilbencenos en muestras gaseosas. La concentración en la fase líquida se determinó utilizando los coeficientes de la ley de Henry para cada compuesto. La velocidad de crecimiento se calculó mediante las medidas de la absorbancia a 660 nm en intervalos de tiempo regulares. Se emplearon controles esterilizados que permitieron comprobar que no se producían degradaciones abióticas. Los experimentos se realizaron por duplicado. El control de la pureza de las cepas puras así como la composición microbiana de la mezcla de las cepas se llevó a cabo mediante observaciones microscópicas y eventualmente realizando cultivos de algunas muestras al final de los experimentos.

Los parámetros cinéticos calculados de los estudios de biodegradación fueron estimados a partir de ensayos realizados con diferentes concentraciones de los alquilbencenos y utilizando el método de las velocidades iniciales de biodegradación. Otros parámetros cinéticos se calcularon a partir de las curvas de crecimiento (μ_{\max} , K_S , K_I).

3.2.3. Métodos Analíticos

Las concentraciones de los alquilbencenos en la fase gas se determinaron por cromatografía gaseosa, apartado 2.6 del capítulo 2. Para comprobar la posible presencia o acumulación de productos de biodegradación se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) empleando un cromatógrafo HP 1100 equipado con una columna C-18, siendo la fase móvil una mezcla metanol:agua a diferentes porcentajes.

La concentración de proteínas fue determinada con el ensayo del agente Coomassie (Pierce, USA) después de hervir durante 10 minutos en una solución de NaOH 1M. Como standard se empleó suero de albúmina bovino.

La determinación del peso seco se realizó mediante la filtración del medio a través de un filtro de 0,22 μm y dejando éste una noche en una estufa a 105°C o hasta alcanzar un peso constante. El crecimiento celular fue seguido mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer de radiación UV/V.

3.3. Resultados

3.3.1. Crecimiento y cinética de degradación con cultivos mixtos

Para realizar el estudio se ha empleado una mezcla de los contaminantes tolueno, etilbenceno y *o*-xileno en la misma proporción. Los microorganismos que se han llegado a identificar como *Trichosporon beigelii*, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. fueron estudiados para calcular la máxima velocidad de degradación obtenida con el cultivo mixto no definido y con el cultivo mixto definido de una muestra tomada de un biofiltro fueron respectivamente 0,80 y 0,82 mg/L·h de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno (TEX), comenzando todos los ensayos con la misma concentración de biomasa. Estos resultados se obtuvieron en un medio acuoso y a un pH de 5,8, el cual fue aproximadamente el pH de partida en los experimentos con el reactor de biofiltración, de donde se obtuvieron los microorganismos. Estos datos demuestran que, desde el punto de vista cinético, el cultivo mixto no definido y el cultivo mixto definido eran de características similares. Las velocidades máximas de biodegradación para el tolueno, etilbenceno y el *o*-xileno fueron para el cultivo definido 0,91, 0,87, y 0,60 mg/L·h respectivamente, y observándose que el *o*-xileno fue el compuesto más lento en degradarse como puede observarse en la Figura 3.1, esto también puede corroborarse con los datos de la biofiltración debido a que el *o*-xileno fue el primer contaminante en ser detectado en el efluente cuando el reactor trabajaba con sobrecargas de sustrato (Kennedy y col. 1996). Las velocidades de degradación para el tolueno y el etilbenceno fueron parecidas en todos los viales empleados para el estudio. En los ensayos de control no se detectó una degradación significativa de los contaminantes. Se obtuvieron resultados parecidos con la mezcla de los tres microorganismos definidos, dos bacterias y un hongo.

Para comparar los datos cinéticos de los ensayos en discontinuo se calculó la velocidad específica máxima de consumo de sustrato de los resultados obtenidos con los ensayos

en discontinuo, alcanzándose los $0,62 \text{ mg}_{\text{TEX}}/\text{h}\cdot\text{mg}_{\text{protein}}$. Considerando que la capacidad máxima de eliminación del biofiltro utilizado para el tratamiento de la mezcla de TEX corresponde a $70 \text{ g}_{\text{protein}}/\text{m}^3\cdot\text{h}$ y, tomando como cantidad la concentración media de proteína del biofiltro (Kennes y col. 1995), es posible estimar la actividad microbiana teórica esperada o bien la velocidad de biodegradación en discontinuo basados en los experimentos de biofiltración. La última velocidad debería ser $0,10 \text{ mg}_{\text{TEX}}/\text{h}\cdot\text{mg}_{\text{protein}}$, la cual es mucho más baja que el valor obtenido experimentalmente con los ensayos en discontinuo.

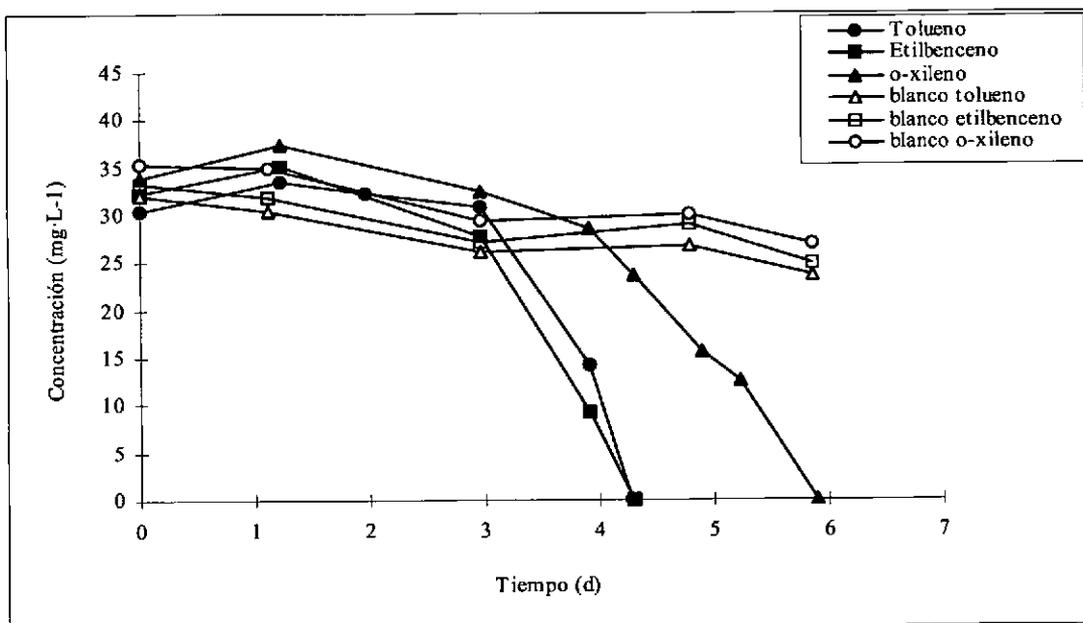


Figura 3.1. Degradación de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno con una cepa definida de microorganismos.

3.3.2. Crecimiento y cinética de biodegradación con cultivos puros

En este trabajo se realizó el estudio con las cepas aisladas de la mezcla definida de microorganismos. Las velocidades de biodegradación observadas a pH 5,8 con las dos cepas dominantes, es decir, la especie *Bacillus* y *Pseudomonas*, se encuentran reflejadas en la Tabla 3.1. Estos estudios cinéticos también tenían otra finalidad, ésta era la de permitir comparar los valores de μ_{max} , K_S y K_I de ambas especies bacterianas. El modelo de inhibición por sustrato propuesto por Haldane (Andrews 1968; Haldane 1930) fue empleado para calcular la constante de inhibición aparente (K_I) empleando la ecuación 3.1:

$$\mu = \mu_{\text{max}} \left(\frac{S}{K_S + S + (S^2 / K_I)} \right) \quad \text{Ec. 3.1}$$

Tala 3.1. Parámetros cinéticos de las cepas aisladas dominantes de la biocatálisis a pH 5,8.

	<i>Especies microbianas</i>		
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Trichosporon</i>
Velocidad de biodegradación (mg/L·h)	0,85	0,72	No obtenido con el cultivo puro
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,18	0,12	
K _S (mg/L)	18,9	18,0	
K _I (mg/L)	161,2	117,5	
Y _{X/S} (max) (g/g)	0,55	0,38	

Como aparece en la Tabla 3.1, los valores de K_S son similares para ambas especies bacterianas aunque la especie *Bacillus* parece tener una ligera mayor afinidad por el sustrato. Por otro lado, la velocidad de crecimiento máxima de *Pseudomonas* a pH 5,8 es de 1,5 veces mayor que la observada para la especie *Bacillus*, lo cual parece lógico cuando comparamos globalmente las velocidades de degradación (Tolueno + etilbenceno + xileno), las cuales son mayores para la especie *Pseudomonas*, aunque la diferencia entre ambos microorganismos no es tan grande como para sus μ_{\max} . Las constantes de inhibición para ambas especies bacterianas alcanzaron los valores de 161,2 mg/L y 117,5 mg/L, *Pseudomonas* y *Bacillus* respectivamente.

Las Figuras 3.2 y 3.3 representan las curvas típicas de biodegradación para ambas especies bacterianas. Las gráficas reflejan información relevante sobre el proceso y las características de biodegradación de cada una de las especies dominantes. Aunque la especie *Bacillus* es capaz de degradar completamente a los alquilbencenos estudiados, la especie *Pseudomonas* degrada completamente a los contaminantes tolueno y etilbenceno pero al *o*-xileno lo degrada parcialmente. La razón de la acumulación de una fracción de la concentración inicial del *o*-xileno de esta especie es desconocida, aunque se debe mencionar que el crecimiento microbiano disminuye e incluso se para, mientras la degradación del *o*-xileno todavía continúa. La formación o acumulación de productos de biodegradación inhibitorios por parte de las cepas no fue detectada con los análisis por cromatografía líquida.

La degradación del tolueno y del *o*-xileno por la especie *Pseudomonas* viene precedida por una fase de letargo, sin embargo la degradación del etilbenceno comienza casi inmediatamente después de la inoculación independientemente de la concentración inicial del contaminante, la concentración más alta estudiada de los compuestos

orgánicos volátiles ha sido de 200 mg/L. La especie *Bacillus* siempre degrada el tolueno ligeramente con mayor velocidad que el etilbenceno, mientras que lo contrario se observa para el caso de la especie *Pseudomonas*.

Con respecto al rendimiento, la cantidad de biomasa producida con la especie *Pseudomonas* en presencia de los alquilbencenos estudiados es mayor que con la especie *Bacillus*.

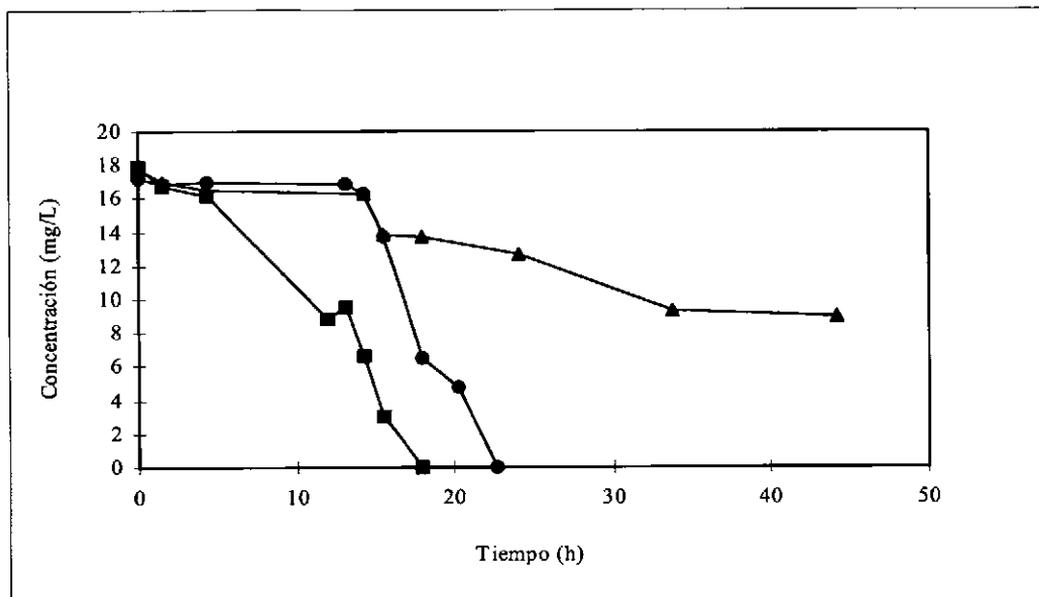


Figura 3.2. Degradación típica de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno correspondiente a la especie *Pseudomonas*.

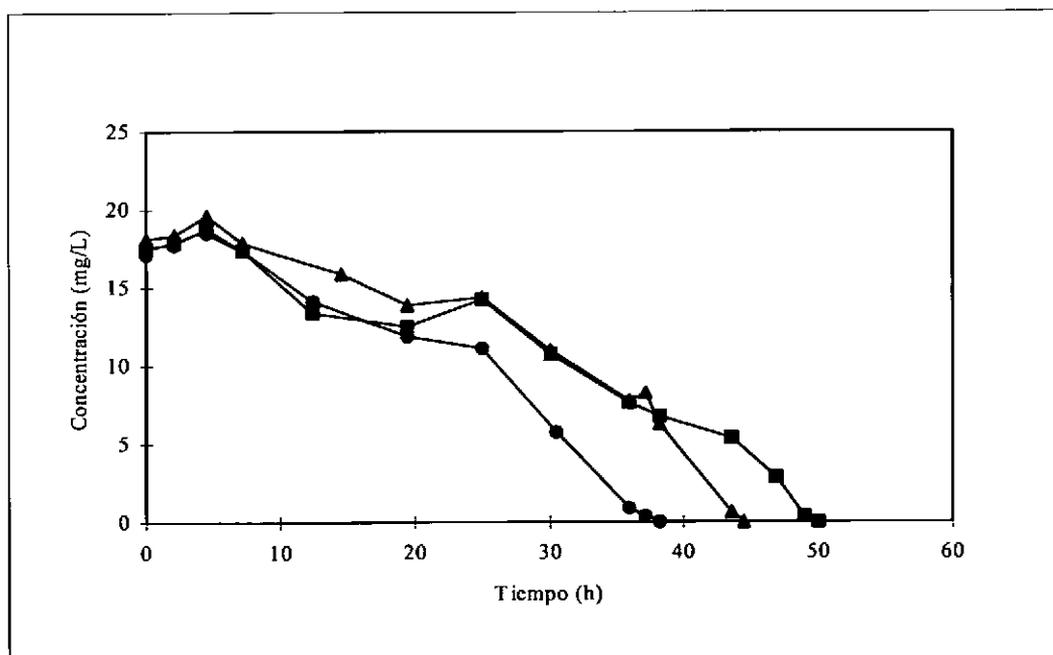


Figura 3.3. Degradación típica de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno correspondiente a la especie *Bacillus*.

3.3.3. Influencia del pH y de las vitaminas/minerales traza sobre el crecimiento y sobre las eficacias de degradación

De los datos del estudio con el biofiltro donde la acidificación del lecho del biofiltro fue observado sistemáticamente, con variaciones del pH en el rango de 4 a 6, se esperaba que las bacterias aisladas pudieran ser eficaces en la degradación de los contaminantes derivados del benceno a valores de pH bastante ácido. Por lo tanto, se estudió la influencia de este parámetro tanto sobre las velocidades de biodegradación como su influencia en el crecimiento bacteriano. Se han realizado experimentos en el rango de pH entre 1,5 a 7,0. En el rango de pH entre 4-6, la especie *Trichosporon* fue gradualmente absorbida por las otras dos especies bacterianas en los ensayos en discontinuo. Ambas especies bacterianas fueron capaces de crecer en un medio de pH 3,5 pero sólo la mezcla de ambas especies creció y degradó la mezcla de alquilbencenos a un pH de 2,5. A pH de 1,5 la biodegradación de la mezcla de alquilbencenos no pudo llevarse a cabo, excepto cuando se emplearon muestras de la biopelícula, la cual permitía degradar lentamente el substrato, lo que puede significar que probablemente al menos una especie microbiana no identificada pudiera estar presente en la biocatálisis original, aunque no prevalezca dominante en la muestras de biopelículas bajo condiciones menos ácidas y/o que relaciones tróficas (por ejemplo, liberación de algunos factores de crecimiento, etc.) deben de jugar un papel en la biopelícula. A pH 1,5, la biodegradación tuvo lugar después de unos días de fase de letargo.

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de las velocidades de crecimiento específico de las bacterias *Pseudomonas* y *Bacillus* en presencia de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno. Desde que el medio fue tamponado, las fluctuaciones de pH durante el transcurso de los experimentos fueron casi inexistentes y siempre menores de 0,2 unidades respecto del ajuste del valor de pH inicial. Aunque la especie *Pseudomonas* presenta una velocidad de crecimiento específico mayor que la especie *Bacillus* a un pH casi neutro o en un medio ligeramente ácido las diferencias entre la μ_{\max} de ambas especies bacterianas disminuye gradualmente cuando disminuye el pH del medio. El valor de μ_{\max} para la especie *Bacillus* a pH 3,5 fue incluso mayor que para la especie *Pseudomonas*.

Tabla 3.2. Velocidades máximas de crecimiento específico (h^{-1}) de las dos especies bacterianas dominantes a diferentes pH.

pH	<i>Especies bacterianas</i>	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
7,0	0,20	0,13
5,8	0,18	0,12
4,5	0,15	0,10
3,5	0,07	0,09
2,5	Inapreciable	Inapreciable

El otro trabajo ha sido ver la influencia de las vitaminas y las sales minerales traza. Los ensayos de biodegradación en discontinuo se llevaron a cabo mediante una mezcla definida de los microorganismos y con las concentraciones de vitaminas y de sales minerales traza recomendados en la bibliografía y detallada en el apartado de Materiales y Métodos. Los mismos ensayos se desarrollaron bajo las condiciones siguientes:

- i) Diluyendo la solución de vitaminas y minerales en un factor de 20.
- ii) Sin diluir la solución de vitaminas y diluyendo la solución de minerales en un factor de 20.
- iii) Diluyendo las vitaminas en un factor de 20 y sin diluir la solución de minerales traza.
- iv) Agua de grifo.

La observación para todos los estudios de biodegradación fue similar, la velocidad de degradación obtenida resultó ser de $0,80 \pm 0,07$ mg/L·h, encontrándose que la cantidad de vitaminas y sales minerales podía ser reducida drásticamente, manteniendo incluso las mismas altas velocidades de degradación, por ejemplo, la capacidad de eliminación, permitiendo así disminuir los costes de operación del biofiltro.

3.4. Discusión

Dos bacterias han sido las dominantes en el proceso de biodegradación con cepas mixtas, la especie *Pseudomonas* y la especie *Bacillus*, crecieron con mayor eficacia en la presencia de la mezcla de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno que las otras tres especies en un medio ligeramente ácido y en condiciones de trabajo en discontinuo. Ambas

especies bacterianas son capaces de crecer y degradar a una velocidad significativa en un medio de rango de entre unos 3,5-7,0, las cuales incluyen las variaciones de pH entre 4-6 observadas en el estudio de biofiltración (Kennes y col. 1996), aunque sólo la mezcla de las cepas puras así como el la mezcla de las especies no definidas mostraron un crecimiento y unas velocidades de degradación significativas a valores de pH por debajo de 2,5, determinando la importancia de las relaciones tróficas entre los diferentes microorganismos, principalmente bajo condiciones extremas. Las características cinéticas de las especies dominantes se han mostrado en la Tabla 3.1. El valor de K_S para ambas especies fue bastante similar, siendo la diferencia significativa entre las especies el valor de μ_{max} . Aunque la especie *Pseudomonas* presenta un valor de μ_{max} mayor que a un pH próximo a un pH neutro, la velocidad máxima de crecimiento específico se encuentra por debajo de la especie *Bacillus* cuando el pH del medio se acidifica, lo cual explica que la especie *Bacillus* compita con la especie *Pseudomonas* en el biofiltro. Además la especie *Bacillus* puede crecer mejor en presencia del compuesto más recalcitrante de los estudiados, el xileno. Desde el punto de vista tecnológico, la especie *Bacillus* representa la mejor especie como cepa pura para ser inoculada en un biofiltro debido a que es capaz de degradar completamente los compuestos estudiados y se caracteriza además por un bajo rendimiento de biomasa aunque presenta unas velocidades de biodegradación más bajas que la especie *Pseudomonas*.

Los valores de μ_{max} obtenidos en este trabajo han sido similares tendiendo a ser más bajos que los determinados por otros autores (Alonso y col. 1997; Choi y col. 1992; Elmén y col. 1997; Pedersen y col. 1997; Wübker y col. 1997), con especies bacterianas diferentes y empleando al tolueno u otros compuestos alquilbencénicos como sustrato. Los valores de K_S que otros autores obtuvieron se encontraban en el rango de 2-6 mg/L, los cuales son más bajos que los obtenidos en este estudio, que fueron de 18 y 18,9 mg/L. Sin embargo, un valor mayor de K_S de 0,38 mM fue publicado para una cepa denominada *Azoarcus toluolyticus* que crecía con tolueno y con nitrato como el aceptor de electrones (Elmén y col. 1997). Los autores publicaron un valor de K_1 de 1,3 mM similar a 117,5 y 161,2 mg/L, los cuales obtuvimos en el trabajo presentado, y unos valores más bajos que los publicados por Choi y sus colaboradores en 1992, el cual ha sido de 1,98 g/L.

Para determinar si las bacterias aisladas puras o la mezcla de ambas son representativas de la biocatálisis observada en el tratamiento de biofiltración, las velocidades de degradación obtenidas con la mezcla de microorganismos definida en los ensayos en discontinuo en presencia de un medio acuoso definido, se comparó con los datos observados con los ensayos de la fase gaseosa de los biofiltros. Al comparar los resultados las velocidades de degradación fueron mayores en los ensayos en discontinuo cuando se trabajó con la mezcla de las cepas que en los biofiltros. Esto no es algo nuevo, ya que observaciones similares las obtuvieron Arcangeli & Arvin (1992) y Pedersen *y col.* (1997) para el caso de la degradación del tolueno. La conclusión ha sido que parte de la biomasa en los biorreactores estuvo probablemente más inactiva, lo que parece haber ocurrido en este trabajo. Sin embargo debe puntualizarse que hay otros factores que han influido, por ejemplo en los ensayos en discontinuo se empleó una mezcla casi perfecta de cepas microbianas y no casi perfectamente mezcladas en la fase gas de los biofiltros. Otro parámetro importante ha sido la caída del pH, porque se ha mantenido casi tamponado en los ensayos en discontinuo así como el exceso de vitaminas y de sales minerales en los ensayos en discontinuo.

3.5. Conclusiones

- En los ensayos llevados a cabo las especies bacterianas *Bacillus* y *Pseudomonas* crecieron en presencia de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno, en un medio ácido. Aunque el pH óptimo de crecimiento sea de 6, las especies pueden crecer en una amplia gama de pH (entre 2,5-6). Esto es interesante para poder inocular biorreactores en continuo donde puede tener lugar una acidificación del medio.
- Se determinaron las constantes cinéticas de las especies *Bacillus* y *Pseudomonas*. El valor de K_S calculada ha sido similar, diferenciándose las especies en el valor máximo de crecimiento (μ_{max}).
- La especie *Bacillus* creció mejor que la especie *Pseudomonas*, en presencia del compuesto más recalcitrante, el xileno, siendo más interesante esta cepa pura a la hora de inocular un biofiltro, por ser capaz de degradar completamente al tolueno, etilbenceno y *o*-xileno.

- *Se obtuvieron mayores velocidades de degradación en los ensayos en discontinuo que en el biofiltro.*

3.6. Referencias

Alonso C, Sudan MT, Sorial GA, Smith FL, Biswas P, Smith PJ and Brenner RC (1997). Gas treatment in trickle-bed biofilters biomass, how much is enough? *Biotechnology and Bioengineering* 54; 583-594.

Álvarez PJJ and Vogel TM (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 57; 2981-2985.

Andrews JF (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 10; 707-723.

Arcangeli JP and Arvin E (1992). Toluene biodegradation and biofilm growth in an aerobic fixed film reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37; 510-517.

Chang M-K, Voice TM and Criddle CS (1993). Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering* 41; 1057-1065.

Choi Y-B, Lee J-Y and Kim H-S (1992). A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 40; 1403-1411.

Elmén J, Pan W, Leung SY, Magyarosy A and Keasling JD (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnology and Bioengineering* 55; 82-90.

Ergas SJ, Kinney K, Fuller ME and Scow KM (1994). Characterization of a compost biofiltration system degrading dichloromethane. *Biotechnology and Bioengineering* 44; 1048-1054.

Ergas SJ, Schroeder ED, Chang DPY and Morton RL (1995). Control of volatile organic compound emissions using a compost biofilter. *Water Environment Research* 67; 816-821.

Fritsche K. and Lechner U. (1992). Einsatz eines chlorphenolverwertenden Bakterienstammes zur Abluftreinigung im Biofilter. In: Dragt AJ & van Ham J (Eds) *Biotechniques for Air Pollution Abatement and Odour Control Policies*, (pp 287-292). Elsevier, Amsterdam.

Haldane JBS (1930). *Enzymes*. Longmans, London.

Kennes C, Cox H, Veiga MC and Doddema W (1995). Continuous removal of benzene related compounds from waste gases. *Med. Fa. Landbouww. Gent.* 60; 2279-2284.

Kennes C, Cox HHJ, Doddema HJ and Harder W (1996). Design and performance of biofilters for the treatment of alkylbenzene vapors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66; 300-304.

Kennes C and Thalasso F (1998). Waste gas biotreatment technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 72; 303-319.

Leson G and Winer AM (1991). Biofiltration: An innovative air pollution control technology for VOC emissions. *Journal of the Air and Waste Management Association* 41; 1045-1054.

Mirpuri R, Jones W and Bryers JD (1997). Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnology and Bioengineering* 53; 535-546.

Páca J and Koutsky B (1994). Performance characteristics of a biofilter during xylene and toluene degradation. *Med. Fa. Landbouww* 59; 2175-2184.

Pedersen AR, Moller S, Molin S and Arvin E (1997). Activity of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in the airly growth phase of a biofilm for waste gas treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 54; 131-141.

Smith MR (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacterial. *Biodegradation* 1; 91-206.

Van Groenestijn JW and Hesselink PGN (1993). Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation* 4; 283-301.

Veiga MC, Fraga M, Amor L and Kennes C (1997). Microbial and kinetic characteritiation of biofilters degrading alkylbenzene vapors under acidic conditions. In: Verachtert H. and Verstraete W. "Eds" *International Symposium Enviromental Biotechnology* (pp 185-188). TIV, Ostende, Bélgica.

Veir JK, Schroeder ED, Chang DPI and Scow KM (1996). Interaction between toluene and dichloromethane degrading populations in a compost biofilter. 89th Annual Meeting and Exhibition Air and Waste Management Assotiation, Nasville, USA.

Wübker S-M, Laurenzis A, Werner U and Friedrich C (1997). Controlled biomass formation and kinetics of toluene degradation in a bioscrubber and in a reactor with a periodically moved triple-bed. *Biotechnology and Bioengineering* 55; 686-692.

Capítulo 4. Cinética de inhibición en la biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos en presencia de metales pesados

Capítulo 4. Cinética de inhibición en la biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos en presencia de metales pesados

4.1. Introducción

Los compuestos orgánicos volátiles (COV), los cuales incluyen los derivados alquilados del benceno, tal como el tolueno, etilbenceno y los xilenos son contaminantes comunes del medio ambiente. Estos compuestos aparecen en efluentes gaseosos y acuosos de muchas industrias, así como en suelos contaminados y aguas subterráneas. Como resultado de su presencia en tales ecosistemas, presentan un serio peligro para la salud humana. Existen diferentes alternativas para la eliminación de los COV. Estas alternativas incluyen tratamientos físicos, químicos y tecnologías de tratamiento biológico. El último tratamiento se caracteriza por su bajo coste. Los procesos biológicos al mismo tiempo minimizan el impacto ambiental y la contaminación residual (Kovalick, 1991; Kovalick, 1992; Skinner, 1991).

Algunos sistemas presentan además de compuestos orgánicos volátiles, metales pesados como el cadmio, cinc y níquel, por eso ha recibido una atención especial el estudio de la toxicidad y el efecto inhibitorio de estos metales sobre el crecimiento bacteriano. La contaminación por iones metálicos puede inhibir a microorganismos que son los encargados de la degradación de los compuestos orgánicos y afectar a las velocidades de degradación. El nivel de inhibición dependerá de la concentración y disponibilidad de los metales pesados y es dependiente de la acción de procesos complejos controlados por múltiples factores incluyendo la naturaleza de los metales, del medio y de las especies microbianas (De Rore y col., 1994; Goblenz y col., 1994; Hashemi y col., 1994; Olasupo y col., 1993; Tomioka y col., 1994). Los metales pesados inhiben a los microorganismos bloqueando grupos funcionales esenciales o interfiriendo con iones metálicos esenciales por la incorporación en moléculas biológicas (Doelman y col., 1994; Gadd y Griffiths, 1978; Li y Tan, 1994 a,b; Wood y Wang, 1983). En algunos casos los microorganismos son resistentes a algunos metales pesados a través de diferentes mecanismos posibles (Rohit y Sheela, 1994; Tomioka y col., 1994). En los últimos años se ha estudiado el efecto de los metales pesados sobre el crecimiento bacteriano (Benka-Coker y Ekundayo, 1998; Cabrero y col., 1998; Hassen y col., 1998

a,b) pero pocos trabajos han sido publicados sobre su efecto en la degradación de los COV o en el modelaje de sus efectos a través de una ecuación cinética simple y clásica.

El objetivo de este estudio fue evaluar y modelar el efecto de diferentes concentraciones de metales pesados, el cadmio, cinc y níquel sobre la degradación del tolueno, etilbenceno y *o*-xileno con una cepa bacteriana pura, del género *Bacillus*. Los experimentos también han sido llevados a cabo con una cepa de *Pseudomonas* sp. para poder confirmar con una cepa bacteriana diferente de la *Bacillus* sp. que hubo una buena correlación entre la ecuación cinética seleccionada y los datos experimentales.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Crecimiento bacteriano y el medio

Las especies bacterianas empleadas en el estudio fueron obtenidas de un biofiltro que trataba aire contaminado con compuestos orgánicos volátiles (Kennes y col., 1996). Las bacterias crecieron en un medio líquido y se adaptaron a los compuestos orgánicos y a las condiciones de trabajo antes de pasar a los ensayos de biodegradación. La mezcla de alquilbencenos (tolueno, etilbenceno y *o*-xileno) de riqueza superior al 99 % se emplearon como única fuente de carbono. Los ensayos de degradación se llevaron a cabo en erlenmeyers de 500 ml introduciendo 5 ml de medio acuoso en 50 ml de agua cerrados completamente con tapas de vitón.

Los microorganismos crecieron en un medio de pH 5.9 ± 0.1 conteniendo 4.5 g/L de KH_2PO_4 ; 0.50 g/L de K_2HPO_4 ; 2 g/L de NH_4Cl y 0.10 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El medio también incluye vitaminas y minerales traza. El medio y los materiales fueron esterilizados mediante el uso de un autoclave a una temperatura de 120 °C durante el período de 20 min, a excepción de las vitaminas y los minerales que se introdujeron a través de un filtro estéril cuando el medio se encontraba a temperatura ambiente. Las bacterias se inocularon bajo condiciones estrictamente estériles. A continuación se incubaban en un termostato de agitación continua a una temperatura de $30 \text{ °C} \pm 1^\circ\text{C}$. Durante el proceso experimental los erlenmeyers se mantuvieron en la oscuridad con una agitación constante de 200 rpm. Por último eran introducidos los metales pesados y los compuestos orgánicos volátiles.

Durante los ensayos, las muestras fueron analizadas periódicamente y se realizaron ensayos por duplicado para comprobar la variabilidad de los resultados. Se prepararon así mismo ensayos de control conteniendo el mismo medio que para los ensayos, inoculándolos y a continuación esterilizándolos en el autoclave, e introduciendo una concentración de tolueno, etilbenceno y de *o*-xileno conocida; a la vez también se prepararon blancos esterilizados pero sin contener biomasa para comprobar la inexistencia de efectos abióticos de pérdida de los contaminantes y para comprobar la precipitación de los metales pesados en ausencia de biomasa.

4.2.2. Métodos analíticos

Los alquilbencenos fueron analizados empleando la técnica de cromatografía gaseosa con un detector de ionización de llama, según se describió en el apartado 2.6 del Capítulo 2. Las concentraciones de los alquilbencenos en la fase líquida fueron calculadas de acuerdo a la ley de Henry, existiendo un equilibrio entre las fases líquida y gaseosa. Los metales al poder precipitar con el medio empleado en estos ensayos, la concentración inicial se comprobó mediante el uso de la espectrofotometría de absorción atómica, técnica descrita en el apartado 2.9 del Capítulo 2.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Efecto de los metales pesados sobre la biodegradación de los alquilbencenos

Antes de realizar este estudio, se han realizado una serie de ensayos preliminares para evaluar el rango de concentración de los metales más adecuado. Las concentraciones de los metales añadidos en los ensayos han estado comprendidos entre los siguientes valores:

- Zn 0,04-0,47 mM
- Ni 0,4-2,2 mM
- Cd 0,33-2,5 mM.

Aunque las concentraciones analizadas variaron en función del tipo de alquilbenceno y de la cepa microbiana.

En la Figura 4.1 se muestran las curvas típicas de degradación de los alquilbencenos para las especies *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. en ausencia de los metales pesados. Según los resultados obtenidos resulta aparente que ambos cultivos fueron capaces de degradar los compuestos aunque el isómero de xileno, el *o*-xileno, fue mínimamente degradado por la especie *Pseudomonas* sp. Cuando los experimentos se iniciaron con la mezcla de los tres compuestos estudiados, es decir, tolueno, etilbenceno y el *o*-xileno, a la misma concentración, la especie *Bacillus* degradó inicialmente el tolueno, seguido del etilbenceno y finalmente el *o*-xileno.

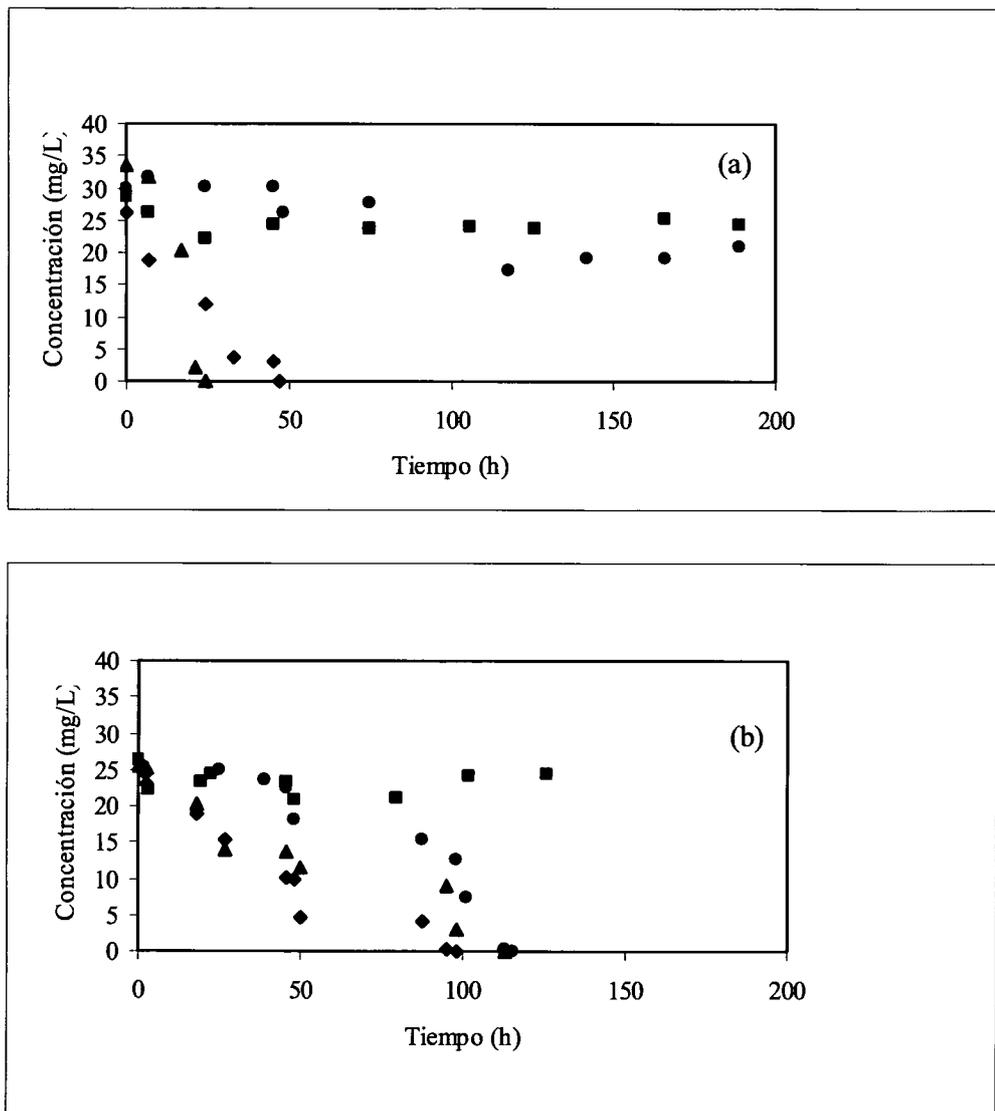


Figura 4.1. Perfiles de biodegradación del Tolueno (◆), etilbenceno (▲) y *o*-xileno (●) para: (a) *Pseudomonas* sp. y (b) *Bacillus* sp. En ausencia de metales pesados. Se muestra el control para el componente del tolueno en representación de los demás contaminantes (■).

Recíprocamente las *Pseudomonas* degradaron inicialmente el etilbenceno, luego el tolueno y finalmente el isómero del xileno. Las concentraciones de los alquilbencenos se mantuvieron constantes en el control.

Así como la biodegradación de los alquilbencenos por especies *Pseudomonas* ha sido referenciada en diferentes trabajos varias veces (Chang y col., 1993; Choi y col., 1992; Pedersen y col., 1997) los datos disponibles para la especie *Bacillus* son bastante escasos (Natarajan y col., 1994; Uma y Sandhya, 1998). Así mismo el efecto recalcitrante de los isómeros del xileno en la mezcla de los alquilbencenos ha sido observado previamente (Álvarez y Vogel, 1991; Anid y col., 1993).

Existen estudios que exponen que un compuesto aromático puede inhibir la biodegradación de otro compuesto aromático, cuando hay más de un COV presente en el medio. Evans y col. (1991) observaron que la degradación del *o*-xileno estaba relacionada y dependía del metabolismo del tolueno. Chang y col. (1993) mostraron que el tolueno ejerce un mayor efecto sobre la degradación del *p*-xileno que el *p*-xileno sobre la degradación del tolueno utilizando bacterias de la especie *Pseudomonas* sp. Tal fenómeno de inhibición puede ocurrir también con los metales pesados como el cadmio, níquel y cinc. Un ejemplo de niveles de inhibición en la biodegradación del tolueno, etilbenceno y *o*-xileno obtenidos con *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. en presencia de los diferentes metales pesados se muestran en las Figuras 4.2 y 4.3. En todos los casos las velocidades de eliminación fueron mayores cuando el metal no se encontraba presente en el medio, observándose el efecto inhibitorio de los metales pesados sobre la biodegradación de los COV incluso a bajas concentraciones. Estos resultados indicaron que la biodegradación de compuestos aromáticos estuvo parcialmente inhibida a concentraciones de metales pesados relativamente bajas. Sin embargo, otras investigaciones (Hassen y col., 1998b) estudiando la influencia de metales pesados sobre la velocidad de crecimiento observaron que el cinc a concentraciones entre 0,05 y 0,2 mM no ejercían efectos substanciales sobre el crecimiento de la especie *Bacillus thuringensis*. En otro estudio (Hassen y col., 1998a) encontraron que la velocidad de crecimiento de muchas especies que toleran el cadmio no era significativamente afectada por concentraciones de cadmio por debajo de 1,5 mM. Estos autores examinaron muchas cepas puras incluyendo la *Bacillus thuringensis*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella rhinoscleromatis*,

Citrobacter freundii y la *Escherichia Coli* K12 y observaron que la cepa más tolerante era la especie *Pseudomonas aeruginosa*. En el presente estudio la inhibición sobre la eliminación de derivados del benceno apareció a bajas concentraciones, independientemente del alquilbenceno utilizado.

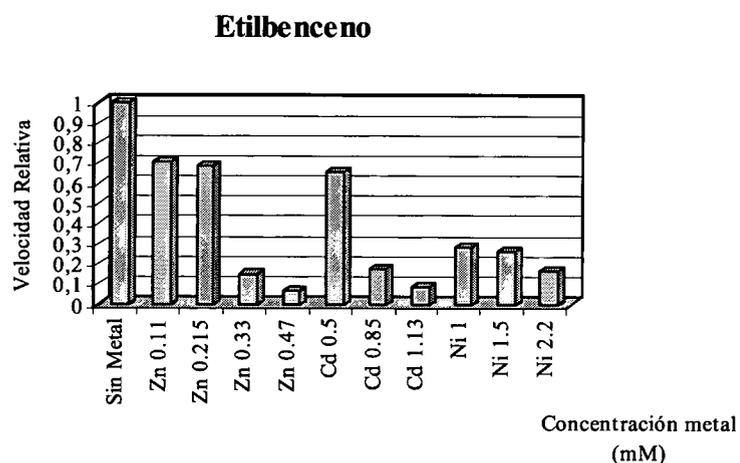
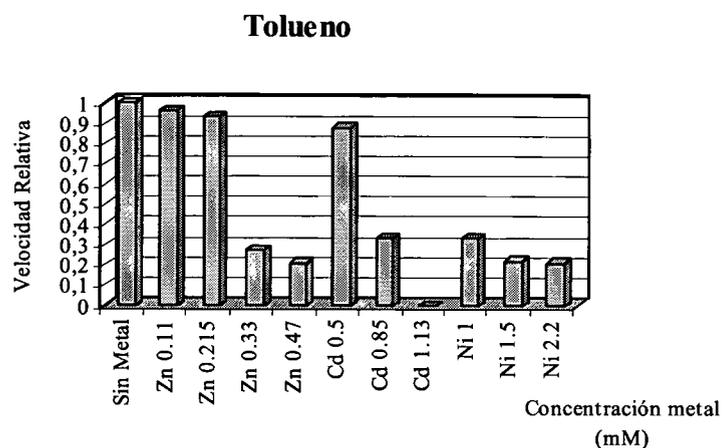


Figure 4.2. Niveles de inhibición de la biodegradación de los alquilbencenos para la especie *Pseudomonas* con y sin metales, tomando como referencia los datos obtenidos sin presencia de metales (sin inhibición).

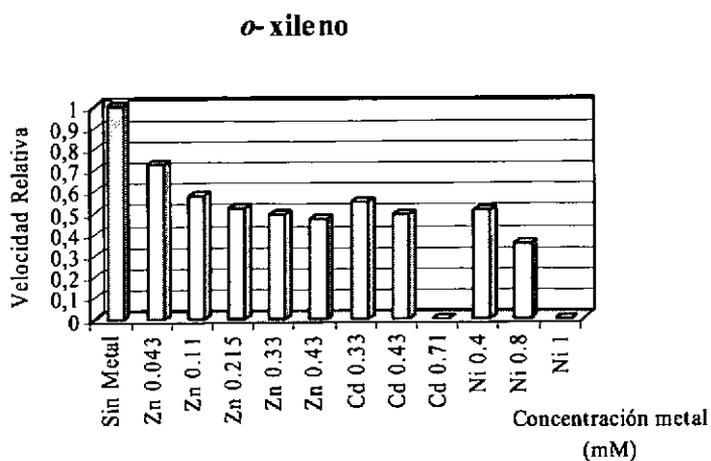
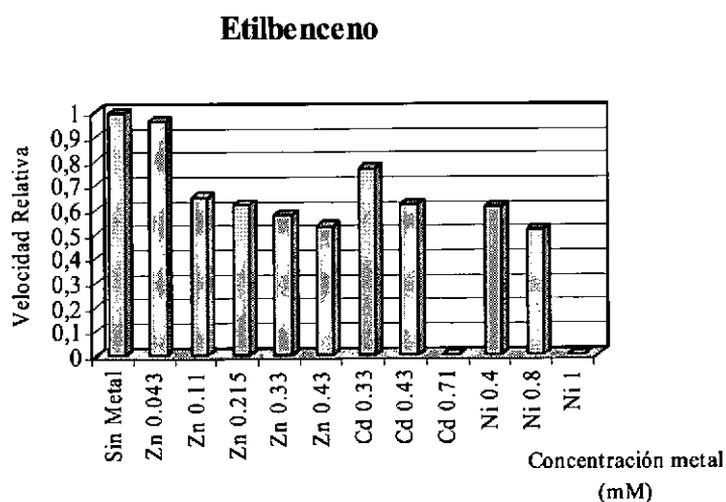
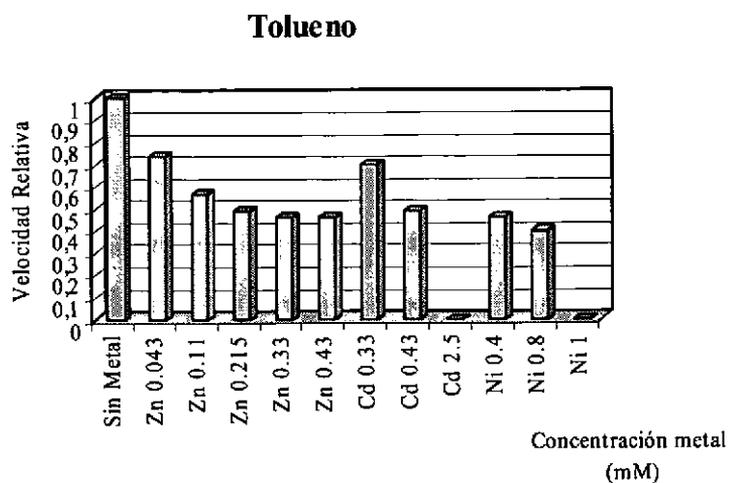


Figure 4.3. Niveles de inhibición de la biodegradación de los alquilbencenos para *Bacillus* sp. con y sin metales, tomando como referencia los datos obtenidos sin presencia de metales (sin inhibición).

La inhibición a tales concentraciones o incluso a más bajas fue también observada por Benka-Coker y Ekundayo (1998). El níquel pareció ser el menos tóxico de los tres metales pesados estudiados. Esto está en concordancia con otros estudios recientes mostrando que a bajas concentraciones el níquel no fue tóxico y mejora realmente la velocidad de crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias tanto aerobias como anaerobias (Dilek y col., 1998; González-Gil y col, 1999). El cinc manifestó la mayor toxicidad y fue el único metal pesado que mostró una inhibición parcial para concentraciones cerca de 0,05 mM. También ha sido observado que el cinc causa inhibición en la especie *Pseudomonas* sp. en concentraciones por debajo de 0,01 mM (Benka-Coker y Ekundayo, 1998).

4.3.2. Modelo cinético de la degradación del tolueno, etilbenceno y o-xileno en presencia de metales pesados

Las especies capaces de crecer con COV suelen tener cinéticas de crecimiento de primer orden o de orden cero dependiendo de la concentración de sustrato, el cual se puede modelizar usando la ecuación de Monod. Si se observa inhibición a altas concentraciones de COV se debe añadir un término adicional de inhibición dando lugar a una nueva ecuación (Andrews, 1968).

Otros compuestos que no son fuentes primarias de carbón pueden también afectar al crecimiento o a las velocidades de biodegradación. En ese sentido los metales pesados a menudo son añadidos a bajas concentraciones en la forma de solución de metales traza al medio de cultivo microbiano para mantener o estimular el crecimiento bacteriano. El cinc y el níquel son también componentes de muchos enzimas bacterianos. Por lo tanto no sería una sorpresa observar que las velocidades de crecimiento y de consumo de sustrato varían con las concentraciones de los metales pesados, los cuales podrían presentar un efecto favorable o un efecto inhibitorio dependiendo de su concentración. El níquel, por ejemplo, se sabe que favorece o estimula la actividad de algunas bacterias anaerobias bajo determinadas condiciones de cultivo (González-Gil y col., 1999) mientras que a elevadas concentraciones produce la inhibición (Lin and Chen, 1997). Un comportamiento similar se espera para otros grupos bacterianos. De hecho, otros experimentos llevados a cabo con lodos activos (Dilek y col., 1998) mostraron que la velocidad de crecimiento microbiano puede aumentar significativamente con

concentraciones de níquel y de cromo entorno a una concentración de 0,01 mM mientras que concentraciones mayores pueden resultar inhibitorias. En este trabajo los metales pesados se añadieron al medio en concentraciones inhibitorias. A las concentraciones de metales pesados más bajas estudiadas no se observaron mejoras en la velocidad de crecimiento ni en las velocidades de degradación.

Se probaron diferentes ecuaciones cinéticas con los datos obtenidos durante el experimento con la especie *Bacillus* sp. y con la especie *Pseudomonas* sp. para cuantificar el efecto de cada metal pesado en la biodegradación de los alquilbencenos. Aunque los metales pesados no sirven de sustrato para el crecimiento de las bacterias, el efecto sobre la cinética de degradación del sustrato (tolueno, etilbenceno y *o*-xileno) con el incremento de la concentración de los metales pesados podría ser modelado matemáticamente usando el modelo de Andrews (Andrews, 1968). Este modelo se usa generalmente para cuantificar la velocidad de crecimiento microbiano con inhibición pero se consideró como un modelo apropiado dado que las velocidades de degradación de alquilbencenos parecían estar directamente ligadas a la respuesta del crecimiento microbiano para ambas especies empleadas en este estudio (Figura 4.4), aunque los estudios que describen la aplicación de la ecuación cinética en medios conteniendo metales pesados son mínimos.

Las constantes de inhibición de los metales pesados (K_i) para la degradación de los COV fueron calculadas según la ecuación:

$$r = r_{\max} \cdot S / (K_s + S + (S^2/K_i)) \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde r_{\max} es la velocidad de degradación máxima del tolueno, etilbenceno o del *o*-xileno, S es la concentración del metal pesado y K_s representa la concentración de sustrato llamada constante de Monod.

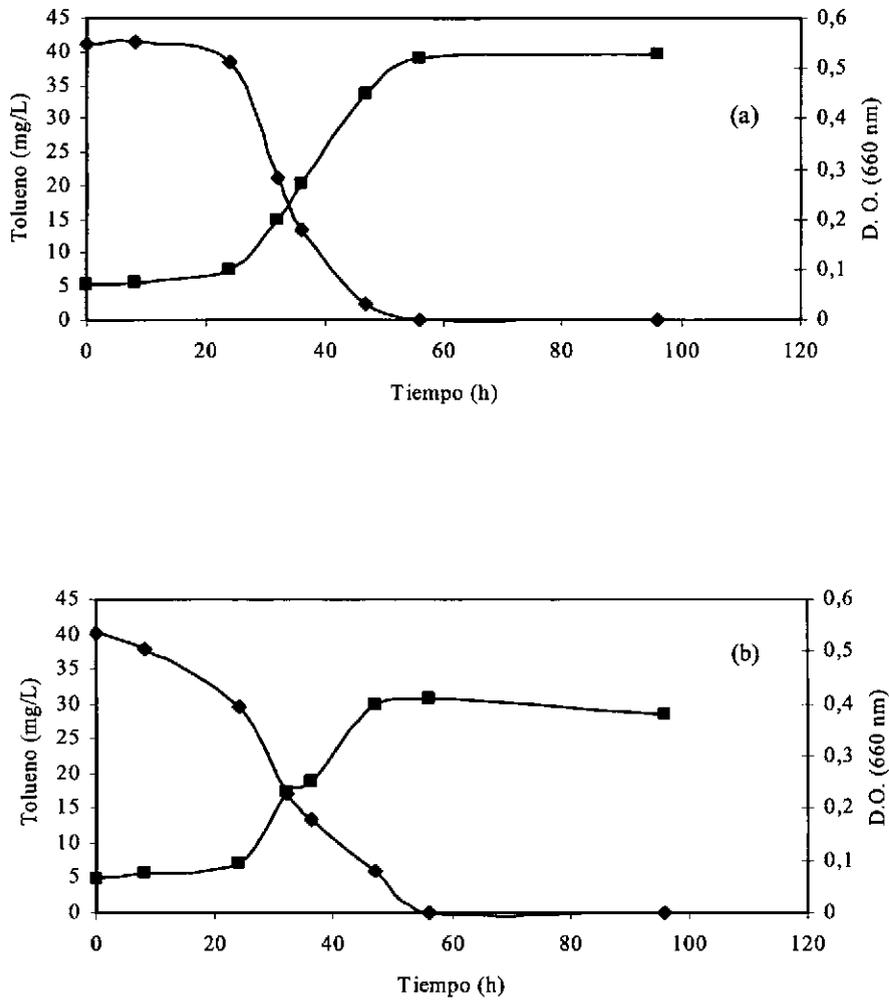


Figura 4.4. Curva de biodegradación (◆), crecimiento celular (■) para: (a) *Pseudomonas* sp. y (b) *Bacillus* sp.

Sin embargo, dado que al rango de concentraciones de metales pesados estudiadas se observaron efectos inhibitorios, la ecuación se simplificó al considerar que K_s era despreciable ($S \gg K_s$). Así ahora la ecuación pasa a ser:

$$1/r = 1/r_{\max} + S/K_i r_{\max} \quad \text{Ec. 4.2}$$

En este caso, la gráfica de la inversa de la velocidad de degradación frente a la concentración de los metales pesados debería de dar una línea recta.

Los datos experimentales obtenidos con la especie *Bacillus* siguen la cinética de Andrews cuando se representa la inversa de la velocidad de degradación frente a la concentración de los metales pesados. Se presentan en las Figuras 4.5, 4.6 y 4.7 las gráficas correspondientes al tolueno. Se llevaron a cabo otros experimentos con *Pseudomonas* sp. en presencia de níquel con el fin de confirmar un buen ajuste entre el modelo y los datos experimentales para diferentes especies bacterianas.

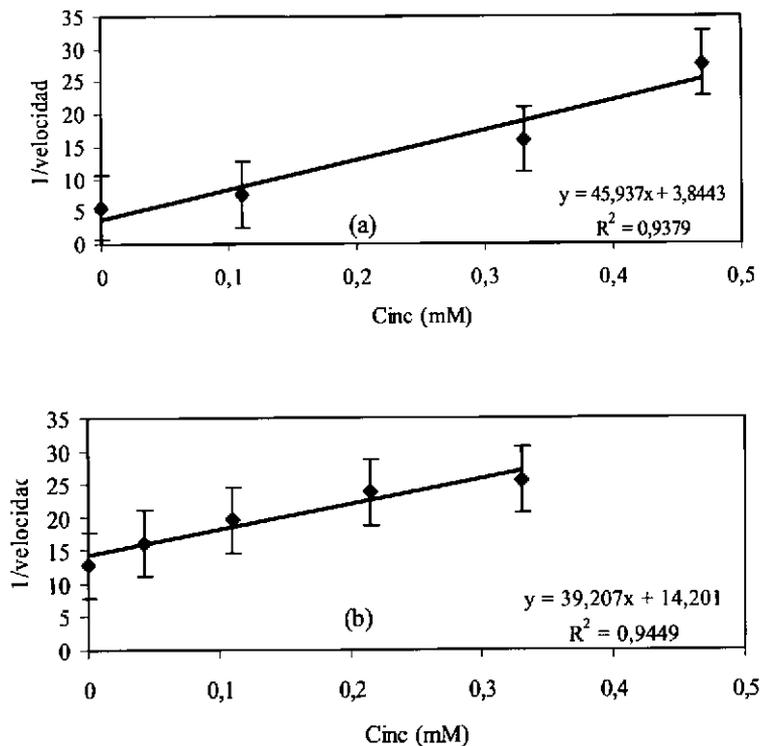


Figura 4.5. Gráfica de la velocidad de degradación de tolueno frente a la concentración de cinc con las bacterias (a) *Pseudomonas* sp. y (b) *Bacillus* sp.

En la Tabla 4.1 se muestran los valores de K_i para los diferentes alquilbencenos para ambas especies. Los resultados que se presentan en la tabla confirman los datos y las conclusiones obtenidas de las curvas y de las velocidades de degradación.

Tabla 4.1. Constantes de inhibición (K_i , mM) para las bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* sp. con los diferentes COV y los metales ensayados.

	<i>Bacillus</i> sp.			<i>Pseudomonas</i> sp.		
	Cadmio	Zinc	Níquel	Cadmio	Zinc	Níquel
Tolueno	0,448	0,403	0,606	0,339	0,041	0,662
Etilbenceno	0,757	0,420	0,690	ND ^a	ND	ND
<i>o</i> -xileno	0,416	0,431	0,620	ND	ND	ND

^a no determinado

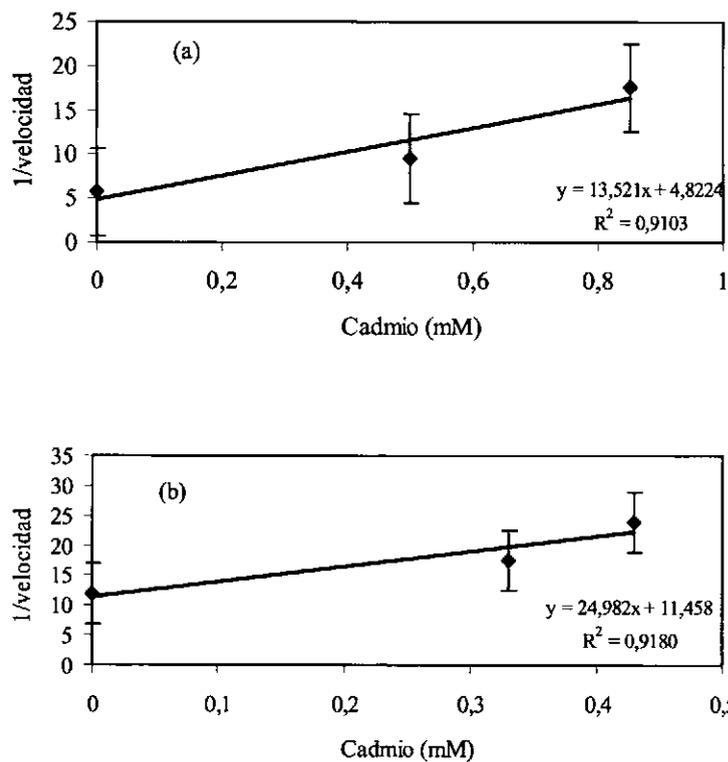


Figura 4.6. Gráfica de la velocidad de degradación de tolueno frente a la concentración de cadmio con las bacterias (a) *Pseudomonas* sp. y (b) *Bacillus* sp.

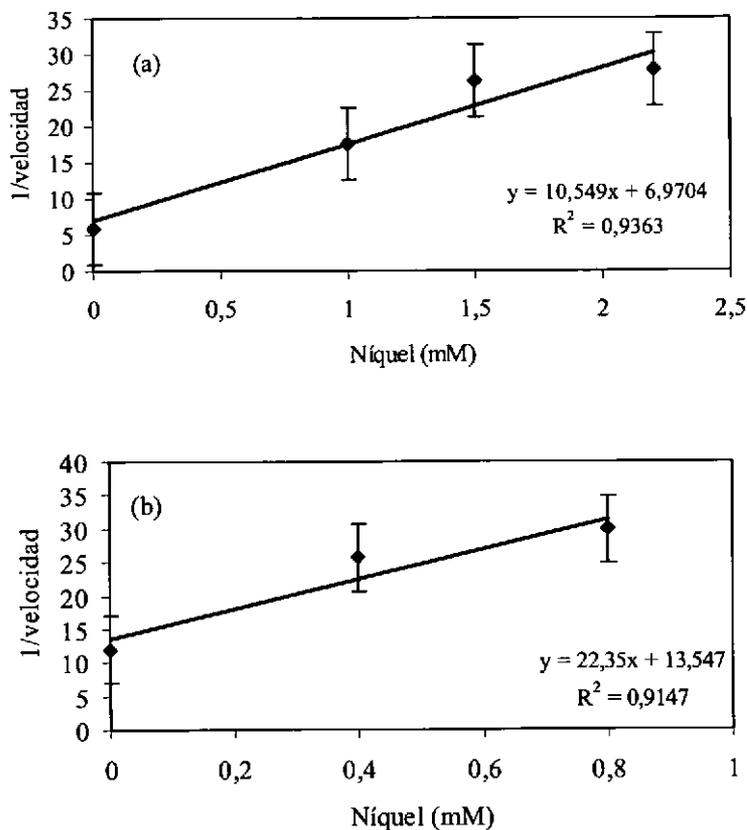


Figura 4.7. Gráfica de la velocidad de degradación de tolueno frente a la concentración de níquel con las bacterias (a) *Pseudomonas* sp. y (b) *Bacillus* sp.

4.4. Conclusiones

4.4.1. Biodegradación de alquilbenzenos

- A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que el porcentaje de biodegradación de los compuestos orgánicos volátiles depende del tipo de especie bacteriana, disminuyendo con el aumento de la concentración en el medio de éstos. Así la especie *Bacillus* sp. es capaz de degradar al tolueno, etilbenceno y *o*-xileno, sin embargo la especie *Pseudomonas* sp. degrada totalmente al tolueno y etilbenceno pero no al *o*-xileno. Por otro lado la degradación de los compuestos orgánicos tuvo lugar en una secuencia diferente para las dos especies bacterianas, dando lugar a un metabolismo favorecedor de la degradación del *o*-xileno para el caso de la especie *Bacillus*, pero no observándose en el caso de la especie *Pseudomonas*. Siempre se ha percibido en el estudio realizado un período de

adaptación de los microorganismos. Siendo esta adaptación persistente en función de la concentración de tóxico, siendo casi nula a concentraciones bajas y permanente a concentraciones altas.

- De los tres alquilbencenos utilizados, el *o*-xileno es siempre el más recalcitrante para las dos especies estudiadas, *Bacillus* y *Pseudomonas*.
- El estudio de la biodegradación de los compuestos orgánicos volátiles estudiados en presencia de metales pesados muestra un efecto inhibitorio incluso a bajas concentraciones independientemente del alquilbenceno utilizado. El níquel es el metal que resultó menos tóxico en la mayoría de los ensayos de degradación.

4.4.2. Modelo cinético de degradación

- Los resultados experimentales obtenidos se han modelado y ajustado a la ecuación de Andrews, la cual suministra una estimación cuantitativa del efecto de la inhibición sobre la degradación de los compuestos orgánicos volátiles.

4.5. Referencias

Álvarez P.J.J. and Vogel T.M., 1991. Substrate interactions of benzene, toluene and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 57; 2981-2985.

Andrews J.F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibiting substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 10; 707-723.

Anid P.J., Álvarez J.J.P. and Vogel T.M., 1993. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Water Research* 27; 685-691.

Benka-Coker M.O. and Ekundayo J.A., 1998. Effects of heavy metals on growth of species of *Micrococcus* and *Pseudomonas* in a crude oil/mineral salts medium. *Bioresource Technology* 66; 241-245.

Cabrero A., Fernández S., Mirada F. and García J., 1998. Effects of copper and zinc on the activated sludge bacteria growth kinetics. *Water Reserach* 32; 1355-1362.

Chang M., Voice T.C. and Criddle, C.S., 1993. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering* 41; 1057-1065.

Choi Y.B., Lee J.Y. and Kim H.S., 1992. A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 40; 1403-1411.

De Rore H., Tup E., Houwen F., Mergeay M. and Verstraete W., 1994. Evolution of heavy metal resistant transconjugants in a soil environmental with a concomitant selective press. *FEMS Microbiology and Ecology* 14; 263-273.

Dilek F.B., Gokcay C.F. and Yetis U., 1998. Combined effects of Ni(II) and Cr(VI) on activated sludge. *Water Research* 2; 303-312.

Doelman P., Jansen E., Michels M. and Van Til M., 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biological Fertilized Soil* 17; 177-184.

Evans P.J., Mang D.T. and Young L.Y., 1991. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment culyures. *Applied and Environmental Microbiology* 57; 450-454.

Gadd G.M. and Griffiths A.J., 1978. Microorganism and heavy metals. *Microbiology and Ecology* 4; 303-317.

Goblenz A., Wolf K. and Banda P., 1994. The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*. *Metals and microorganisms: Relationships and applications. FEMS Microbiological Review* 14; 303-308.

González-Gil G., Kleerebezen R. and Lettinga G., 1999. Effects of nickel and cobalt on kinetics of methanol conversion by methanogenic sludge as assessed by on-line CH₄ monitoring. *Applied and Environmental Microbiology* 65; 1789-1793.

Hashemi F., Leppard G.G. and Kushner D.J., 1994. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: Effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microbiology and Ecology* 27; 159-176.

Hassen A., Saidi N., Cherif M. and Boudabous A., 1998a. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64; 7-15.

Hassen A., Saidi N., Cherif M. and Boudabous A., 1998b. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* 65; 73-82.

Kennes C., Cox H., Doddema M. and Harder W., 1996. Design and performance of biofilters for the removal of alkylbenzene vapors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66; 300-304.

Kovalick Jr., W.W., 1992. Trends in innovative treatment technologies at contaminated sites. *Water Science and Technology* 26; 99-106.

Kovalick, Jr., W.W., 1991. Removing impediments to the use of bioremediation and other innovative technologies in environmental biotechnology for waste treatment. Ed. Sayler *et al.*, *Plenum Press*, New York, 41, 53-58.

Li F. and Tan T.C., 1994a. Effect of heavy metals ions on the efficacy of a mixed bacilli BDO sensor. *Biosensor and Bioelectrical* 9; 315-324.

- Li F. and Tan T.C., 1994b. Monitoring BOD in the presence of heavy metals ions using a poly (4-vinylpyridine) coated microbial sensor. *Biosensor and Bioelectrical* 9; 445-455.
- Lin C.Y. and Chen C.C., 1997. Toxicity-resistance of sludge biogranules to heavy metals. *Biotechnology Letter* 19; 557-560.
- Natarajan M.R., Lu Z. and Oriel P., 1994. Cloning and expression of a pathway for benzene and toluene from *Bacillus stearothermophilus*. *Biodegradation* 5; 77-82.
- Olasupo N.A., Scott-Emuakpor M.B. and Ogunshola R.A., 1993. Resistance to heavy metals by some Nigerian yeast strain. *Folia Microbiology* 38; 285-287.
- Pedersen A.R., Moller S., Molin S. and Arvin E., 1997. Activity of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in the early growth phase of a biofilm for waste gas treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 54; 131-141.
- Rohit M. and Sheela S., 1994. Uptake of Zinc in *Pseudomonas* sp. Strain UDG26. *Applied and Environmental Microbiology* 60; 2367-2370.
- Skinner J.H., 1991. Bioremediation research issues. In: Sayler, G.S., Fox, R., Blackburn, J.W. (Eds.), *Environmental Biotechnology for waste treatment*. Plenum Press, New York. 41; 61-70.
- Tomioka N.A., Uchiyama H. and Yagi O., 1994. Cesium accumulation and growth characteristics of *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. strain CS402. *Applied and Environmental Microbiology* 60; 2227-2231.
- Uma B. and Sandhya S., 1998. Kinetics of pyridine degradation along with toluene and methylene chloride with *Bacillus* sp. in packed bed reactor. *Bioprocess Engineering* 18; 303-305.
- Wood J.M. and Wang H.K., 1983. Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology* 17; 582-590.

Capítulo 5. Biodegradación del fenol y efecto sobre la nitrificación.

Capítulo 5. Biodegradación del fenol y efecto sobre la nitrificación

5.1. Introducción

El fenol es un contaminante que se encuentra presente en aguas residuales de diferentes industrias, entre las que destacan, como ya se ha mencionado en el capítulo primero, los efluentes de industrias petroquímicas y de industrias productoras de resinas sintéticas donde es usado como materia prima en la producción de resinas. Los derivados del fenol también se encuentran en las aguas residuales de industrias químicas y en las fábricas productoras de pesticidas, en las industrias papeleras, etc. (Fang y col, 1996).

El fenol es un compuesto que es soluble en agua siendo tóxico para muchas especies microbianas. Sin embargo este contaminante puede ser degradado mediante un proceso de lodos activos debido a que ciertas especies bacterianas y hongos son capaces de utilizar el fenol como única fuente de carbono y energía.

En los efluentes de industrias que utilizan el fenol como aditivo o bien como producto secundario raramente se encuentra solo. Ha y Vinitmantharat (2000) estudiaron la eliminación competitiva del fenol y del 2,4-diclorofenol, encontrando mayores cotas de degradación para el fenol, tanto cuando se encuentra sólo como en mezclas con otro compuesto.

Nakamura y Sawada (2000) observaron que la biodegradación es posible con bacterias aeróbicas en presencia de otros contaminantes, como suelen ser los metales pesados. Con frecuencia los lodos activos están sujetos a períodos fluctuantes, tanto en la concentración del sustrato como en la velocidad del flujo del influente, velocidad de aireación, pH y temperatura. Muchos de los problemas operacionales están asociados a las variantes anteriores, jugando un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de las comunidades de lodos activos (Rozich y col., 1983). El crecimiento celular con fenol ha sido observado para estudiar el fenómeno de inhibición por sustrato a grandes concentraciones de fenol y las ecuaciones de Haldane y Monod a menudo son empleadas para describir el crecimiento celular con fenol, empleando para ello tanto cultivos puros como cultivos mixtos (Si-Jing Wang and Kai-Chee Loh, 1999). El camino metabólico típico para la degradación del fenol ocurre via a un

derivado del catecol antes de la rotura del anillo pensándose en una oxidación en orto o meta (Yan R.D. and Humphrey A.E., 1975). Uno de los propósitos de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fenol sobre la actividad de las bacterias nitrificantes, utilizando tanto ensayos en discontinuo como un reactor de lodos activos.

En el presente trabajo se evalúa la capacidad de biodegradación del fenol empleando ensayos discontinuos bajo condiciones aerobias y analizar su influencia en el proceso de nitrificación.

El fenol es un compuesto orgánico altamente contaminante y causante de muchos problemas ambientales, siendo necesaria su eliminación. Este trabajo se centra en el estudio de su biodegradación así como evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fenol sobre la actividad de las bacterias nitrificantes. Estos estudios se han realizado en ensayos en discontinuo y también en un reactor de lodos activos.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Ensayos en discontinuo

Los experimentos en discontinuo han tenido lugar por duplicado y fueron llevadas a cabo bajo condiciones aerobias en viales de 500 mL equipados con tapas de bitón. Estos viales contenían 100 mL de medio acuoso y 3,5 g SSV/L empleando lodos obtenidos de una balsa aerobia de una planta de tratamiento de agua residual industrial de una fábrica productora de resinas sintéticas. El medio contenía macronutrientes y micronutrientes. La solución de nutrientes estaba formada por: MgSO_4 : 0.06 g/L; KH_2PO_4 : 0.25 g/L; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 1.178 g/L; NaCl : 1 g/L; NH_4Cl : 0.96 g/L y por los siguientes elementos traza: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 7.35 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 5.06 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5.0 g/L; $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.05 g/L; $\text{EDTA } 2/2 \text{ Na}^+$: 50 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1.57 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1.57 g/L; ZnCl_2 : 1.04 g/L. El pH ha sido medido con un electrodo INGOLD U455-57 conectado a un pH-metro 507 Crison, el cual ha sido ajustado a 7,5. Los viales se colocaron en un incubador orbital Gallenkamp a $30^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ y a 200 r.p.m. El fenol se añadió a diferentes concentraciones, en un rango de 100 a 2500 mg/L.

5.2.2. Reactor de lodos activos a escala laboratorio

El agua sintética a tratar fue aireada y mezclada con los lodos activos en el reactor. El agua tratada se separó del lodo gracias al acoplamiento de un decantador y el lodo era recirculado mediante la aireación, como muestra la Figura 5.1. El volumen útil del reactor empleado fue de 1,8 L. La temperatura de la cámara ha sido de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

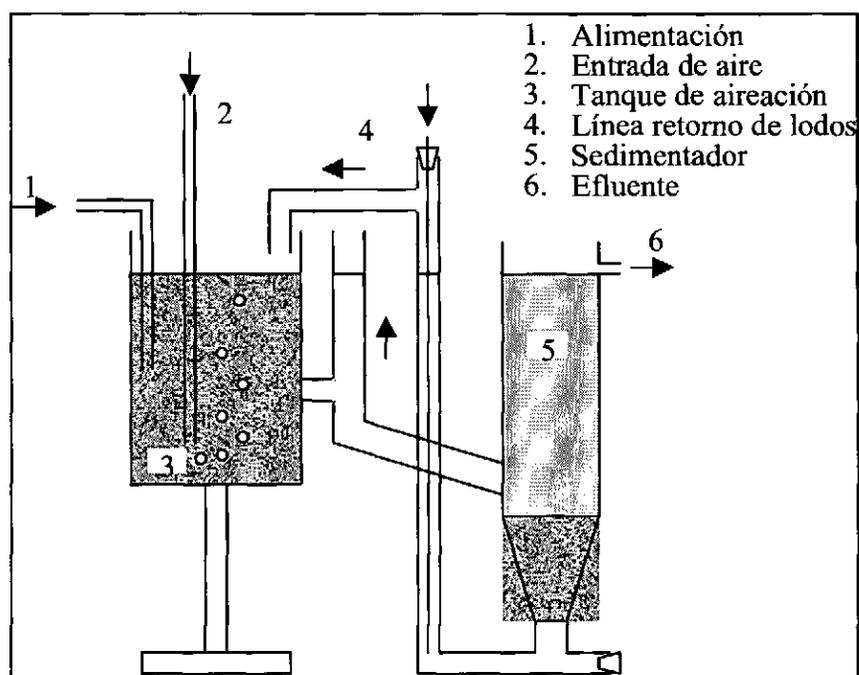


Figura 5.1. Reactor de lodos activos empleado en el presente estudio.

Las sales minerales del medio son las mismas que las empleadas para el estudio en discontinuo. Las concentraciones estudiadas se encuentran en el rango de 50 a 2.500 mg/L. En ambos casos, tanto en discontinuo como en el reactor de lodos aerobios se añadió $60 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$.

El agua residual sintética era preparada y mantenida en un frigorífico, y continuamente era añadida al reactor empleando para ello una bomba peristáltica de volumen variable. El efluente del reactor era controlado tres veces por semana. El aire era continuamente suministrado a través de un difusor. El oxígeno disuelto era manualmente controlado con un analizador de oxígeno disuelto (Crison Oximeter OXI 330). Los parámetros que

se medían eran las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato, DQO soluble, fenol, metales, sólidos volátiles, oxígeno disuelto y el pH. Los parámetros se determinaron en el reactor, efluente y en el influente. Durante el período de operación del reactor se mantuvo, prácticamente, constante el TRH.

5.2.3. Métodos analíticos

Las concentraciones de fenol se determinaron mediante el empleo de cromatografía líquida de alta presión, empleando para ello un cromatógrafo HP 1100 equipado con un detector Diodo Array y una columna C-18. Las muestras fueron comparadas con patrones externos. Para la determinación del nitrito y del nitrato se empleó la técnica de electroforesis capilar descrita en el capítulo de materiales y métodos. Las medidas se realizaron con un equipo HP^{3D} CE y capilar de sílice termostaticado a 30° C. Los metales se han determinado mediante la espectroscopía de absorción atómica de llama. Se empleó para ello un espectrofotómetro de absorción atómica Instrumentation Laboratory (IL) modelo 251. La concentración de nitrógeno amoniacal se determinó mediante un electrodo selectivo de amoníaco, modelo Ingold, conectado a un medidor de mV/pH Crison 506, descrito también en el apartado de materiales y métodos. Las medidas de la demanda química de oxígeno y de los sólidos volátiles se llevaron a cabo empleando el método descrito en el Standard Methods (APHA, 1998). El pH fue determinado empleando el electrodo Crison pH 52-03 conectado a un medidor pH/mV Crison 507 y por último el oxígeno disuelto fue medido con un electrodo selectivo Cellox 325.

5.3. Biodegradación del Fenol en discontinuo

Como se ha mencionado, lo que se ha pretendido con los presentes ensayos ha sido estudiar la biodegradabilidad del fenol y analizar su influencia en el proceso nitrificante.

Para la preparación de los ensayos en discontinuo se ha seguido la metodología descrita en el apartado 5.2 A) y en el Capítulo 2, con la adición de nutrientes, elementos traza, bicarbonato para el tamponamiento del medio, el lodo aerobio, aire y fenol. Para estudiar la degradación se prepararon concentraciones que comprendían el intervalo desde 100 hasta 2500 mg/L de fenol. Para el estudio del proceso de nitrificación fueron

añadidos 250 mg/L de N-NO₃⁻. Como se ha mencionado en el Capítulo 2 los ensayos han sido realizados por duplicado y además se realizaron ensayos de control (sin biomasa) y ensayos en blanco (biomasa esterilizada), comprobando así la ausencia de pérdida de fenol por volatilización, adsorción o cualquier otro tipo de fenómeno químico que pudiera darse en el medio. Asimismo se preparó un ensayo sin fenol para observar la máxima actividad nitrificante en las condiciones establecidas.

5.3.1. Degradación del fenol

En la Figura 5.2 se muestran las curvas de degradación del fenol para cada una de las concentraciones estudiadas. Se puede observar la completa degradación biológica del fenol para todas las concentraciones estudiadas (100-2500 mg/L). Con estos resultados podemos concluir que es posible llegar a degradar aeróbicamente concentraciones de fenol de hasta 2500 mg/L, utilizando a éste como única fuente de carbono, a pesar de tratarse de un compuesto altamente tóxico y de ser un inhibidor de la actividad de los microorganismos. Con estos datos se ha procedido a estudiar la cinética de degradación del fenol. Para ello se han calculado las velocidades iniciales de biodegradación, para las diferentes concentraciones, las cuales se muestran en la Tabla 5.1 teniendo en cuenta la concentración de biomasa. Se aprecia que al ir aumentando la concentración de fenol la velocidad de degradación va incrementándose. La curva de la cinética se encuentra representada en la Figura 5.3. El modelo cinético que se sigue es similar al modelo cinético de Monod y la ecuación utilizada para ajustar los datos experimentales está basada en dicha cinética. La ecuación (ecuación 5.1) es la siguiente:

$$R = \sum_{i=1} K_i C_b / Y_i \cdot C / K_c^i + C \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde R es una velocidad de degradación y K_i es la constante de velocidad específica de crecimiento de ith de la fase de crecimiento o de inhibición, C es la concentración del sustrato y K_cⁱ es la constante de saturación media del sustrato o del inhibidor, C_b es la concentración de la biomasa, Y_i es el coeficiente de rendimiento del sustrato o inhibidor.

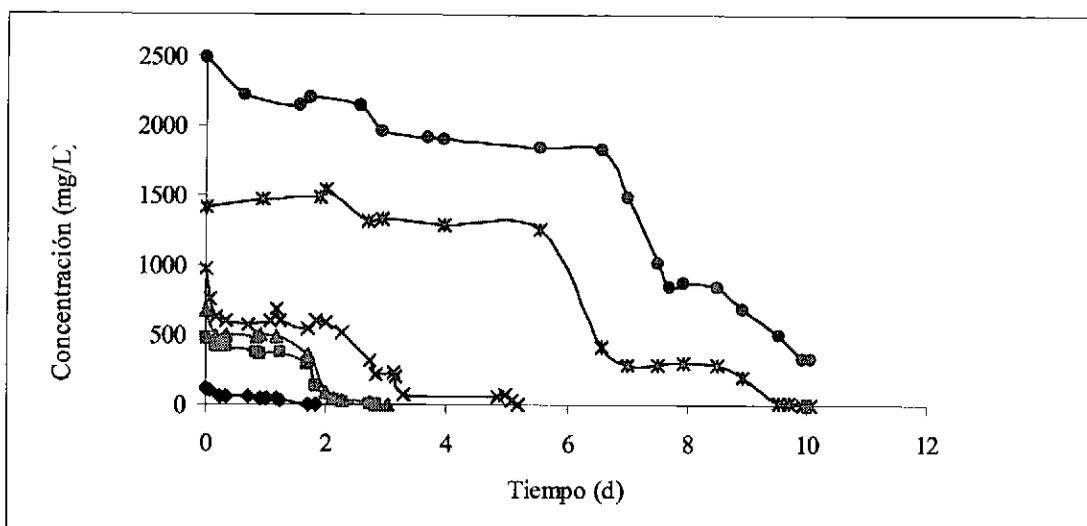


Figura 5.2. Curvas de degradación del fenol a diferentes concentraciones.

Tabla 5.1. Velocidades iniciales de biodegradación del fenol.

Concentración de fenol (mg/L)	Velocidad de degradación (mg/L·d)
100	92,7
500	266,9
700	282,3
1000	296,3
1400	256,4
2500	198,4

Con los datos obtenidos los resultados pueden representarse como siguen en la ecuación 5.2

$$R = K_g C_b / Y_s C / K_c + C - K_d C_b / Y_d C / K_i + C \quad \text{Ec. 5.2}$$

Esta ecuación se trata de un caso especial de la ecuación 5.1, donde K_g es la velocidad de crecimiento específico (1/d), K_c representa el coeficiente de saturación medio (mg/L) y K_d es la velocidad de decaimiento específico lo cual significa que se da en unidades de velocidad de muerte celular (1/d), K_i es la saturación media del inhibidor, las unidades son las mismas que las del sustrato (mg/L), Y_s es el coeficiente de rendimiento (mg de biomasa/mg de sustrato) e Y_d es el coeficiente de consumo del inhibidor (es el propio sustrato, mg de biomasa/mg de inhibidor). Utilizando la ecuación 5.2 y calibrando los

parámetros podemos ajustar los datos experimentales que se muestran en la Figura 5.3. Los valores obtenidos para K_c y K_i fueron de 800 mg/L y de 1800 mg/L, respectivamente.

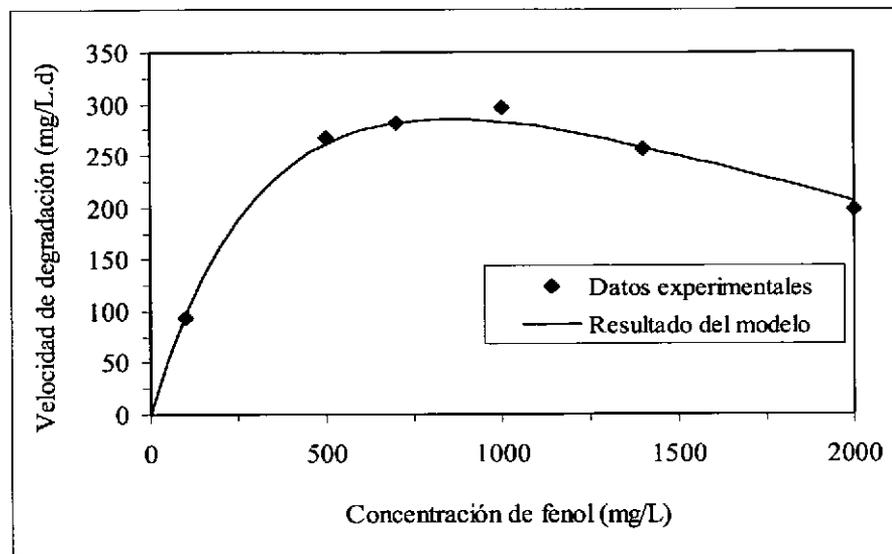


Figura 5.3. Comparación de los resultados del modelo con los datos experimentales.

Con este modelo podemos obtener el valor de K_g , el cual significa que si la concentración del sustrato es muy alta, la velocidad de crecimiento alcanza un valor máximo y si la concentración se incrementa más la velocidad de crecimiento no aumenta. Una alta concentración también induce a aumentar la velocidad de inhibición cuando la concentración es dos veces K_d , la velocidad de decaimiento alcanza el máximo.

A las concentraciones estudiadas no existe inhibición por sustrato significativa para la degradación de fenol. Goudar y col. (2000) utilizando un cultivo mixto adaptado al fenol, realizaron ensayos en discontinuo en un rango de 100 a 1300 mg de fenol por litro en condiciones aerobias, encontrando toxicidad a concentraciones superiores a 1300 mg/L, comprobando que en nuestro estudio también hubo inhibición a partir de aproximadamente 1000 mg fenol/L.

5.3.2. Nitrificación

Durante el transcurso del estudio de biodegradación del fenol se ha seguido la concentración de nitrito y nitrato para poder analizar la influencia del fenol sobre el proceso de nitrificación. Los lodos empleados, como ya se ha mencionado, proceden de un reactor aerobio de la E.D.A.R. de una industria productora de resinas sintéticas, por lo que inicialmente se observó que poseían una concentración de nitratos inicial de aproximadamente 90 mg N-NO₃⁻. Como resultado de la dilución a la que fueron sometidos al inocular los ensayos, para obtener la concentración deseada de SSV, aparecen en los ensayos en torno a 18 mg N- NO₃⁻ a tiempo cero. Las concentraciones de nitrito y nitrato, a lo largo de los ensayos se muestran en las Figuras 5.4 y 5.5.

Se ha observado el mismo comportamiento en todos los ensayos para las distintas concentraciones de fenol estudiadas, hasta que el fenol no es degradado totalmente no comienza el proceso de nitrificación. No existió degradación del fenol y nitrificación simultánea, esto indica que el fenol es un fuerte inhibidor de este último proceso. Por el contrario en el ensayo que no contenía tóxico, el proceso de nitrificación comenzó a tiempo cero y sin la formación intermedia de nitrito. Así mismo se ha observado que en los ensayos en los que estuvo presente el fenol, incluidos aquellos en los que la concentración del contaminante era baja, aparece la formación intermedia de nitritos (Figura 5.5), lo que confirma que la oxidación de amonio a nitrato tiene lugar en dos etapas y que además los microorganismos más sensibles son los encargados de llevar a cabo la transformación de nitrito a nitrato. Las bacterias amonio oxidantes son más sensibles que las nitrito oxidantes a bajas concentraciones de oxígeno disuelto y a elevadas concentraciones de amoníaco libre. La acumulación de nitrito fue mayor en estos ensayos a mayores concentraciones de fenol, los microorganismos nitrificantes requirieron un tiempo mayor de adaptación debido a la competencia por el oxígeno disuelto entre las bacterias heterótrofas aerobias encargadas de la degradación del fenol y las propias bacterias nitrificantes. Como conclusión decir que la competencia es mayor tanto mayor es la concentración de carbono en el medio y debe tenerse en cuenta las propias cualidades inhibitorias del fenol en el proceso de nitrificación.

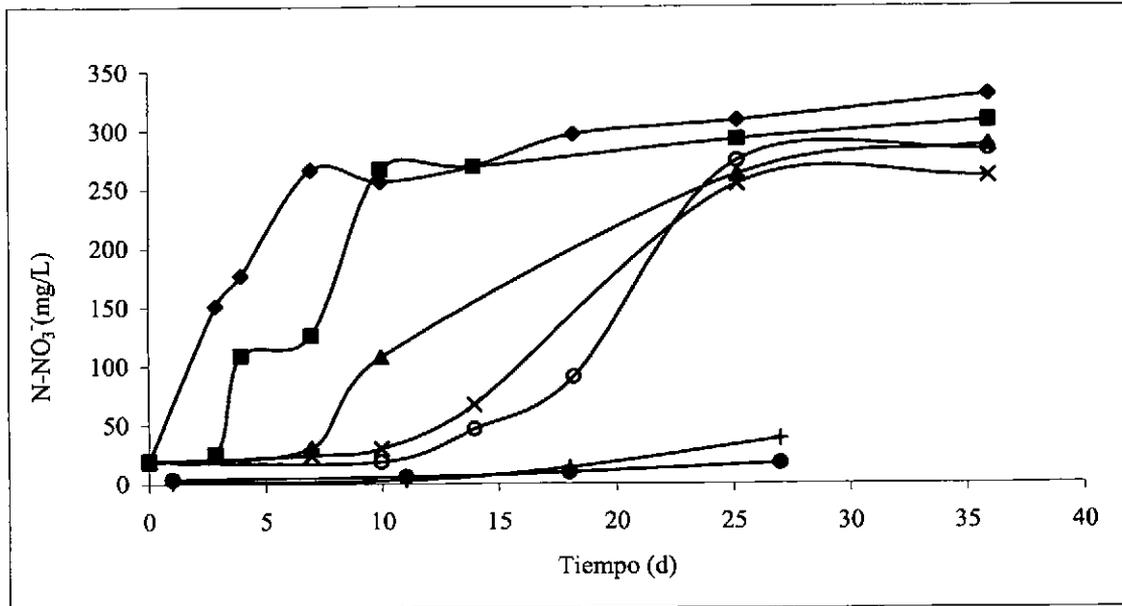


Figura 5.4. Evolución de la concentración de nitratos en presencia diferentes concentraciones de fenol. (◆) sin fenol, (■) 100 mg/L fenol, (▲) 500 mg/L fenol, (x) 700 mg/L fenol, (○) 1000 mg/L, (●) 1400 mg/L fenol, (+) 2500 mg/L fenol.

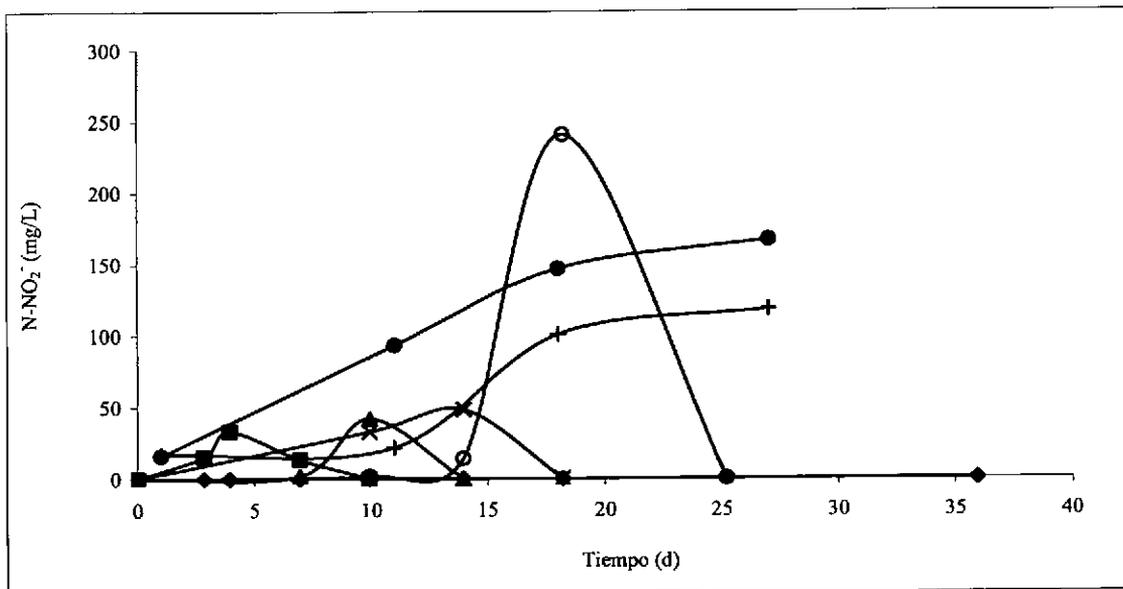


Figura 5.5. Evolución de la concentración de nitritos en presencia diferentes concentraciones de fenol. (◆) sin fenol, (■) 100 mg/L fenol, (▲) 500 mg/L fenol, (x) 700 mg/L fenol, (○) 1000 mg/L, (●) 1400 mg/L fenol, (+) 2500 mg/L fenol.

Inicialmente se habían añadido 250 mg $N-NH_4^+$ /L, pero la concentración que aparece de nitrógeno al final del experimento en todos los viales en forma de $N-NO_3^-$ y de $N-NH_4^+$ /L (éste en una concentración muy baja) resulta ser mayor que el añadido inicialmente, sucede principalmente por dos causas:

- Una es que el lodo, como fue comentado, contenía ya una cierta cantidad de N-NO_3^- lo que ha provocado que inicialmente apareciese una concentración de 18 mg/L en todos los ensayos.
- La otra causa es que debe ser considerado cualquier forma de nitrógeno orgánico trivalente de naturaleza orgánica que han podido traer los lodos debido a restos de colas y resinas producidos en la planta de procedencia de éstos. Para comprobar esto fue determinado el NTK soluble y total: la concentración del NTK_s ha sido de 96,8 mg/L y del NTK_t ha sido de 235,2 mg/L. Probablemente el NTK soluble es el fácilmente hidrolizable, por lo que aumentaría la concentración de amonio disponible para la nitrificación en unos 20 mg/L y tras la dilución a la que se sometieron los lodos al inocularlos en cada ensayo. El resto de N-NH_4^+ procedería de una hidrólisis parcial del NTK total.

Para poder comprobar la máxima actividad nitrificante en las condiciones empleadas y en ausencia de fenol se realizaron ensayos de control y blanco, sin biomasa esterilizada y con biomasa esterilizada, respectivamente. En ambos casos no se acumuló el nitrito.

A la vista de los resultados puede considerarse que la nitrificación ha tenido lugar en un 100% en todos los ensayos. El fenol no ha resultado ser tóxico para el proceso de nitrificación a las concentraciones estudiadas, sin embargo el proceso de nitrificación no comenzó hasta que todo el fenol fue degradado.

Durante el transcurso de los ensayos fue necesaria la adición de una mayor cantidad de alcalinidad en los días 6 y 10 de los ensayos, no siendo suficiente la añadida inicialmente con 1500 mg/L de alcalinidad como CaCO_3 , por producirse un descenso del pH de los ensayos un valor por debajo de 7. Este descenso provocó un retraso en el proceso de nitrificación, sobre todo en los ensayos menos inhibidos, es decir sin fenol y en presencia de 100 mg fenol/L, tal y como se observa en la Figura 5.5. Así la alcalinidad total añadida al final del ensayo fue de unos 5.000 mg/L de alcalinidad como CaCO_3 .

Anteriormente a estos ensayos, se habían realizado otra serie de análisis bajo las mismas condiciones y concentraciones de tóxico pero sin la adición previa de aire. En todos los

casos no fue observado el proceso de nitrificación, excepto en el ensayo con 100 mg fenol/L, en el que había sido alcanzada una nitrificación parcial, menor del 50% siendo el NO_2^- el único producto final de la nitrificación. Al medir el OD final, en todas las concentraciones estudiadas, excepto en blancos y controles no se superó el valor de 0.4 mg/L, de manera que si el oxígeno se hubiera consumido durante la oxidación del fenol, ésta podría ser una de las razones por las que no tuviera lugar la nitrificación. En base a estos resultados, fueron preparados estos experimentos con una sobrepresión de aire en el interior de los viales para, de esta forma, asegurar que el medio de cultivo dispusiese de suficiente OD para realizar la degradación del fenol y posteriormente la nitrificación, comprobándose que la concentración de oxígeno al finalizar la degradación del fenol fuera la suficiente para que el proceso nitrificante pudiera ser llevado a cabo. Así que finalmente la concentración de OD en el medio, en algunos casos, fue superior al intermedio debido a la apertura de los viales para adicionar la disolución tampón con el fin de aumentar la alcalinidad. Es presentado el valor del pH inicial y final así como el del OD inicial (medido antes de la adición extra de aire), intermedio (tras la degradación del fenol) y el final para cada uno de los experimentos realizados en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Concentraciones de OD y pH a diferentes intervalos de tiempo de los ensayo, al inicio, final y en una fase intermedia.

Fenol (mg/l)	pH _i	pH _f	OD _i (mg/l)	OD _{interm} (mg/l)	OD _f (mg/l)
0	7,95	7,36	7,14	-	4,0
100	7,89	7,50	7,38	5,25	4,7
500	7,90	7,65	7,32	3,41	4,5
700	7,94	7,41	7,37	2,85	2,7
1400	7,88	7,52	7,21	2,32	4,0
2500	7,90	7,49	7,28	1,95	3,89

5.4. Biodegradación de fenol y nitrificación en un reactor de lodos activos

La realización de este ensayo tiene como finalidad estudiar la biodegradabilidad aerobia del fenol en continuo y analizar la influencia de éste en el proceso de nitrificación. El reactor de lodos activos empleado en este ensayo es el mostrado en el esquema de apartado 5.3.1.

La alimentación del reactor se llevó a cabo con agua residual sintética cuya composición ya comentada en el apartado de material y métodos constaba de: nutrientes, micronutrientes, cloruro y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, fenol como fuente de carbono y bicarbonato sódico como disolución tampón y fuente de carbono de las bacterias autótrofas. Durante el desarrollo del presente trabajo se ha mantenido la concentración de N-NH_4^+ en 350 mg/L en la alimentación. Desde el inicio del estudio la eliminación de fenol ha sido de un 99% al igual que el porcentaje de nitrificación. El sistema operó a un TRH de aproximadamente unos 2,5 días, siendo el volumen útil del reactor de 1,8 L. Por tanto la velocidad de carga de nitrógeno alimentado fue de 0,14 g N-NH_4^+ /L·d.

La concentración de fenol en la alimentación se ha ido aumentando progresivamente hasta 2800 mg de fenol por litro, correspondiendo a una VCO de 1,10 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ /L·d.

Debido a que en el proceso de nitrificación se produce una acidez del medio fue necesario añadir alcalinidad, asegurando así un pH óptimo para llevarse a cabo los procesos de degradación y nitrificación. Durante la mayor parte del experimento se mantuvo la concentración en 6 g/L de NaHCO_3 en el influente. Posteriormente la concentración fue reduciéndose hasta alcanzarse los 3 g NaHCO_3 /L, tratándose de evitar que se superase la concentración de la disolución tampón, uno de las causas ha sido la reducción del porcentaje de nitrificación por lo cual tanta acidez no era generada. La evolución del pH se ve reflejada en la Figura 5.6. Como puede observarse hay una variación brusca en torno al día diez de operación debido a la desestabilización producida en el reactor al comenzar la adición de fenol, unos 100 mg/L, por lo que se decidió eliminar la concentración de fenol durante unos días y volver a introducir el fenol en el influente en concentraciones más moderadas hasta conseguir que la biomasa se encontrase más adaptada al medio.

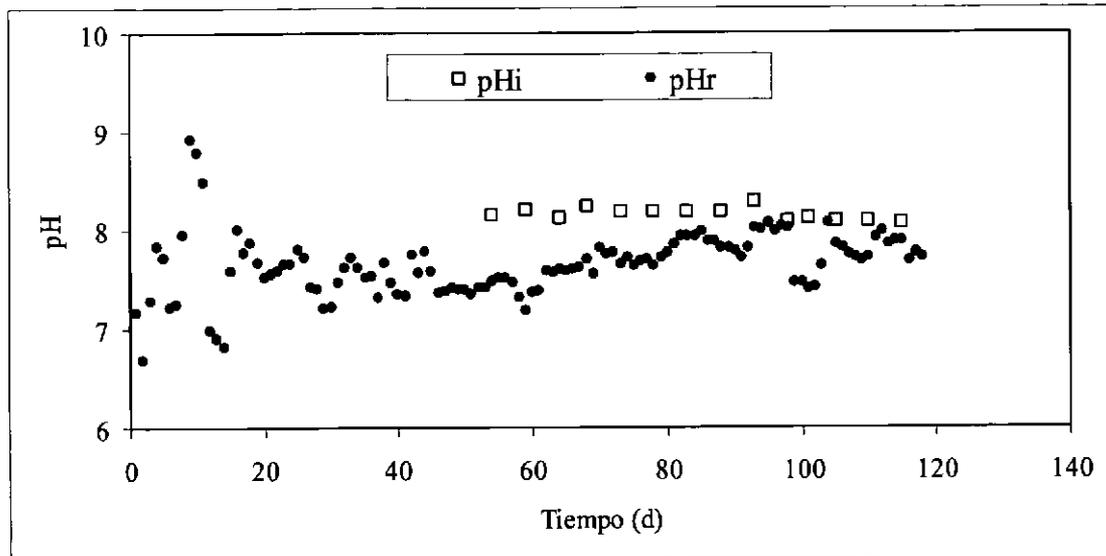


Figura 5.6. pH en el influente y en el reactor.

El oxígeno disuelto se ha mantenido en el rango de 4-7,5 mg/L. La evolución del oxígeno disuelto en el reactor se muestra en la Figura 5.7. En torno al día 60 de operación se observa un descenso brusco de la concentración de oxígeno provocando una desestabilización del reactor apareciendo amonio en el efluente. Este descenso en el oxígeno fue debido a una rotura en la conducción del aire por lo que la agitación producida por la recirculación de lodos era la portadora de oxígeno al medio. Además la falta de oxígeno en el medio produce lodos de baja sedimentabilidad, esto fue observado por Wilén y col. (1999). Así cuando la concentración de oxígeno descendió entre 0,5 y 2 mg/L, se produjeron fenómenos de flotación en el sedimentador y pérdida de biomasa en el reactor, aunque la cantidad de sólidos en el efluente se mantuvo constante, ver Figura 5.8. Una vez restablecida la conducción del aire al reactor, los fenómenos anteriormente comentados fueron desapareciendo. Se fue incrementando el caudal de aire al aumentar la concentración de contaminante, pues al haber mayor cantidad de fuente de carbono el consumo de oxígeno aumenta para lograr la oxidación de dicha materia, siendo además necesaria una concentración de oxígeno suficiente para llevar a cabo la nitrificación. Si observamos de nuevo la Figura 5.8 se observa como hay una ligera tendencia descendente en la concentración del OD conforme va aumentando la concentración de fenol, incluso aun después de haber aumentado el caudal de aireación.

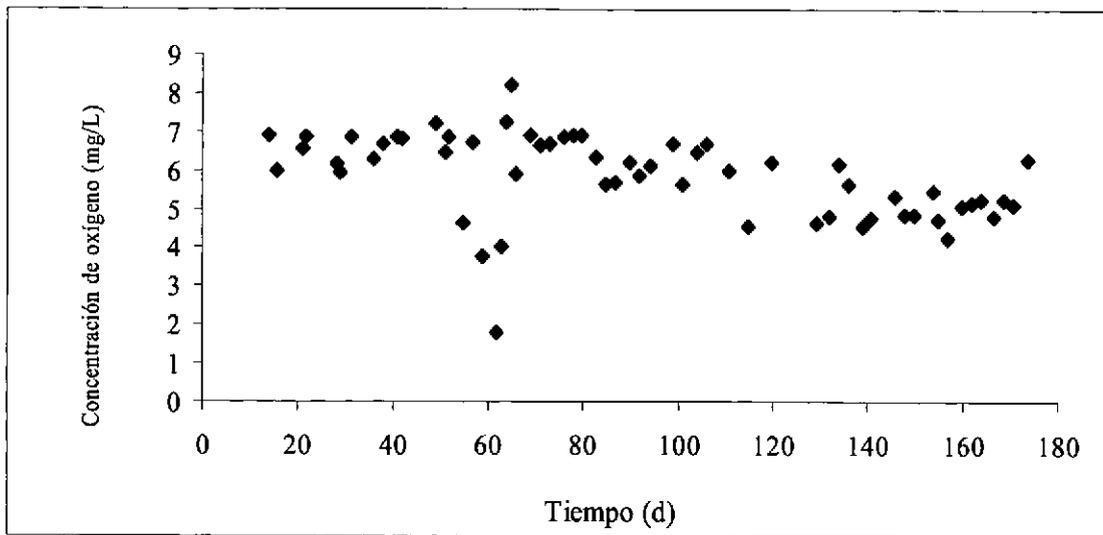


Figura 5.7. Gráfica de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto.

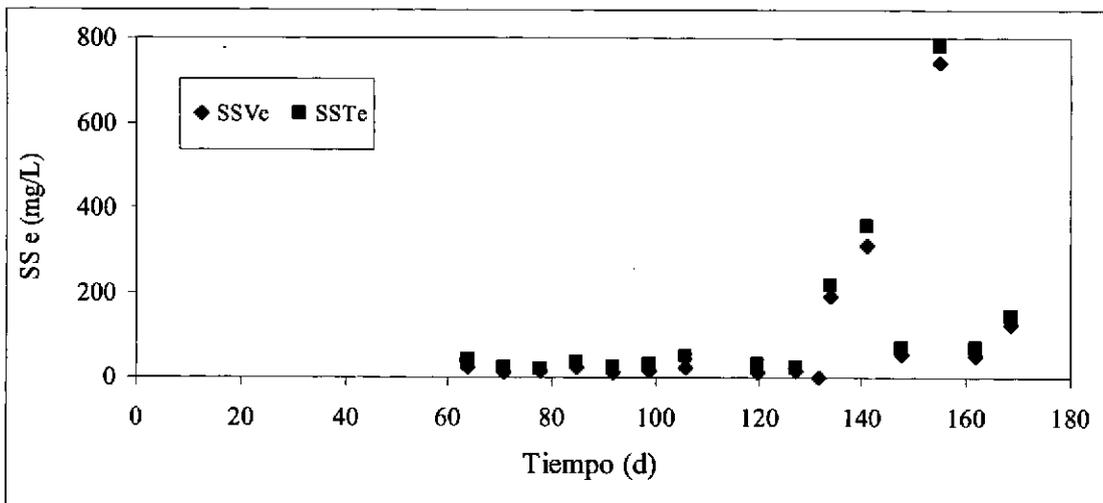


Figura 5.8. Concentración de biomasa en el efluente.

La biomasa del reactor, se encuentra formada por bacterias heterótrofas y nitrificantes. El reactor empezó a operar con una concentración microbiana de 3,5 g SSV/L alcanzándose un máximo de 12 g SSV/L. Este aumento de la biomasa, en mayor medida heterótrofa, fue debido a la buena sedimentabilidad de los lodos, a la recirculación y al incremento de la materia orgánica. A partir del día sesenta es observado el incremento de la biomasa, aunque debido al problema de aireación comentado, se produjo una pérdida de biomasa, siendo recuperada al solucionar dicho problema. Hacia el final del período de operación después de alcanzarse la máxima concentración de sólidos, ésta disminuyó ligeramente, debido a problemas de flotación de lodos que no decantaban y se perdían.

5.4.1. Biodegradación del fenol

El reactor ha sido alimentado con concentraciones crecientes de fenol, y hasta la concentración más alta empleada, 2800 mg C_6H_6O/L , se ha producido la eliminación total de éste, sin llegarse a detectar tanto en el efluente como en el reactor en ningún momento, excepto en la puesta en marcha, cuando se alimentó con cien mg/L de fenol sin previa adaptación del lodo. En la Figura 5.9 puede verse el incremento de la concentración del fenol en la alimentación y la evolución en el efluente.

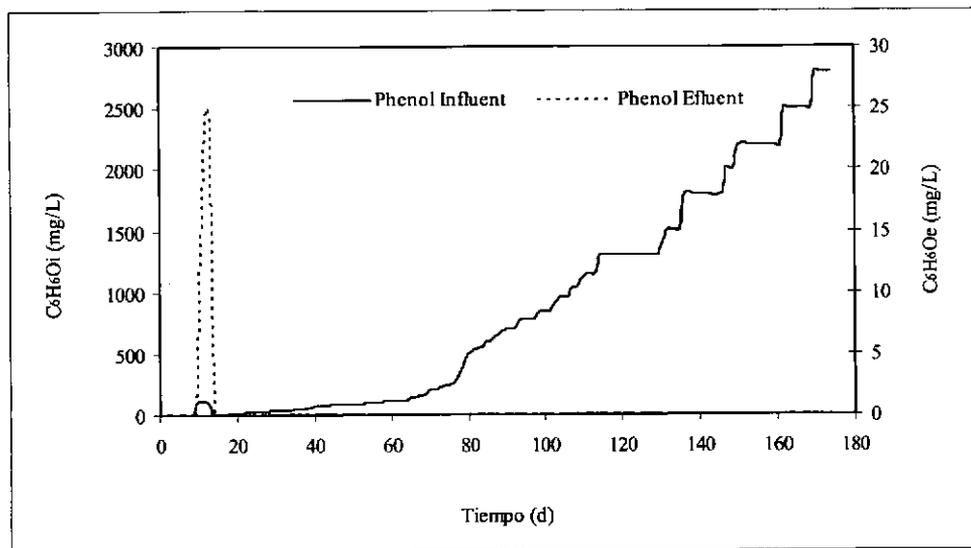


Figura 5.9. Concentración de fenol en el influente y en el efluente del reactor en continuo.

Así autores como Kibret y col.(2000) operando un reactor aerobio de lodos activos a escala de laboratorio, con un diseño similar al empleado en este trabajo y con 6 L de volumen útil consiguieron eliminar hasta 2500 mg C_6H_6O/L sin observarse su presencia en el tanque de aireación. A partir de esta concentración observaron una acumulación y una disminución en la actividad de los microorganismos. Otros autores como Fang y col. (1996) lograron con un reactor UASB y con una relación de recirculación 1:1 operando a 37°C, TRH 12 h y pH entre 6,9-7,5 una eliminación del 97 % partiendo de una concentración de 1260 mg C_6H_6O/L . La VCO a la que fue sometido el reactor así como la eficacia de eliminación se muestra en la Figura 5.10. Como puede observarse se produjeron unas variaciones puntuales hacia el final de operación del reactor debidas a problemas de atascamiento dando lugar a un error en la medición del caudal. Estos

atascamientos fueron debidos a problemas de flotación de los lodos en el sedimentador. La eficacia de eliminación de fenol, una vez adaptada la biomasa a la materia orgánica fue superior al 95 % para VCO de hasta 1,1 g C₆H₆O/L·d y 0,11 g C₆H₆O/g SSV·d.

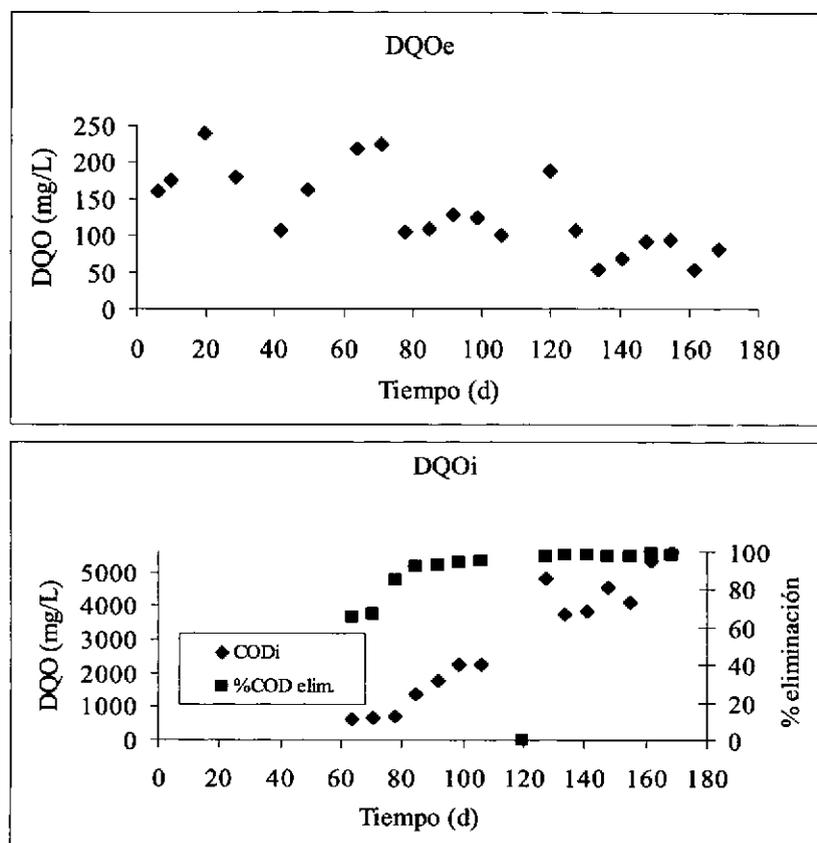


Figura 5.10. Gráficos para la DQO tanto para el influente como para el efluente del reactor de lodos activos empleado, así como el porcentaje de eliminación.

5.4.2. Nitrificación en presencia de fenol

Para el estudio de la nitrificación se han tomado diariamente muestras para determinar los parámetros siguientes en el efluente: N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻. Las concentraciones de nitrito y nitrato son representadas en la Figura 5.11. Hasta el día 120 de operación es superado el 65 % con respecto al rendimiento de la nitrificación, apareciendo concentraciones en el efluente de 220-350 mg N-NO₃⁻ /L. El fenol no ha inhibido al proceso de nitrificación en un proceso en continuo hasta una concentración de 1200 mg C₆H₆O/L y a una VCO de 1,1 g C₆H₆O/L·d y 0,11 g C₆H₆O/g SSV·d. Den Blanken y col. (1993) estudiaron el efecto de cargas de fenol sobre la nitrificación en un

tratamiento de lodos activos en discontinuo y encontraron que a concentraciones de 10 g C_6H_6O/Kg SSV era necesario un tiempo de adaptación para que comenzase el proceso. Min y Jong (1998) encontraron que 1500 mg C_6H_6O/L provocó una fuerte inhibición de la nitrificación en un sistema de eliminación biológica de nitrógeno para elevadas concentraciones de amonio trabajando a 4 días de TRH, y esto fuera debido a que el fenol no pudo ser eliminado en la primera fase de eliminación de carbono previa a la de nitrificación en este sistema, disminuyendo la eficacia cuando la concentración de fenol sobrepasara los 13 mg/L en la etapa de nitrificación. Así que el TRH tuvo que ser aumentado de 4 a 8 días para obtener una completa nitrificación, y esto fue debido a la competencia entre las bacterias heterótrofas y las bacterias nitrificantes en la etapa de nitrificación y al mayor crecimiento de las heterótrofas. Volviendo al sistema aquí presentado no se encuentra esta separación de etapas y en ningún momento se detectó fenol en el tanque de aireación.

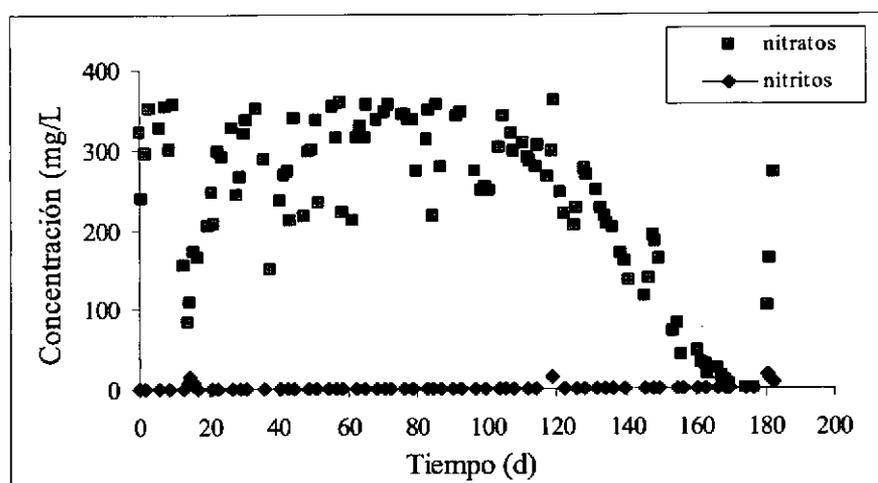


Figura 5.11. Concentración de nitrato y nitrito en el reactor de lodos activos

Como se muestra en la Figura 5.12 se ha obtenido una eficacia de eliminación de $N-NH_4^+$ por encima del 99 %, a excepción de los momentos de desestabilización en torno a los días 15-60 de operación, a consecuencia del descenso del OD y de la sobrecarga de fenol sin previa adaptación. Durante la operación del reactor se observó que el balance de nitrógeno no se cerraba y esto puede explicarse por la asimilación de amonio por parte de la biomasa heterótrofa y nitrificante para su crecimiento, y a cierta desnitrificación en el decantador debido a la baja concentración de OD en éste, unos 0,2 mg/L. Hwang y col. (2000) estudiaron la influencia del OD sobre la nitrificación y

desnitrificación en un proceso de lodos activos así como la producción de N_2 y N_2O a bajas concentraciones de oxígeno. Encontraron que por debajo de un 5 % de OD predominaba el proceso de desnitrificación, en el rango 10-15 % sucedían ambos a la vez y a concentraciones superiores predominaba la nitrificación.

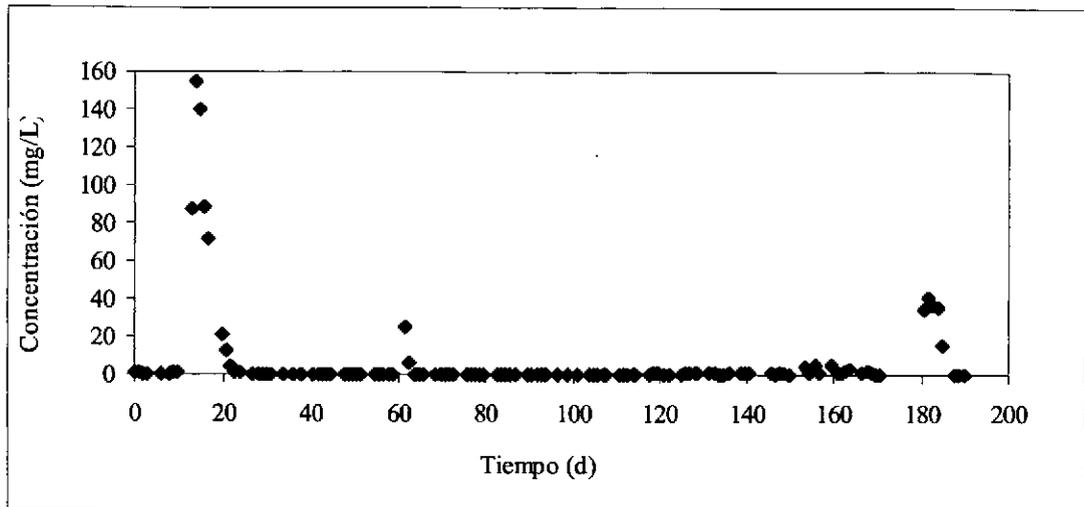


Figura 5.12. Concentración de amonio en el efluente.

5.5. Conclusiones

5.5.1. Ensayos aerobios en discontinuo

- En los ensayos llevados a cabo en discontinuo se observó una completa biodegradación del fenol en el rango de concentraciones estudiadas, éstas han sido de 100 a 2500 mg/L. Los datos cinéticos se ajustan al modelo cinético de Monod.
- Concentraciones altas de fenol (1000-2500 mg/L) han causado inhibición en el proceso de nitrificación. Produciéndose acumulación de nitrito y amonio. El proceso de nitrificación no tiene lugar hasta que se produce la degradación total del fenol.

5.5.2. Ensayos en el reactor de lodos activos

- Respecto a los ensayos en continuo la concentración de amonio ha sido mantenida durante todo el período de operación, mientras que la velocidad de carga orgánica se fue incrementando de 30 a 2700 mg de DQO/L·d con el incremento de la concentración de fenol de 35 a 2800 mg/L.
- La degradación de fenol se ha mantenido por encima del 99 % para todas las velocidades de carga orgánica aplicadas.
- Al igual que el fenol, el porcentaje de eliminación del amonio ha sido alto, mayor del 99 %, indicando la inexistencia de inhibición del fenol sobre el proceso de nitrificación.
- Los resultados obtenidos indican que un tratamiento aerobio en continuo de aguas residuales en las que se encuentran presentes concentraciones elevadas de fenol y de amonio, puede ser llevado a cabo eficazmente.

5.6. Referencias

APHA-AWWA-WPCF (1998). Standard Methods for Examination of water and wastewater. 20th ed., Washington DC, USA.

Den Blanken, J.G. (1993). Effects of phenol and sludge load adaption and nitrification. *Environmental Technology* 14 ; 831-839.

Fang, H.H.P.; Chen, T.; Li, Y.Y. and Chui, H.K.(1996). Degradation of phenol in wastewater in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research* 30 (6); 1353-1360.

Goudar, T.C.; Ganji, S.H.; Basayya, G.P. and Strevett, K.A.(2000). Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water Environment Research* 72 (1); 50-55.

Ha, S.R. and Vinitinantharat, S. (2000). Competitive removal of phenol and 2,4-dichlorophenol in biological activated carbon system. *Environmental Technology* 21; 387-396.

Hwang, S. and Hanaki, K. (2000). Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. *Bioresource Technology* 71; 159-165.

Kibret, M.; Somitsch, W. and Robra, K. (2000). Characterization of a phenol degrading mixed population by enzyme assay. *Water Research* 34 (4); 1127-1134.

Min Woo, L. and Jong Moon, P. (1998). Biological nitrogen removal from coke plant wastewater with external carbon addition. *Water Environmental Research*. 70 (5); 1090-1095.

Nakamura, Y. and Sawada, T.(2000). Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75 (2); 137-142.

Wang, S.J. and Loh, K.C. (1999). Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology* 25; 177-184.

Wilén, B. and Balmér, P. (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research* 33 (2); 321-400.

Rozich A.F., Gaudy A.F. and D'Adamo P. D. (1983). Predictive model for treatment of phenolic wastes by activated sludge. *Water Research* 17; 1453-1466.

Yang R.D. and Humphrey (1975). Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 17; 1211-1235.

Capítulo 6. Degradación del fenol en presencia de metales pesados y efecto sobre el proceso de nitrificación.

CAPÍTULO 6. Degradación del fenol en presencia de metales pesados y efecto sobre el proceso de nitrificación

6.1. Introducción

El fenol es un contaminante presente en aguas residuales de diferentes tipos de industrias. Se ha encontrado en efluentes de industrias petroquímicas y en industrias de producción de resinas sintéticas donde se utiliza como materia prima para su producción. En algunos casos los metales pesados se encuentran formando parte de estas aguas residuales. Como se ha visto en el Capítulo cinco el fenol es un inhibidor de la actividad biológica en las plantas de tratamiento de aguas residuales así como para los procesos de nitrificación (Hänel, 1988). La presencia de los metales pesados incrementa la inhibición de los procesos nitrificantes a la vez que lo hace en los procesos de biodegradación de compuestos orgánicos, en este caso sobre el fenol. A elevadas concentraciones los metales pesados ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos bloqueando sus esenciales grupos funcionales o por la sustitución de los iones metálicos esenciales de las moléculas biológicas (Doelman y col., 1994). Sin embargo no se encuentran bien definidos los mecanismos, por los cuales, los metales pesados ejercen inhibición en los procesos de tratamiento biológico (Cabrero y col., 1998).

Con la realización de este trabajo se pretende estudiar de una forma global el efecto que ejercen diferentes cationes metálicos sobre la degradación biológica del fenol así como sobre el proceso de nitrificación, primeramente en ensayos en discontinuo para finalmente estudiar este efecto en un reactor de lodos activos.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Ensayos en discontinuo

En los ensayos en discontinuo, en presencia de metales pesados, se estudiaron el cadmio, el cromo, el níquel y el cinc en forma de cationes divalentes.

Los viales empleados en los ensayos tenían una capacidad de 500 mL y la cantidad de medio empleado ha sido de 100 mL. El medio utilizado ya ha sido descrito en el apartado 2.5 del Capítulo 2. El medio se encontraba tamponado con una concentración de 1250 mg NaHCO₃/L. La concentración de fenol que se ha empleado en los ensayos ha sido de 250 mg fenol/L y la concentración de N-NH₄⁺ ha sido de 60 mg/l introducida en forma de cloruro y de sulfato de amonio. El lodo estaba formado por bacterias nitrificantes (autótrofas) y por bacterias heterótrofas, las cuales no estaban adaptadas a la disolución de los diferentes metales objeto de estudio, siendo la concentración inicial de biomasa en los ensayos de 3,5 g SSV/L. Se ensayaron concentraciones de metales pesados en el rango de 0,5 a 2,5 mM. Los viales se mantuvieron termostatizados a 20°C. Para el seguimiento de los compuestos a estudiar, nitratos, nitritos y fenol, los viales se retiraron del incubador a distintos intervalos de tiempo con el fin de obtener muestras para analizar.

6.2.2. Reactor de lodos activos

El reactor de lodos activos era alimentado con agua sintética empleando una bomba peristáltica de volumen variable. El volumen útil del reactor empleado fue de 2.3 L. Las sales minerales del medio son las mismas que para el estudio en discontinuo. Las concentraciones estudiadas de los metales han variado de 0,04 a 0,45 mM. El aire era suministrado a través de un difusor y el oxígeno era controlado diariamente. El reactor era controlado mediante la medición de las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato, DQO soluble, fenol, sólidos volátiles, metales pesados, oxígeno y pH, para ello se han seguido los métodos analíticos descritos en el Capítulo dos.

6.3. Resultados

6.3.1. Isotermas de adsorción

Primeramente se realizaron los ensayos de adsorción de los metales, en el medio empleado, para ver a qué tipo de isotermas se aproximaban. La adsorción puede definirse como el consumo de moléculas por la superficie interna o externa de un sólido o por la superficie de un líquido. Esta adsorción se debe a fuerzas de tipo atractivo entre átomos o moléculas del medio y la superficie. Este proceso puede ser resultado de una

reacción química entre el adsorbente y la molécula de adsorbato, a la cual se llama quimisorción, o bien puede producirse por fuerzas de atracción débiles como lo son las fuerzas de Van der Waals, caso de la fisorción. La biosorción, que es el nombre con el cual se conoce a la eliminación de los metales pesados de disoluciones acuosas por la biomasa, se encuentra ampliamente documentada. Los iones metálicos actúan como ácidos de Lewis, aceptando pares de electrones de los ligandos. De acuerdo con Pearson, los iones metálicos pueden dividirse en dos clases dependiendo de si se forman los complejos más estables con el primer átomo de cada grupo (cationes duros, de tipo A, forman enlaces iónicos), o se forman complejos más estables con el segundo o siguientes miembros de cada grupo (cationes blandos, de tipo B, forman enlaces covalentes).

Para la descripción del equilibrio de distribución de un soluto entre las fases líquida y sólida se encuentran diferentes relaciones matemáticas. Éstas se aplican cuando las pruebas de adsorción son realizadas a temperatura constante, denominándolas isothermas de adsorción. Las isothermas más empleadas son tres según los descritos por Benefield y col., (1992).

- Isoterma de Langmuir, la cual asume que los puntos de adsorción tienen igual afinidad por las moléculas de adsorbato, existiendo una interacción despreciable entre las moléculas adsorbidas. La adsorción sólo tiene lugar en la monocapa. La expresión utilizada es:

$$1/q_c = 1/Q^0 + (1/bQ^0)(1/C_f) \quad \text{Ec. 6.1}$$

q_c = cantidad de metal adsorbido (mmol/gSSV)

Q^0 = cantidad de metal que formaría una monocapa completa (mmol/gSSV)

C_f = concentración de metal en la disolución al lograrse el equilibrio (mmol/L)

b = constante relativa a la entalpía de la adsorción (L/mmol)

- Isoterma de Freundlich, la cual asume que el adsorbente tiene una superficie con diferentes sitios de adsorción, cada uno con una isoterma. Las moléculas adsorbidas pueden desplazarse por la superficie, pudiendo existir interacciones entre las mismas. La expresión linealizada es la que se muestra a continuación:

$$\log q_c = \log K + n \log C_f \quad \text{Ec. 6.2}$$

K, n = constantes de Freundlich

- Isoterma de Brunauer, Emmett y Teller (BET). Como la isoterma de Langmuir asume que la superficie del adsorbente es uniforme, sin afectar la adsorción a los lugares vecinos. La adsorción puede darse en más de una monocapa.

La preparación de los ensayos ya se ha descrito en el capítulo dos (material y métodos) que consistía en poner en contacto una disolución catiónica del metal a estudiar con otra de lodos, midiendo a intervalos de tiempo la concentración de metal libre en el medio.

Mattuschka y Straube (1993) afirmaron que la adsorción es un proceso que sucede a gran velocidad, que en apenas treinta minutos se logra entre un 80-90% de la capacidad total de adsorción de ocho metales pesados, los cuales se estudiaron en una biomasa de origen farmacéutico. En la Figura 6.1 se muestra la evolución de la concentración de los cationes en la fase acuosa en los ensayos realizados en nuestro laboratorio. La desaparición del catión a tiempo cero confirma esa alta velocidad de equilibrio de adsorción.

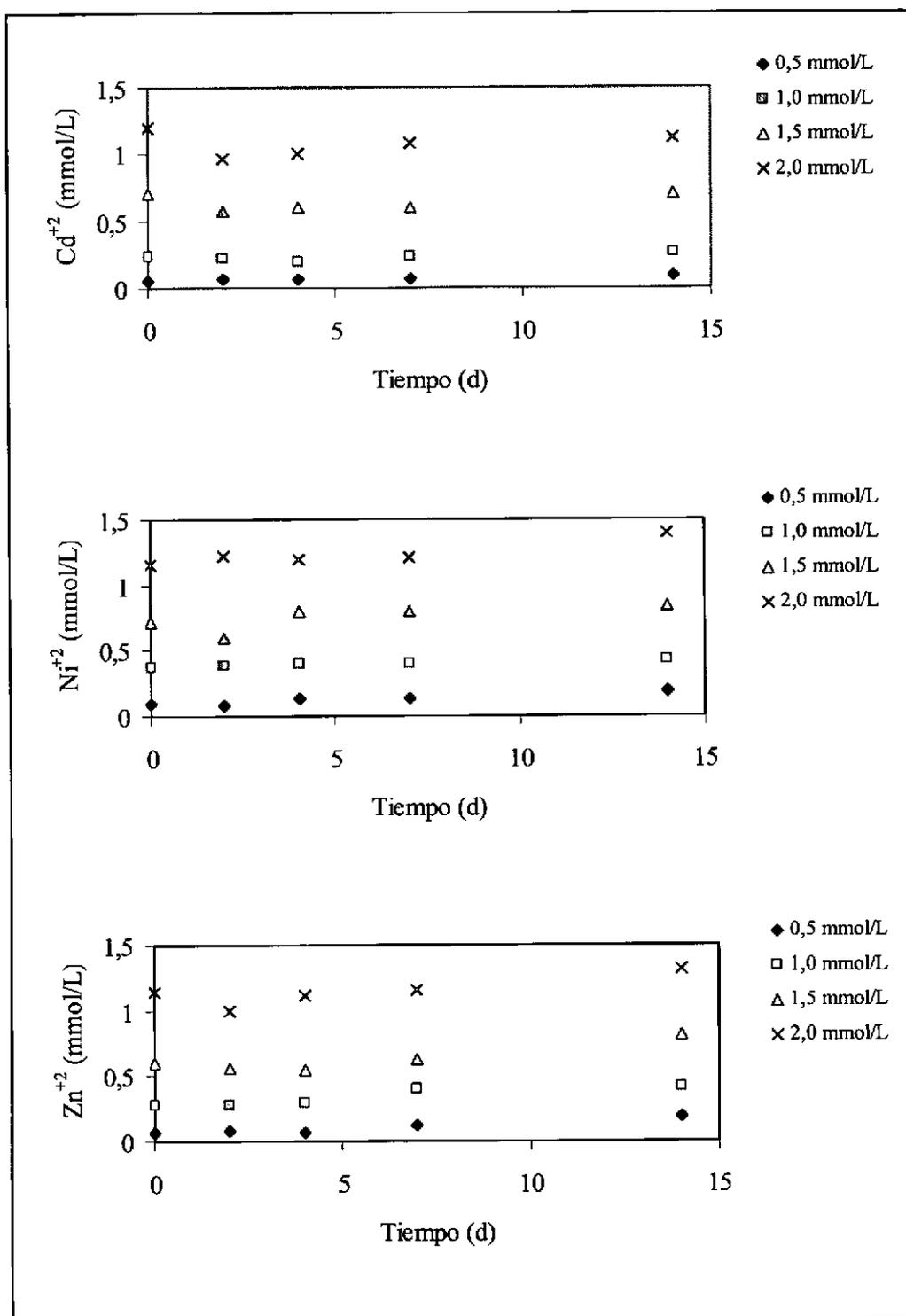


Figura 6.1. Variación de las concentraciones de metal en ensayos de adsorción.

La Tabla 6.1 recoge de forma resumida los valores de pH al inicio y al final de cada ensayo. En todos los casos se observa un descenso del pH. Autores como Mishra y col. (1998) observaron que existe un cambio en la capacidad de adsorción de cinc, cromo y mercurio por la caseína con la variación del pH. Por debajo de $\text{pH} = 3$ observaron una

inhibición importante en la adsorción del metal, esto lo explican por la competición entre los cationes metálicos y los protones por los lugares de enlace. Entonces, parece lógico que si el pH de los ensayos desciende, los cationes metálicos en disolución aumentan (ver Figura 6.1). Así mismo en la Figura 6.2 puede apreciarse que la cantidad de catión adsorbido por unidad de masa de biosorbente aumenta con el incremento de concentración del metal. Por otro lado el cadmio y el cinc se adsorben en proporciones parecidas, mientras que el níquel no tiene tanta afinidad por la biomasa.

Tabla 6.1. pH inicial y final en los ensayos de adsorción.

Concentración (mmol/L)	pH _i			pH _f		
	Cadmio	Níquel	Cinc	Cadmio	Níquel	Cinc
0,5	7,89	7,79	7,68	6,45	6,6	---
1,0	7,57	7,52	7,26	6,27	6,39	---
1,5	7,38	7,45	7,12	6,17	6,32	6,34
2,0	7,32	7,36	7,15	6,17	6,22	6,27

En la Figura 6.3 se representa el porcentaje de metal adsorbido como cociente entre el metal adsorbido (expresado como la diferencia del metal añadido inicialmente y el que permanece en disolución) y el metal teórico inicial en el medio, se observa que el porcentaje del metal adsorbido disminuye con la concentración del catión.

Si se hiciese un estudio para un rango más amplio de concentraciones de catión se observaría que:

- a) Si la concentración de biomasa en el sistema no es elevada, tras lograr la saturación de la superficie del biosorbente, si continuamos añadiendo metal, este permanece en disolución hasta llegar al límite de precipitación, a partir del cual precipitaría todo el metal añadido a mayores.
- b) Si la concentración de biosorbente es alta, a elevadas adiciones de cationes se formará el precipitado incluso aunque no se hubiese producido la saturación de la superficie (Kodukula y col., 1994).

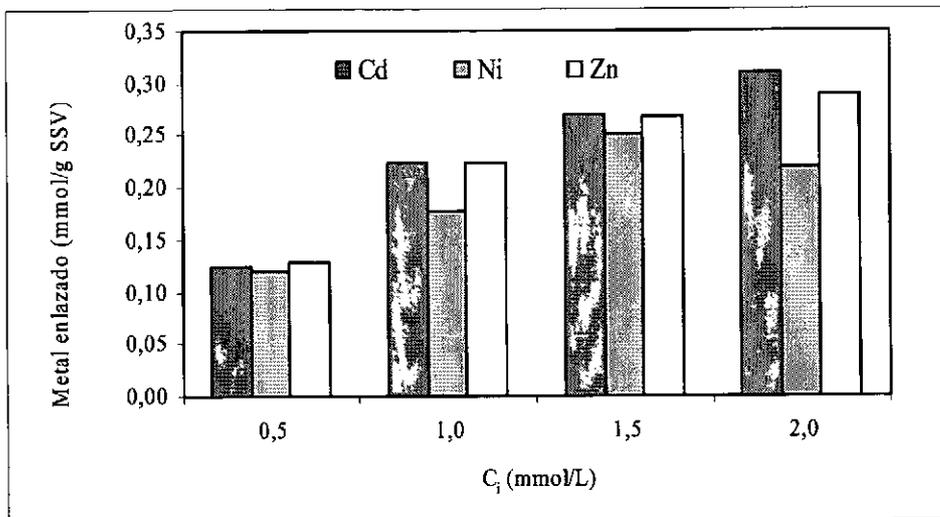


Figura 6.2. Metal adsorbido en la biomasa para las distintas concentraciones iniciales de metales.

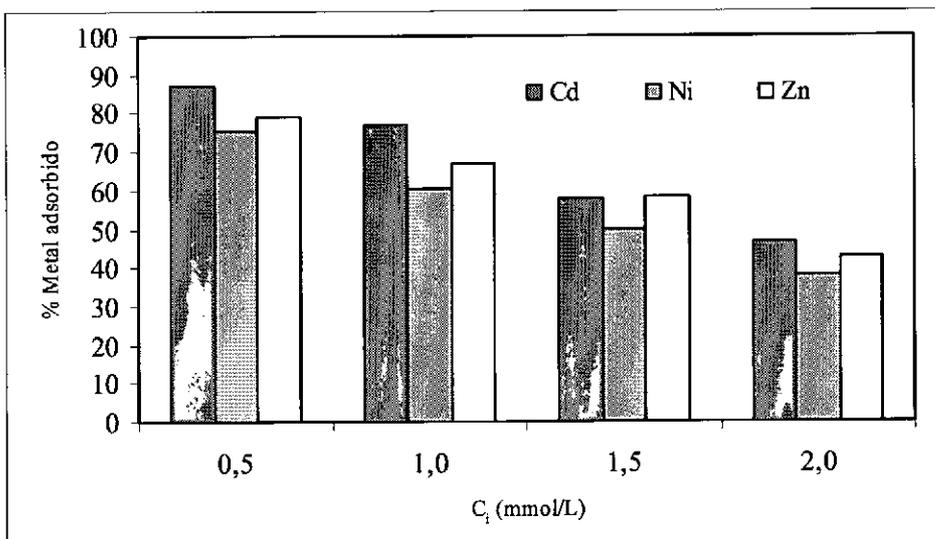


Figura 6.3. Porcentaje de metal adsorbido en la biomasa para las distintas concentraciones iniciales de metales.

En la Tabla 6.2 quedan resumidas las constantes de equilibrio para el cadmio, níquel y cinc. Para su cálculo se ajustaron los datos a las expresiones linealizadas de las isotermas de adsorción de Langmuir y de Freundlich. En los tres casos el mejor ajuste se da con la de Langmuir que se puede observar para los tres metales en la Figura 6.4. La secuencia por la afinidad de los metales por la biomasa es la siguiente: Cd > Zn > Ni. En la bibliografía no existe uniformidad respecto a las secuencias de adsorción, ya

que los biosorbentes estudiados son diferentes y también lo son las condiciones de operación, es decir, el pH, la temperatura, la concentración, etc. Así Mattuschka y Straube (1993) encontraron que la capacidad de biosorción de su cultivo era $Zn > Cd > Ni$, mientras que si seguimos la teoría de que cuanto mayor sea el índice covalente del catión mayor tiene que ser su afinidad para formar enlaces covalentes con los ligandos orgánicos, la secuencia sería $Cd > Zn$ (Brady y Tobin, 1995).

Tabla 6.2. Constantes de equilibrio basadas en las ecuaciones de Langmuir y Freundlich.

Metal	Langmuir			Freundlich		
	Q° (mmol/g SSV)	b (L/mmol)	R ²	K	n	R ²
<i>Cadmio</i>	0,305	12,333	0,9922	0,314	0,306	0,9848
<i>Níquel</i>	0,238	12,998	0,9159	0,230	0,236	0,7836
<i>Cinc</i>	0,296	13,144	0,9962	0,301	0,286	0,9712

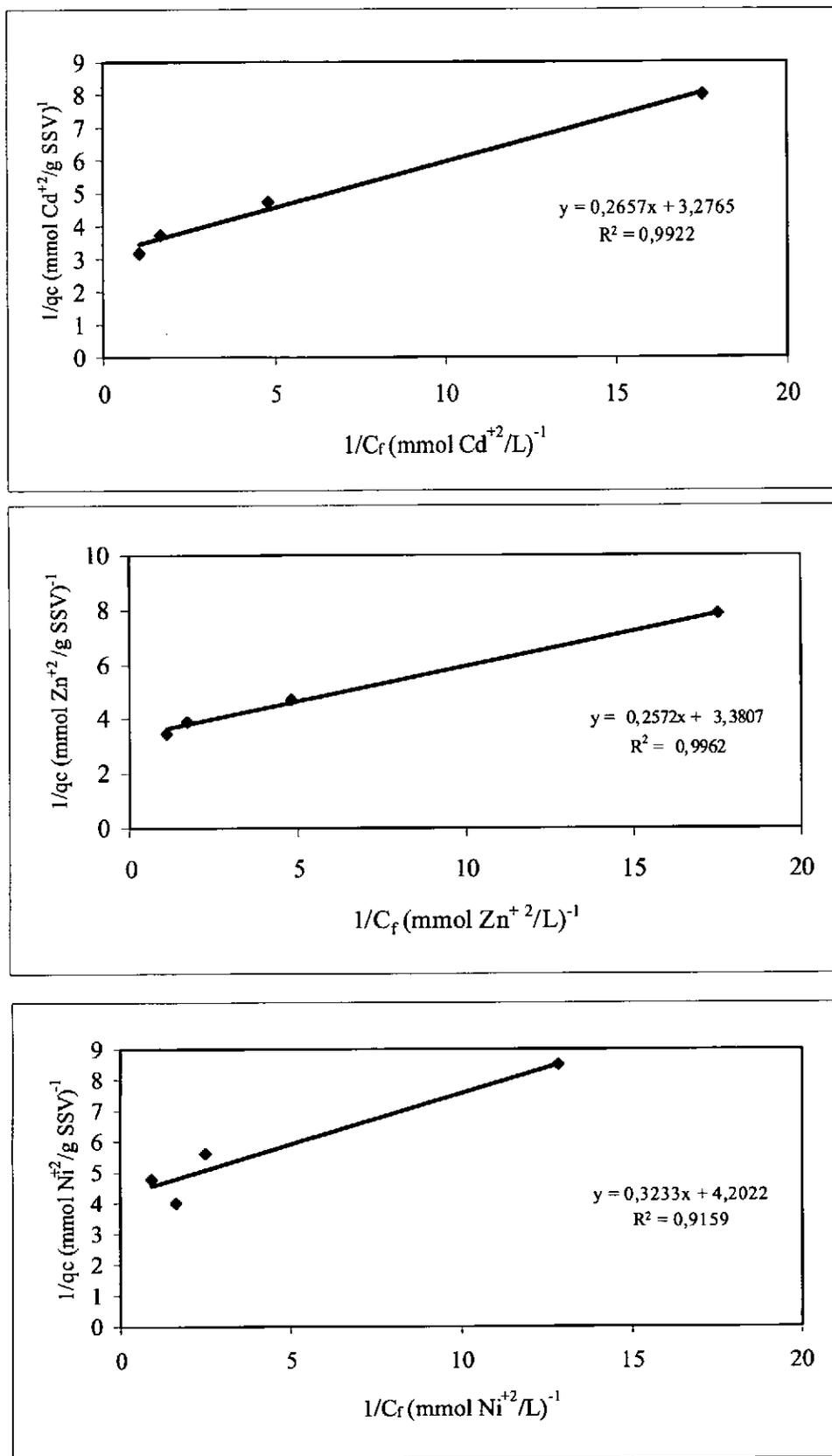


Figura 6.4. Isotermas de adsorción de Langmuir para el cadmio, níquel y cinc.

6.3.2. Efecto del cinc, cadmio, cromo y níquel sobre la biodegradación del fenol en discontinuo

La degradación del fenol, así como los resultados obtenidos para el ensayo control, se muestran en la Figura 6.5. En los ensayos control, los cuales no contenían ni biomasa ni metal, la concentración de fenol permaneció prácticamente constante a lo largo de todo el experimento, por lo que se concluye que no ha habido pérdidas por volatilización a igual que ocurre en los blancos cuya biomasa se encuentra esterilizada y sin estar presentes los metales. Como podemos observar, la degradación del fenol, sin estar presente ningún tipo de metal, fue completa al cabo de 2,3 días aproximadamente. La degradación no ha sido inmediata, sino que primero tiene lugar una aclimatación de la biomasa al tóxico. Tras este período de adaptación la degradación del fenol se produce con rapidez. En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, (Vázquez (2000)), se observó en un cultivo mixto y sin presencia de metales que el tiempo de aclimatación al compuesto tóxico estudiado incrementa al aumentar la concentración del tóxico en el medio, así por ejemplo, en los ensayos con 100 mg fenol/L éste comienza a degradarse en algo menos de un día mientras que en los ensayos con 1000 mg fenol/L no lo hace hasta transcurridos tres días.

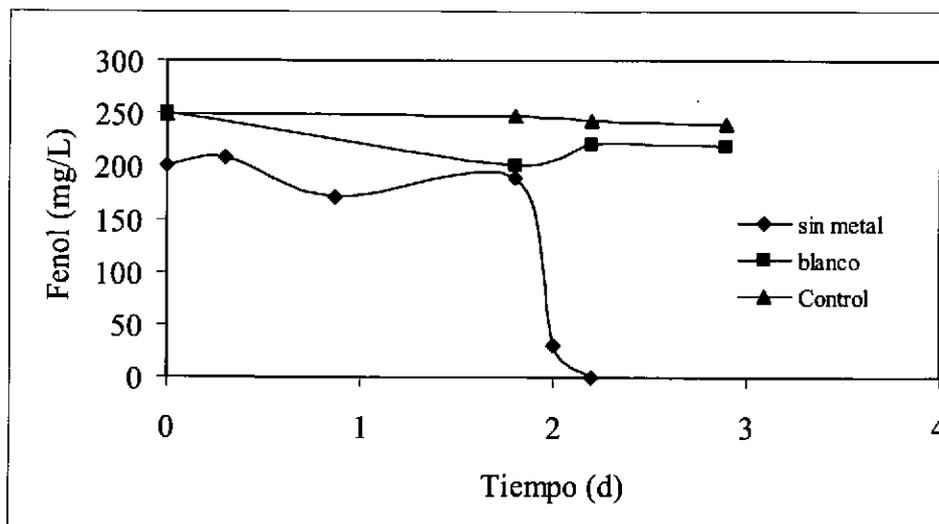


Figura 6.5. Ensayo de degradación del fenol sin metal, blanco y control.

En la Figura 6.6 son mostradas las curvas de degradación del fenol en presencia de los distintos metales, así como la curva de degradación del fenol sin estar presentes los cationes metálicos objeto de estudio.

En los ensayos con el cinc se observó un efecto importante de concentraciones del metal sobre la biodegradación del fenol. Para la menor concentración estudiada de cinc (0,5 mM) no se observa ninguna inhibición en la biodegradación del fenol, mientras que al ir aumentando la concentración del metal hasta una concentración final de 2,0 mM, se produce un retraso en la degradación de fenol, siendo la velocidad de degradación más baja.

Se observa que el metal cadmio inhibe la degradación del fenol. Este efecto inhibitorio es prácticamente el mismo para cada una de las concentraciones de metal, las cuales han sido de 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM y 2,0 mM de cadmio, observándose un incremento en el tiempo de aclimatación de los microorganismos al medio, al aumentar la concentración de metal. La velocidad de degradación del fenol es la misma en el ensayo sin metal así como para las distintas concentraciones.

El níquel fue el metal que más toxicidad ejerció sobre la biodegradación del fenol. El período de aclimatación del lodo al medio fue mayor que para los otros metales, de unos tres días, pero degradándose rápidamente el fenol una vez aclimatado, en apenas un día. No se observó una diferencia significativa en la velocidad de desaparición del tóxico para las diferentes concentraciones del ión metálico.

El cromo, como puede observarse en la Figura 6.6, ha sido el metal que menos toxicidad ha ejercido sobre la biodegradación del fenol. Apenas se observan efectos importantes en la degradación del compuesto a estudiar al ir aumentando la concentración de dicho metal en el medio. La degradación del fenol como refleja la figura tiene lugar casi al mismo tiempo debido a que el período de aclimatación del lodo a este metal pesado ha sido menor que en los demás metales estudiados. La degradación del fenol ha sido similar para las diferentes concentraciones de metal en el medio. Una vez conseguido el período de aclimatación la degradación tuvo lugar rápidamente.

Por lo tanto en estos ensayos en discontinuo, el níquel fue el metal que ejerció mayor inhibición en el proceso de biodegradación del fenol. El cadmio y el cinc en concentraciones intermedias, de 1,0 y 1,5 mM, tuvieron los mismos efectos inhibitorios. Respecto al cromo, fue el metal pesado que menos efecto inhibidor ejerció sobre la degradación del fenol.

En un estudio realizado con una mezcla de lodos procedentes de una refinería y de una planta de producción de resinas, se observó que el níquel mostró el mayor nivel de inhibición en la degradación de fenol siendo de un 70 % para la concentración más baja estudiada (0,5 mM) y de un 85 % para la concentración más alta (2,5 mM). El cromo fue el metal menos tóxico con un nivel de inhibición por debajo del 15 % para la concentración de 2,5 mM, mientras que para el cinc y para el cadmio se obtuvieron niveles intermedios de inhibición (Amor y col., 2000).

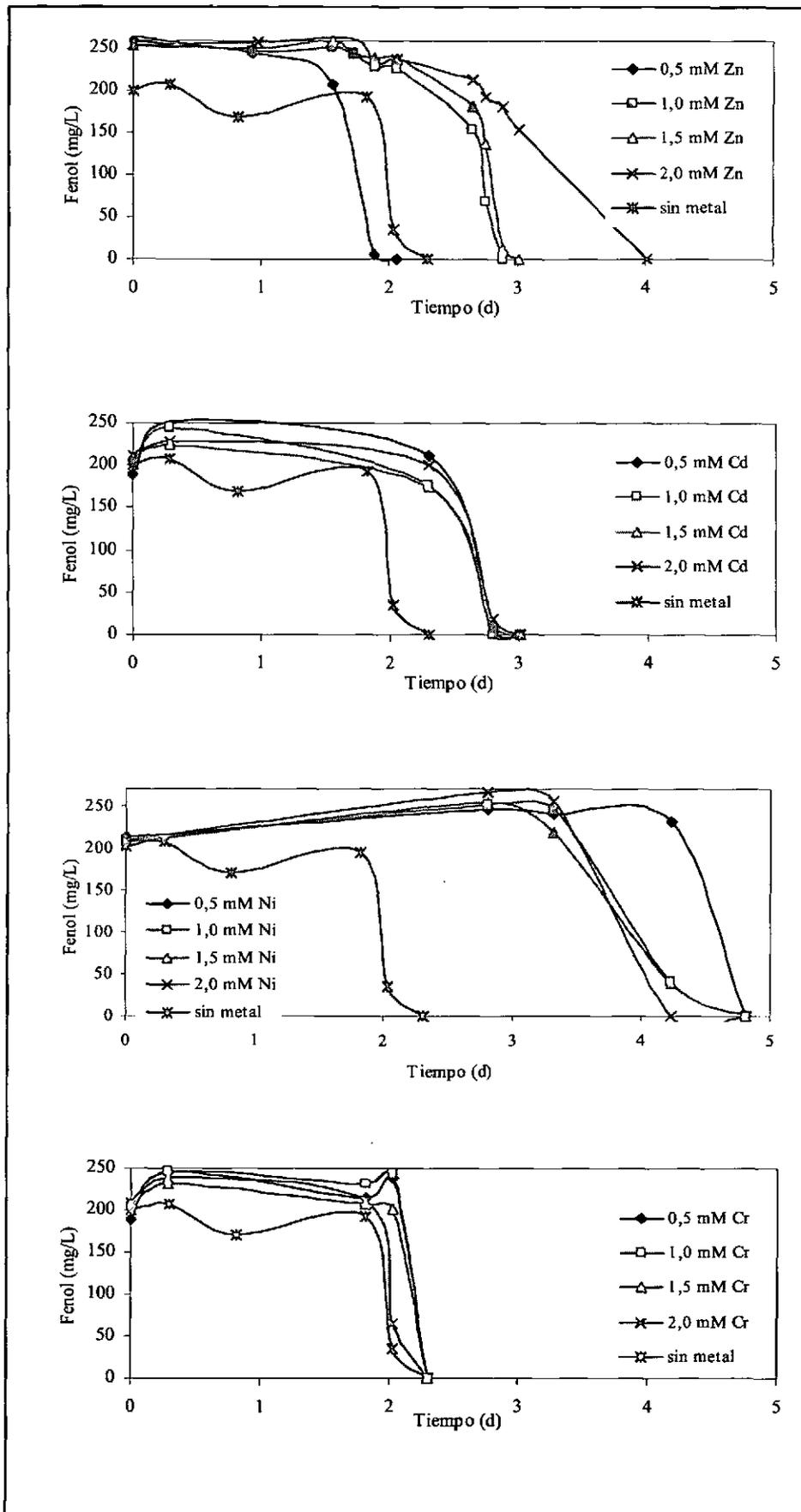


Figura 6.6. Degradación del fenol para las diferentes concentraciones de metal.

6.3.3. Efecto de los metales sobre la nitrificación en discontinuo

La presencia de los metales pesados en el efluente puede afectar al proceso de nitrificación, causando inhibición. Se realizaron una serie de ensayos de nitrificación en presencia de fenol y de metales pesados en diferentes concentraciones. Se realizó un ensayo de control sin metales.

En las gráficas 6.7, 6.8, 6.9 y 6.10 se presentan los ensayos de nitrificación en presencia de cinc, cadmio, cromo y níquel. Existe un período de retardo en el proceso de nitrificación, seguidamente aparece la formación de los nitritos como producto intermedio. La concentración de nitrato es superior a la concentración inicial y teórica de 60 mg/L, debido a su presencia en los lodos utilizados para realizar los ensayos, como se ha explicado en el apartado 6.3.2.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para el ensayo de degradación del fenol sin estar presente los metales, también aparece nitrito, aunque a menor concentración, por lo que se confirma que el fenol ejerce un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante.

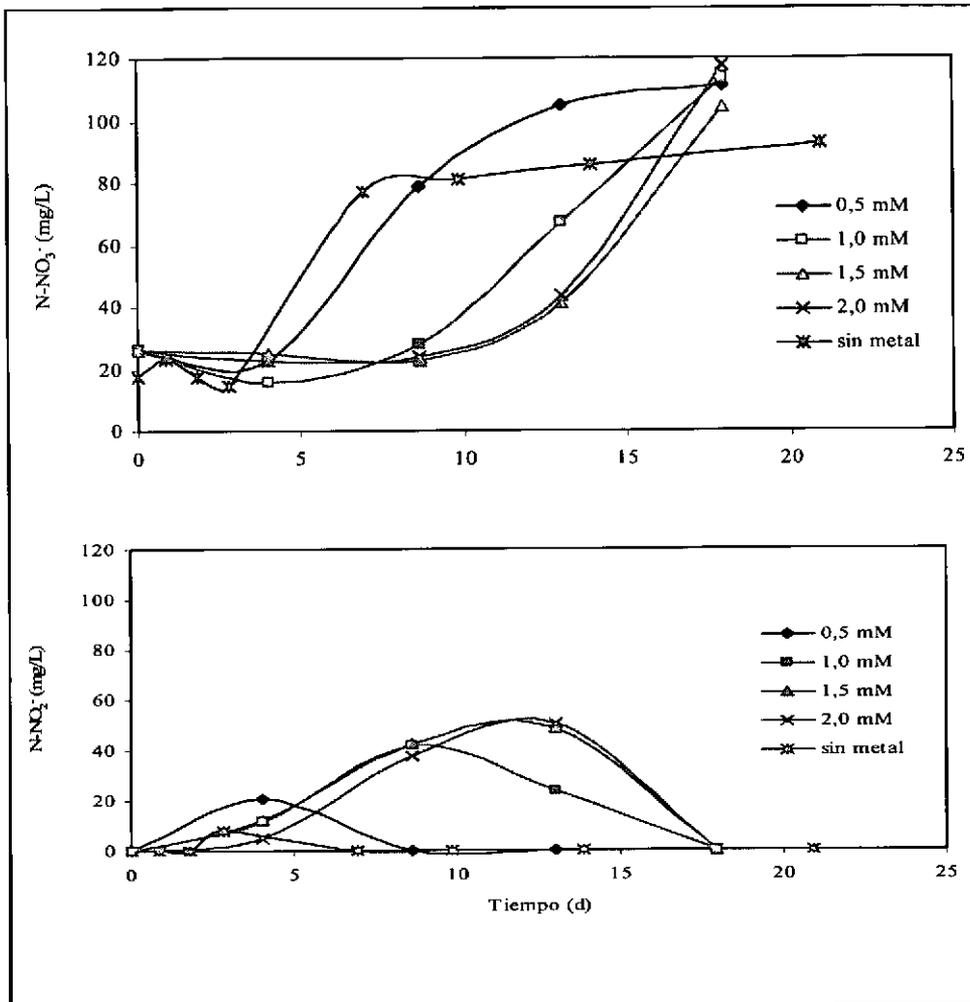


Figura 6.7. Curvas de nitrificación para el ensayo con el metal cinc.

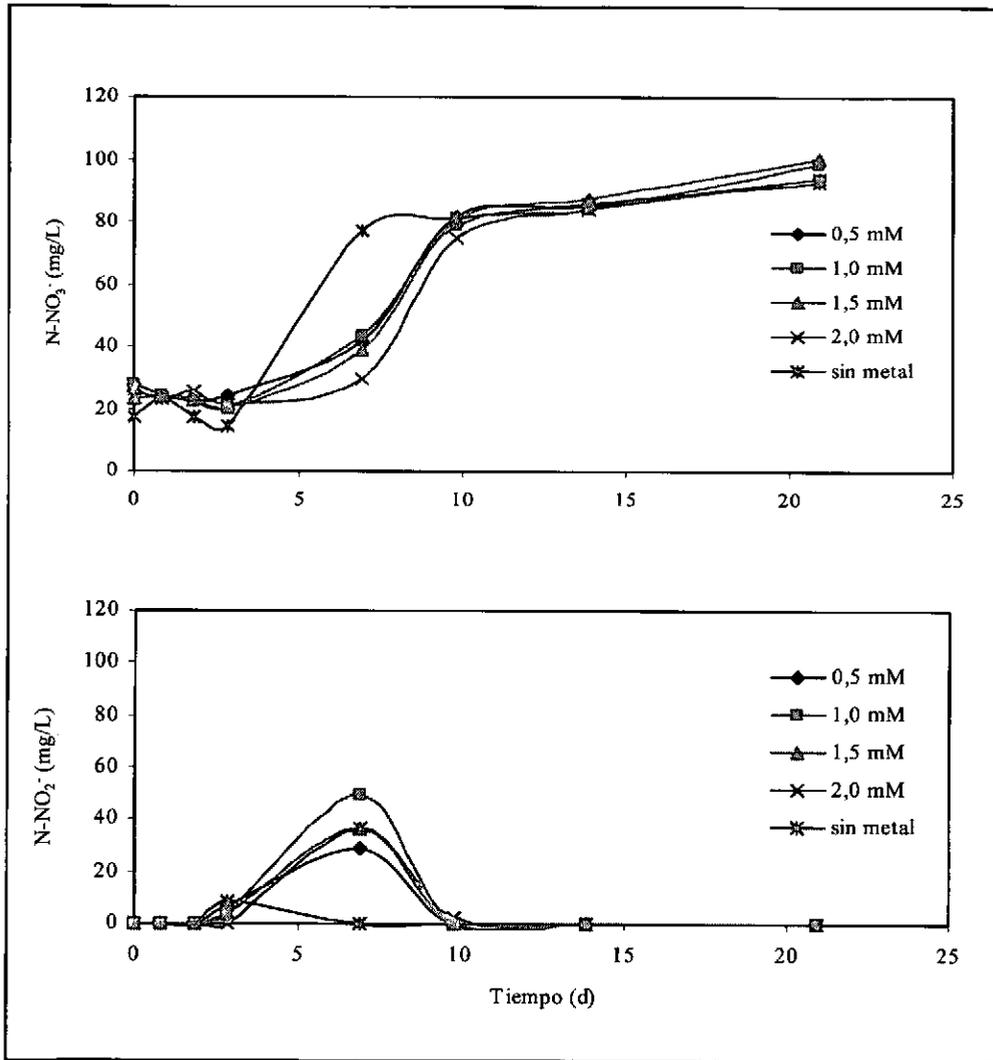


Figura 6.8. Curvas de nitrificación para el ensayo con cadmio.

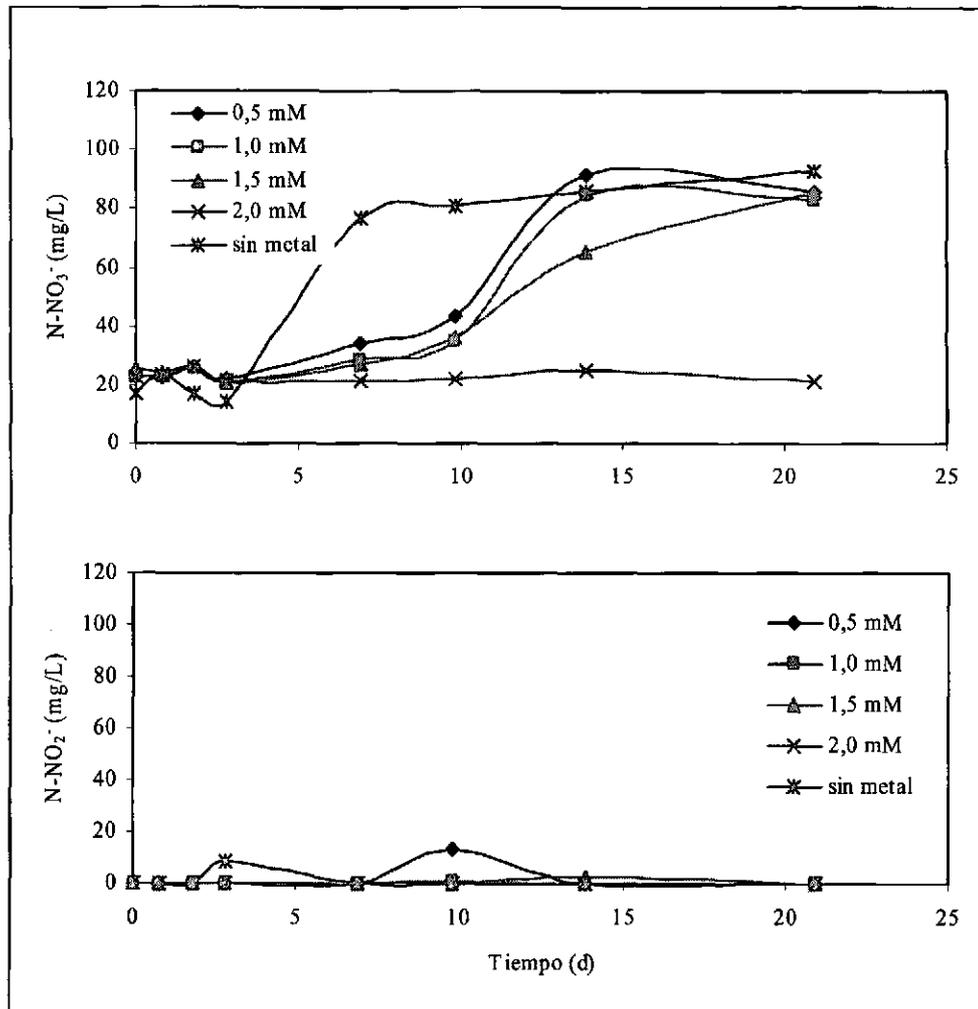


Figura 6.9. Curvas de nitrificación para el ensayo con el metal níquel.

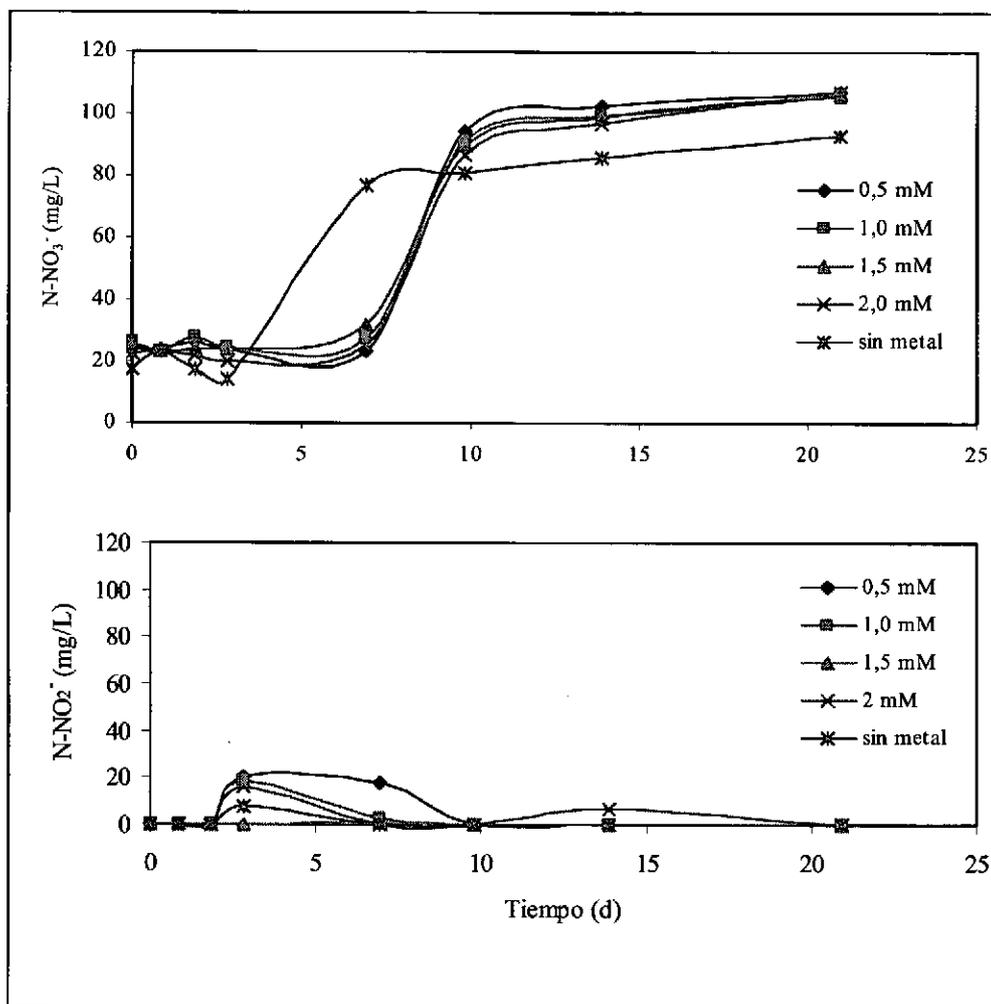


Figura 6.10. Curvas de nitrificación para el ensayo con el metal cromo.

A la vista de los resultados aquí presentados podemos concluir lo siguiente:

En cuanto al cinc y al cromo, se puede observar como son los metales que menor toxicidad ejercieron sobre el proceso nitrificante, llevándose a cabo la nitrificación aunque ejerciendo un efecto mayor sobre las bacterias nitrato oxidantes, ya que las concentraciones intermedias de nitrato van en aumento desde 20 a 50 mg N-NO₂⁻/L al pasar de 0,5 a 2 mmol Zn⁺²/L en el caso del cinc y no superándose los 20 mg N-NO₂⁻/L en el caso del cromo. También se observó que al comenzar la nitrificación para las concentraciones de 1,5 mM y de 2,5 mM de cinc, la nitrificación sufre un retraso, iniciándose a partir del día doce.

Respecto al cadmio, este metal ejerce un efecto inhibitor sobre el proceso de nitrificación ya que la concentración de nitrito es bastante alta, superando los 20 mg N-NO₂⁻/L en casi todas las concentraciones estudiadas. La oxidación de los compuestos nitrogenados comienza más tarde que para los ensayos sin metal, siendo el porcentaje de nitrificación del 90% (en el día 20 del ensayo).

El níquel es el metal que mayor toxicidad ejerció sobre este proceso, no superándose el 80% de nitrificación y sucediendo una inhibición completa de la nitrificación a la concentración más alta de níquel.

A igual que para la biodegradación del fenol en los procesos en discontinuo, el níquel ha sido el metal que ejerció un mayor efecto inhibitorio en el proceso nitrificante.

Finalmente, respecto a los metales cadmio y cinc poseen una toxicidad similar, aunque el cinc presenta concentraciones de nitrito superior a las del cadmio y necesitan mayor tiempo de aclimatación. Y el cromo ha sido el metal con menor efecto inhibitor para el proceso nitrificante. Benmoussa y col. (1986) observaron que concentraciones superiores a 5 mg Ni⁺²/g SSV en ensayos en discontinuo provocan más de un 87% de inhibición sobre la nitrificación, expresada como relación entre las velocidades máxicas de nitrificación, y una concentración de cadmio de unos 15 mg Cd⁺²/g SSV causa un 45% de inhibición.

Si recordamos, en el estudio de adsorción (6.3.1) el metal menos adsorbido era el níquel siendo el que posee un mayor efecto inhibitorio tanto sobre la biodegradación de fenol, como sobre la nitrificación. En cambio, el cadmio y el cinc son adsorbidos en una proporción similar siendo su efecto inhibitorio menor que para el caso del níquel. Battistoni y col. (1993) también observaron que en su sistema jar test, la secuencia de afinidad de los lodos por los metales seguía este orden: Hg>Cd>Ni; lo cual parece ser contrastado con el resultado obtenido para la toxicidad que sigue la secuencia: Hg>Ni>Cd. Considerando esto, concluyen que el mercurio se adsorbe preferentemente en las células, mientras que el cadmio es adsorbido por polímeros extracelulares y el níquel por polímeros capsulares y por la pared celular. Teniendo en cuenta que sólo el metal soluble es el que ejerce mayor toxicidad sobre los microorganismos, según Sujarittanonta y Sherrard, 1981, se estaría apoyando en que el metal menos adsorbido

será el que mayor concentración presentará en el medio y por lo tanto será el más tóxico. Un comportamiento parecido fue encontrado por otros autores como Hassen y col. (1998) ya que la secuencia de toxicidad en sus ensayos fue la siguiente: Hg>Co>Cd>Cu-Cr>Zn; y la de la adsorción fue: Hg>Cu>Cd-Zn>Co-Cr.

Ensayos de nitrificación en presencia de cinc a concentraciones bajas (0.08 mM a 0.31 mM)

Se realizó un estudio de nitrificación y biodegradación de fenol a bajas concentraciones de cinc. Cabrero y col. (1998) observaron que 10 mg/L de cinc causan una reducción del 15 % de producción de biomasa mientras que una concentración de 1 mg/L de cinc causa una estimulación de un 5 % en el crecimiento bacteriano. Benmoussa y col. (1986) notifican que concentraciones mayores de 3,5 mg/g SSV de cinc provocan un 25 % de inhibición en el proceso de nitrificación en ensayos en discontinuo, sin detectar concentraciones estimuladoras. Estos datos, junto el hecho de tener que poner en marcha el reactor de lodos activos en un primer lugar con bajas cargas de este metal, hacen atractivo desarrollar los ensayos en discontinuo para bajas concentraciones de cinc.

Los ensayos se realizaron igual que los anteriores, pero la concentración del fenol es de 270 mg/L. Las concentraciones de cinc fueron de 0,08, 0,15, 0,23 y 0,31 mM. En la figura 6.11 se observa que las curvas de biodegradación aerobia de fenol son similares para las distintas concentraciones de metal. Se observa un efecto estimulador para la concentración de 0,08 mM de cinc, habiendo inhibición para el resto de concentraciones de las concentraciones de cinc estudiadas. En cuanto a la nitrificación (Figura 6.12), en todos los casos la concentración intermedia de nitritos es superior a la del ensayo sin metal. Los porcentajes finales de nitrificación oscilan entre el 92,3 % para 0,08 mM de cinc y el 88,2 % para 0,23 y 0,31 mM de cinc.

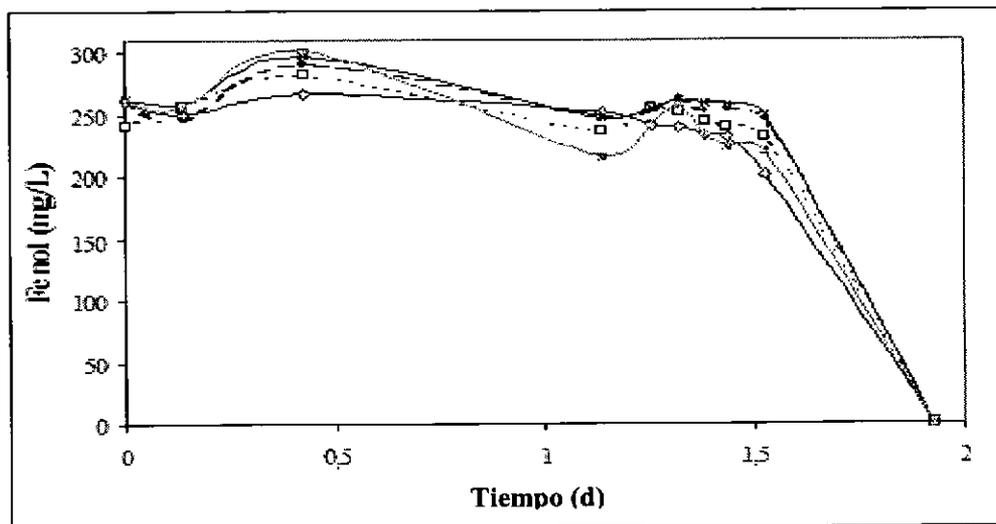


Figura 6.11. Degradación de fenol para bajas concentraciones de cinc. (\diamond) 0,08 mM; (\square) 0,15 mM; (\bullet) 0,23 mM; (\times) 0,31 mM y ($*$) sin cinc.

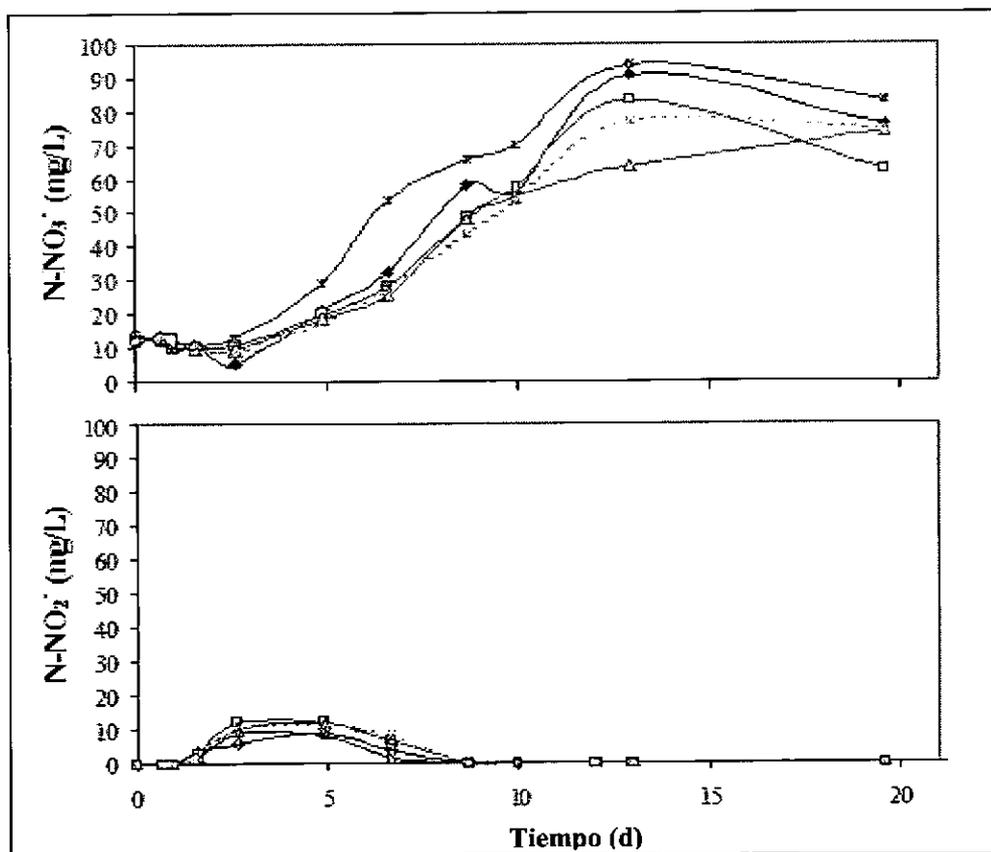


Figura 6.12. Curvas de nitrificación para bajas concentraciones de cinc. (\diamond) 0,08 mM, (\square) 0,15 mM, (Δ) 0,23 mM, (\times) 0,31 mM, ($*$) sin cinc.

6.3.4. Ensayos aerobios en un reactor de lodos activos en presencia de metales pesados (cadmio, cromo, níquel y cinc)

Los ensayos en el reactor de lodos activos, se llevaron a cabo con el fin de poder estudiar en continuo el efecto de los metales pesados sobre el cultivo mixto de bacterias nitrificantes y de bacterias heterótrofas degradadoras de fenol, en un rango comprendido entre 0,04 mM y 0,45 mM.

La alimentación del reactor estaba formada por nutrientes, micronutrientes, cloruro y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, metales pesados, fenol como fuente de carbono y bicarbonato sódico como disolución tampón y fuente de carbono. El sistema se mantuvo en una cámara termostatazada a $21,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El caudal de alimentación se mantuvo entorno a los 35 ml/h y el volumen útil del sistema fue de 2,3 litros, correspondiente a un TRH de 2,5 días. En la Figura 6.13 se puede observar la evolución de estos parámetros. Los valores de TRH punta son debidos a problemas de obturación en las gomas de alimentación.

La primera fase del estudio consistió en ir variando la concentración de metales pesados en el reactor, manteniendo constante la concentración de la fuente de carbono en torno a unos 50-100 mg fenol/L, correspondientes a una velocidad de carga orgánica de 0,02-0,04 g fenol/L/d. La concentración de los metales varió desde 0,04 mM hasta 0,45 mM. En la Tabla 6.3 se indican las concentraciones de fenol y de metal empleadas en la alimentación. Las concentraciones de metales pesados se eligieron por ser un rango adecuado en el que es habitual encontrarlas. Cuando se comenzó a operar el reactor, la concentración de biomasa era aproximadamente de unos 3,5 g SSV/L. En la Figura 6.14 se representa la evolución de este parámetro, apreciándose como durante todo el proceso de experimentación la concentración de biomasa va descendiendo, a pesar de haber aumentado la carga orgánica, esta pérdida comienza a partir del día 18 una vez que el primer metal ha sido introducido en la alimentación.

De forma análoga se operó un reactor en presencia de concentraciones crecientes de cinc, en un rango que varió de 0,05 mM hasta 1,5 mM con una concentración de fenol de 275 mg/L.

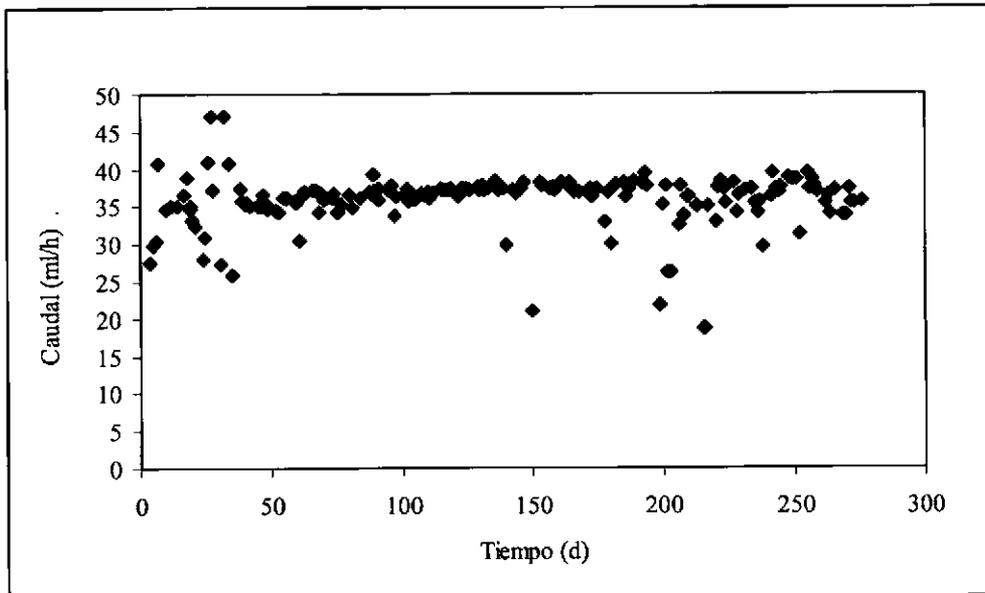


Figura 6.13. Representación del caudal en el reactor de lodos activos empleado.

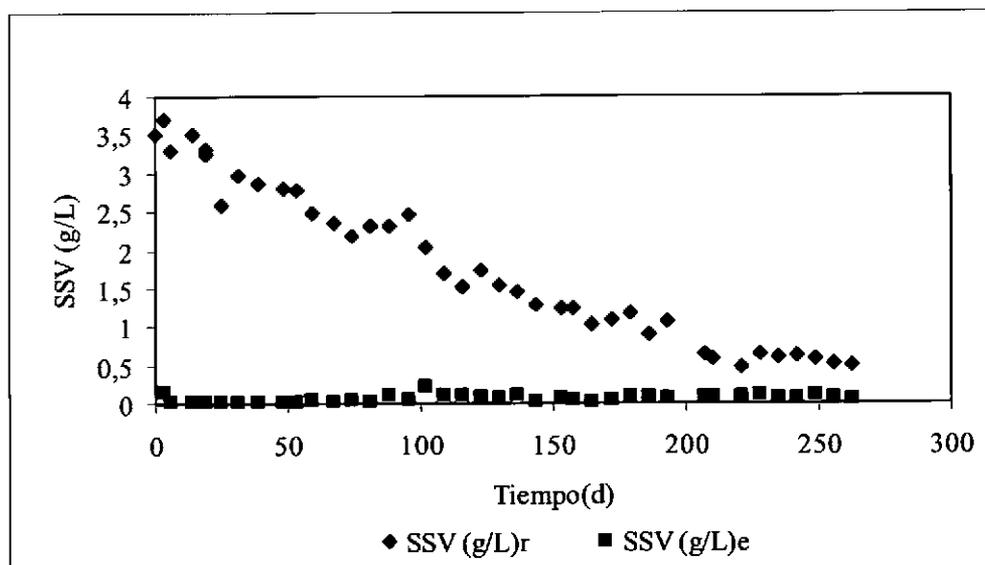


Figura 6.14. Evolución de la biomasa en el reactor y en el efluente.

Tabla 6.3. Concentraciones de metales y fenol en la alimentación

Tiempo (d)	Metal	C ₆ H ₆ O (mg/L)	Concentración metal (mM)
0-10	Sin metal	50	0
11-34	Zn	50	0,05
36-90	Zn	50	0,10
101-111	Cr	50	0,05
114-118	Cr	50	0,10
120-138	Cr	50	0,25
139-167	Cr	100	0,10
170-174	Cr	100	0,32
177-200	Cr	100	0,10
205-220	Ni	50	0,05
221-230	Ni	100	0,25
233-237	Ni	100	0,45
240-265	Ni	100	0,25
270-296	Cd	50	0,04
299-319	Cd	100	0,05
321-342	Cd	100	0,25
345-350	Cd	100	0,45
352-432	Cd	100	0,25

Tras el aumento de la concentración del oxígeno en el decantador, se produjo de nuevo la flotación de los lodos, y como consecuencia sigue detectándose la concentración de sólidos en el efluente, aunque este incremento no fue pronunciado, alcanzándose concentraciones de hasta 0.20 g/L. Neufeld en 1976 estudió en ensayos en discontinuo el efecto que ciertas dosis de metales, como son el mercurio, el cadmio y el cinc, ejercían sobre las características de los lodos. Concluyó basándose en el índice volumétrico de los lodos (SVI) que los metales inicialmente tenían un efecto beneficioso que mejoraba la capacidad de compactación, es decir, la sedimentabilidad del lodo. Observando las curvas de floculación, notificaron claramente que no todo el lodo sedimentaba, sino que había una defloculación de la biomasa, originando una pérdida continua de biomasa en el efluente. En nuestro caso ocurre también una defloculación del lodo, por lo que estamos perdiendo continuamente biomasa en el

efluente y la biomasa en el reactor no se incrementa, sino que como podemos ver, disminuye paulatinamente. Esto confirma que los metales ejercen un efecto negativo, ocurriendo una defloculación y perdiéndose la biomasa con el efluente continuamente.

Otro factor importante controlador de los procesos biológicos es el pH. La evolución de este parámetro viene reflejado en la Figura 6.15, en la cual podemos observar que el pH del reactor osciló entre 7,4 y 8,0. Se observa sin embargo, que a los pocos días de la puesta en funcionamiento del reactor, el pH llegó hasta valores más altos de 8,0. Este incremento fue debido a que en el reactor primeramente existía una alcalinidad de 1250 mg NaHCO_3/L , que posteriormente se mantuvo comprendida entre 610 y 840 mg/L.

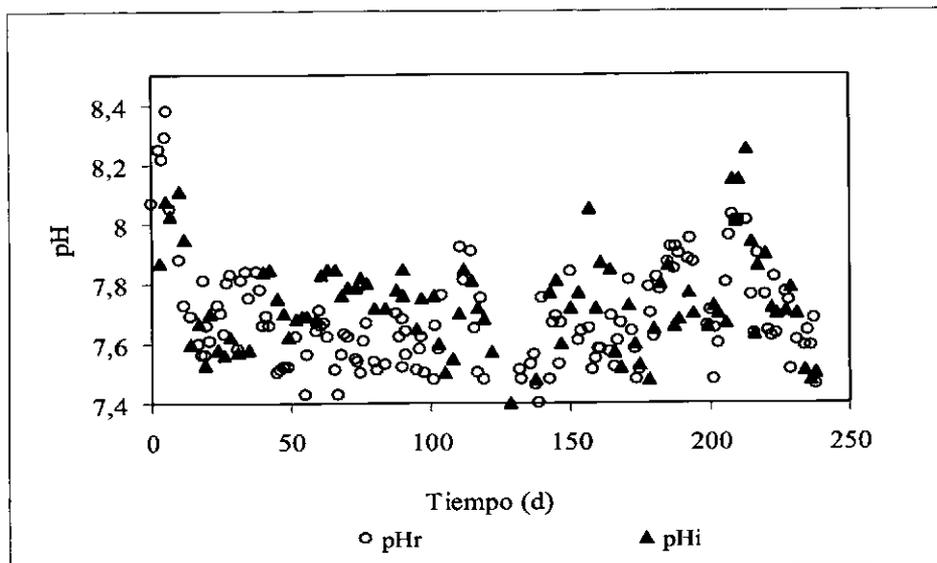


Figura 6.15. Evolución del pH en el influente y en el reactor.

En la Figura 6.16 se aprecia como la concentración de oxígeno en el reactor se mantuvo entre valores de 7,5 y 8,5 mg O_2/L . Autores como Neufeld y Hermann (1975) indicaron que una planta de tratamiento de aguas que recibe cationes metálicos precisa menos concentración de oxígeno, pues al trabajar a velocidades de degradación más bajas si el sistema se encuentra inhibido, la biomasa precisa menor cantidad de oxígeno. Pero en este caso la concentración de oxígeno se siguió manteniendo por existir una degradación entorno al 95 %.

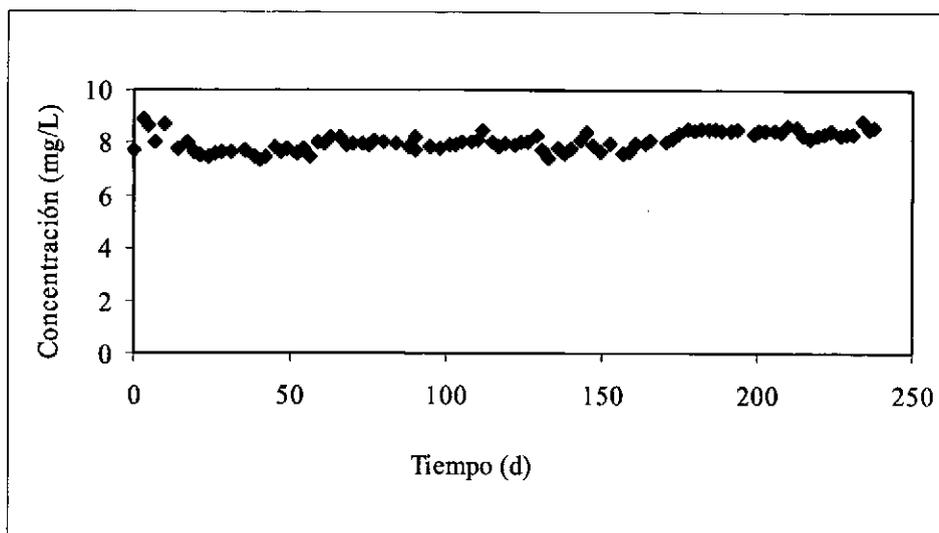


Figura 6.16. Concentración de oxígeno en el reactor de lodos activos.

Ensayo con concentraciones de cinc en un rango de 0,05 mM hasta 1,5 mM

Este estudio se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de cinc, y alimentando con una concentración de fenol de 275 mg/L. Las condiciones de operación del reactor de lodos activos fueron similares a las del ensayo anterior operando a un TRH de 2,4 días. En la figura 6.17 se muestra la concentración de sólidos, apreciándose un incremento de éstos en el reactor con el aumento de la carga orgánica. También se observa una desestabilización del sistema cuando se dejó de alimentar con el metal (día 250 de operación), produciéndose un lavado de lodos que se puede apreciar por el brusco descenso de sólidos en el reactor. Igualmente se observa un cambio morfológico en el lodo, inicialmente era de color marrón oscuro y al ir aumentando la carga de cinc se fue aclarando.

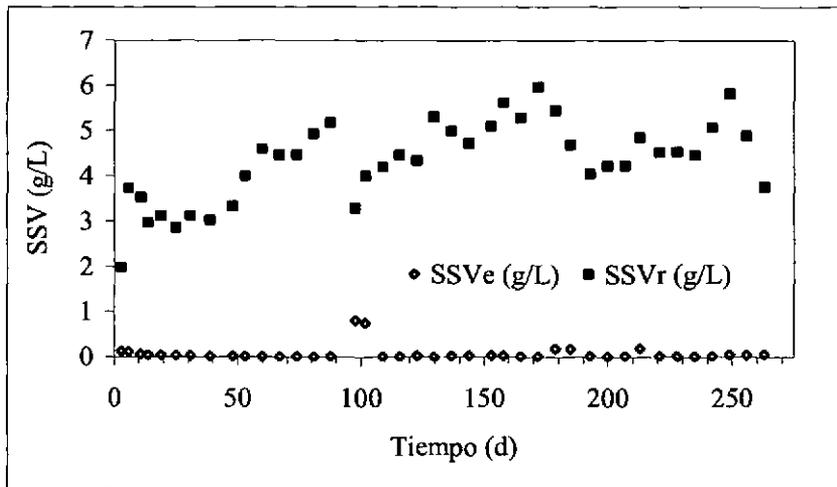


Figura 6.17. Evolución de la concentración de los sólidos en suspensión volátiles en el reactor y en el efluente.

En la Figura 6.18 se representa la evolución del pH durante el período de operación. El pH del reactor osciló entre 7,3 y 8,0, predominando valores superiores a 7,5. A medida que aumenta la concentración de cinc disminuye el valor de pH en la alimentación, debido a que el catión se introduce desde una disolución ácida del mismo. En el día 235 hay un descenso del pH en el reactor, en valores por debajo de 7,5, que coincide con la introducción en el sistema de una concentración 1,5 mM de cinc.

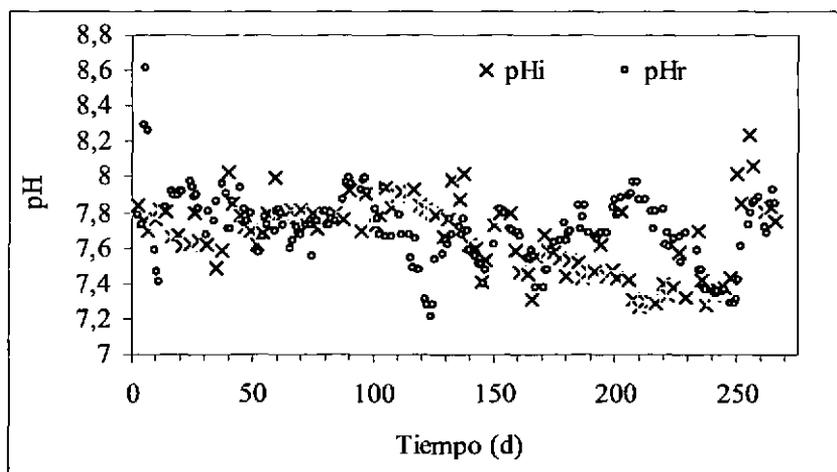


Figura 6.18. Evolución del pH en el influente y en el reactor.

En el día 250 se retira el cinc de la alimentación y se observa una recuperación del pH. La pérdida de poder tampón del sistema a una elevada concentración de cinc puede ser debida a la precipitación de carbonatos en la alimentación. Para confirmar este hecho se

realizaron ensayos en discontinuo con diferentes sales susceptibles de precipitar (fosfatos, sulfatos y bicarbonatos) en la alimentación. Se observó la presencia de precipitado en los viales con bicarbonato, corroborándolo con las medidas del metal soluble en absorción atómica.

6.3.5. Concentración metal soluble

Los cationes metálicos fueron introducidos en el medio como Zn^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+2} y Ni^{+3} . Estos cationes se prepararon a partir de disoluciones ácidas de los cloruros correspondientes a dichos metales. El medio ácido contenía 1,5 mL de ácido nítrico concentrado por litro de disolución. Las concentraciones de los metales después del estudio previo en los ensayos en discontinuo, se decidieron introducir en el medio un intervalo de concentración que fue desde 0,04 mM hasta 0,45 mM.

En las Figuras 6.19 y 6.20 se muestran las cargas de metal que se introdujeron en el reactor, apreciándose que el valor teórico de la concentración de los metales en la alimentación, no se corresponde exactamente con la medida experimental. Este hecho puede ser consecuencia de la formación de un precipitado que es visible a partir de una concentración de 0,10 mM de metal. Barth y col. (1965) encontraron que en una planta piloto el 90% del cinc soluble añadido era convertido a una forma insoluble en el decantador primario. Las concentraciones de los metales tanto en el influente, en el reactor como en el efluente, tiene variabilidad, y el comportamiento de los mismos es diferente. En el reactor se establece un equilibrio entre los cationes libres de los metales, los ligandos tanto orgánicos como inorgánicos solubles y la fase sólida. Por lo cual, la concentración de los metales en cada fase puede ser alterada por un desplazamiento de dicho equilibrio. Kodukula y col. (1994) concluyeron que esta variación puede deberse a la variación del pH, del contenido en sólidos o de la concentración de ligandos. Modelos matemáticos existentes como el de Ghirardini y col. (1992) predicen cómo se puede eliminar el metal soluble y el particulado que entra en una planta de lodos activos, así como la distribución entre la fase sólida y la fase líquida. Sin embargo, otros autores como Goldstone y col. (1990) observaron en un reactor de una planta de tratamiento de aguas residuales, el cinc, introducido en el reactor en estado soluble, con una concentración de 0,0015 mM, no se encontraba afectado por los diferentes procesos del tratamiento de un sistema de lodos activos.

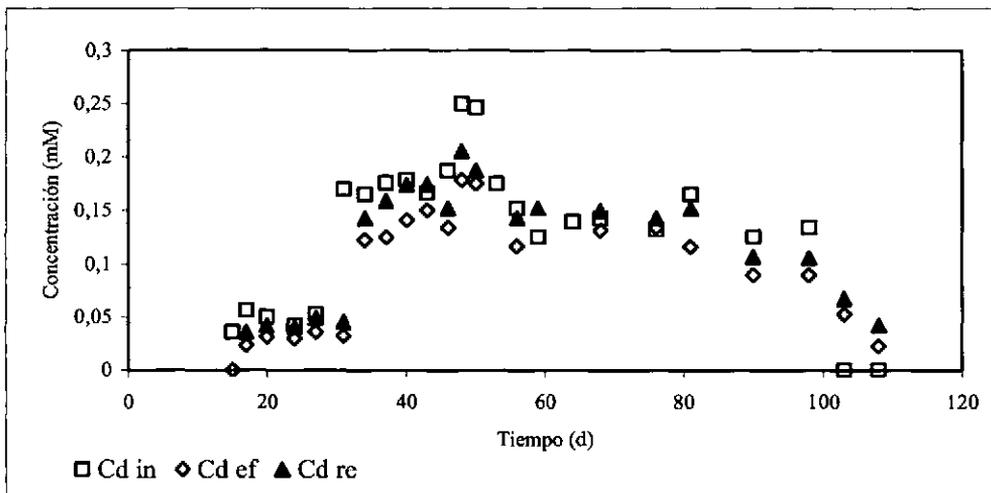


Figura 6.19. Representación de las concentraciones de cadmio en el influente, efluente y en el reactor de lodos activos.

Barth y col. (1965) observaron que no existe eliminación neta del metal si los lodos del sistema de tratamiento de las aguas no son eliminados de la línea de flujo. Este hecho lo confirman las Figuras 6.19 y 6.20 donde podemos encontrar en el efluente concentraciones de metal soluble, resultando por tanto que los procesos convencionales de lodos activos no son muy eficientes a la hora de eliminar metales.

Asimismo, se determinó la concentración de metales en los lodos. Para ello se tomaron muestras de la biomasa del reactor y se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 r.p.m. El sobrenadante fue eliminado y el residuo sólido fue sometido a digestión ácida durante 24 horas y a una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de probar distintos métodos de extracción ácida se optó por utilizar HCl 0,1 M. Mattuschka y Straube (1993) estudiaron diferentes ácidos y agentes complejantes con el fin de recuperar los metales adsorbidos en el lodo y regenerar la biomasa, concluyendo que el cobre y el plomo pueden ser extraídos eficazmente con 0,1 y 2,5 mol HCl/L respectivamente, y sin provocar estrés químico a las células. Esta determinación se realizó para comprobar la existencia de una adsorción de los metales por parte de la biomasa.

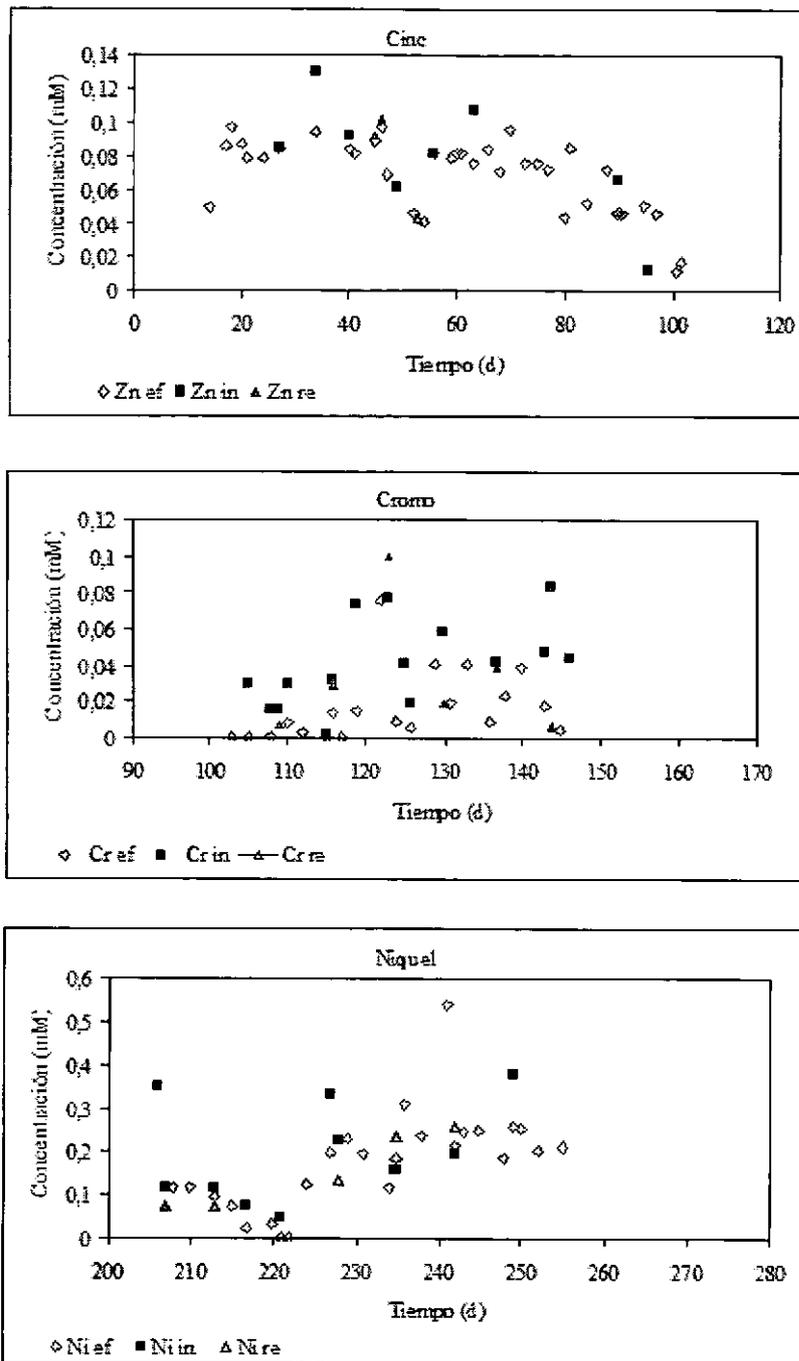


Figura 6.20. Representación de las concentraciones de cinc, cromo y níquel en el influente, efluente y en el reactor de lodos activos.

Puede concluirse que en todos los casos, tanto para el cadmio, níquel, cromo como para el zinc al aumentar la carga del metal en la alimentación, aumenta la concentración de este compuesto adsorbido por la biomasa. La adsorción no ha sido igual en todos los casos como puede observarse en la Figuras 6.19 y 6.20, el metal menos adsorbido ha sido el cromo, seguido del cinc y níquel cuya adsorción ha sido similar y por último el

metal más adsorbido fue el cadmio. Los resultados no pueden compararse con los ensayos en discontinuo puesto que el medio de reacción no es el mismo y no puede asegurarse que el biosorbente conserve las mismas características. Esto es debido a que los metales pesados modifican la estructura de la biomasa modificando la variedad de las especies (Madoni y col., 1996). Ensayos realizados para comprobar la adsorción de lodos, con diferentes concentraciones de metales, se observó que las isothermas seguían el comportamiento de Langmuir y al llegar a una determinada concentración de metal sufrían un brusco incremento en la concentración de metal enlazado.

6.3.6 Biodegradación del fenol en presencia de metales pesados

En la degradación del fenol se representa la evolución de la concentración de éste en el efluente, en el influente, así como el porcentaje de degradación. Como puede observarse en la Figura 6.21, la eficacia de degradación del fenol ha sido siempre superior al 95%.

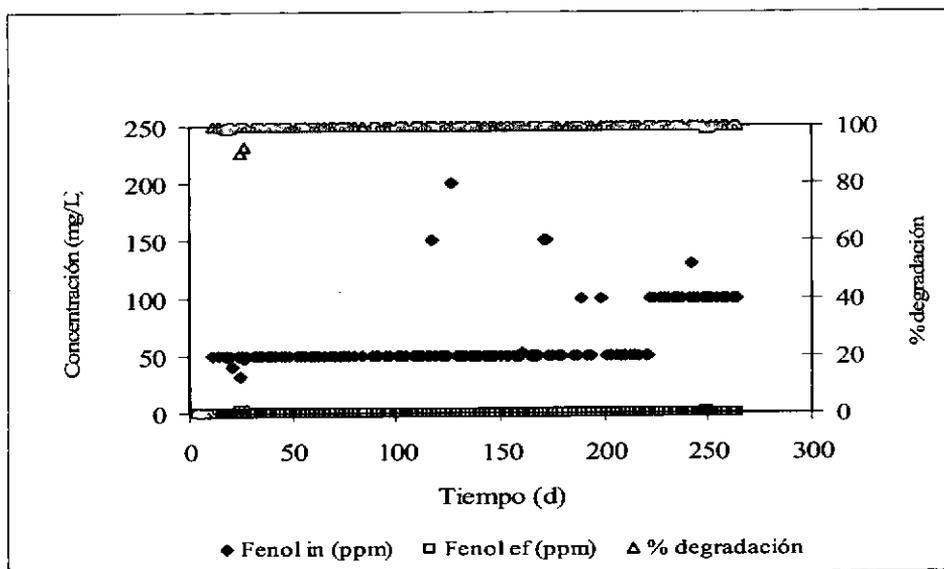


Figura 6.21. Representación gráfica de la degradación del fenol.

Como podemos observar la biodegradación del fenol en el reactor de lodos activos no se vio afectada por las cargas puntuales de fenol, las cuales han llegado hasta los 200 mg/L durante un período de 48 h, ni por las concentraciones crecientes de metales, las cuales alcanzaron una concentración de 0,45 mM en los casos de cadmio y de níquel. Nakamura y Sawada (2000) empleando una cepa pura de *Acinetobacter calcoaceticus*

en un reactor alimentado con 200 mg/L de fenol y una concentración de 0,15 mM de cinc lograron efluentes de 25 mg/L de fenol operando a un TRH de 2 horas.

Los valores de la demanda química de oxígeno, tanto en el efluente como en el influente se muestran en la Figura 6.22. La DQO teórica del fenol es de 2,38 mg O₂/mg C₆H₅OH. En el efluente se mantiene un valor promedio de unos 25 mg O₂/L durante todo el período de funcionamiento. Como hemos mencionado anteriormente la degradación del fenol tuvo lugar en su totalidad, por lo que este resultado de la DQO en el efluente choca con el resultado que no fue encontrado nada de fenol en el efluente. Esta explicación es debida a que existen, en el efluente, productos de degradación. Nkhalambayausi-Chirwa y Wang (2001) trabajaron con una biopelícula formada por un cultivo de bacterias capaces de degradar fenol, las *Pseudomonas putida* DMP-I, y bacterias reductoras de cromo (VI), *Escherichia coli* ATCC 33456, detectaron ácido 2-hidroxi mucónico semialdehído (2-HMSA), succinato y ácido acético como metabolitos de la degradación de fenol correspondientes al 13-23% del carbono orgánico total del efluente.

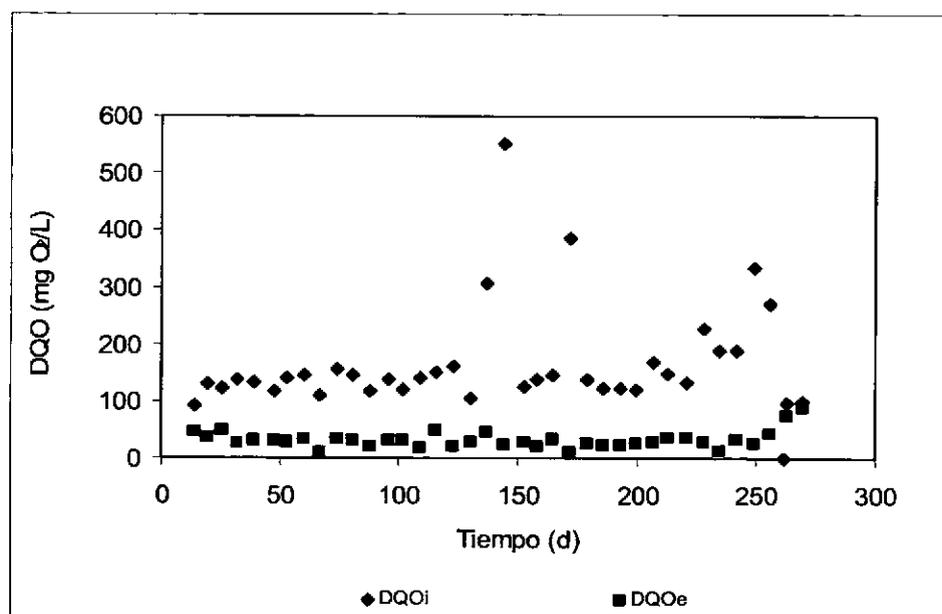


Figura 6.22. Representación gráfica de la DQO en el reactor de lodos activos.

Otros autores, Neufeld y Hermann (1975) afirmaron que era posible obtener una buena calidad del efluente aumentando la edad del lodo en un sistema de lodos activos aclimatados al metal pesado, logrando así efluentes con 25 mg DQO/L para un reactor

alimentado con 400 mg DQO/L y niveles de 200 mg Zn/g SSV y una edad de lodo de 4 días.

Ensayo con concentraciones de cinc en un rango de 0,05 mM hasta 1,5 mM

En la Figura 6.23 se representa la evolución de la concentración del fenol en el influente, efluente y el porcentaje de degradación para el caso del reactor de lodos activos en presencia de cinc a concentraciones crecientes. La eficacia de degradación de fenol siempre fue superior al 96,2 %. Se aplicaron cargas puntuales de 825 mg/L de fenol durante períodos de tiempo de 12 horas, correspondientes a períodos de diferente concentración de cinc, no observándose ningún efecto sobre la biodegradación del fenol.

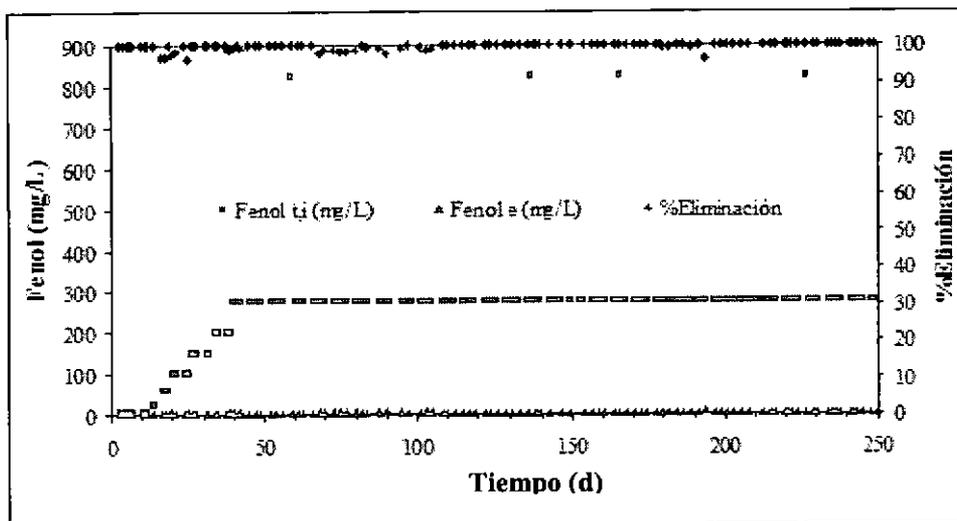


Figura 6.23. Concentración de fenol en el influente y en el efluente, y evolución del porcentaje de degradación.

En la Figura 6.24 se representan los valores de DQO soluble en el influente y en el efluente del reactor. La DQO teórica del fenol es de 2,38 mgO₂/L. En el efluente se mantiene un valor promedio de 33,9 mg O₂/L durante todo el período de operación, mientras que el fenol se mantuvo en torno a cero. Esto indica, igual que en el caso anterior, que existen productos de degradación en el efluente.

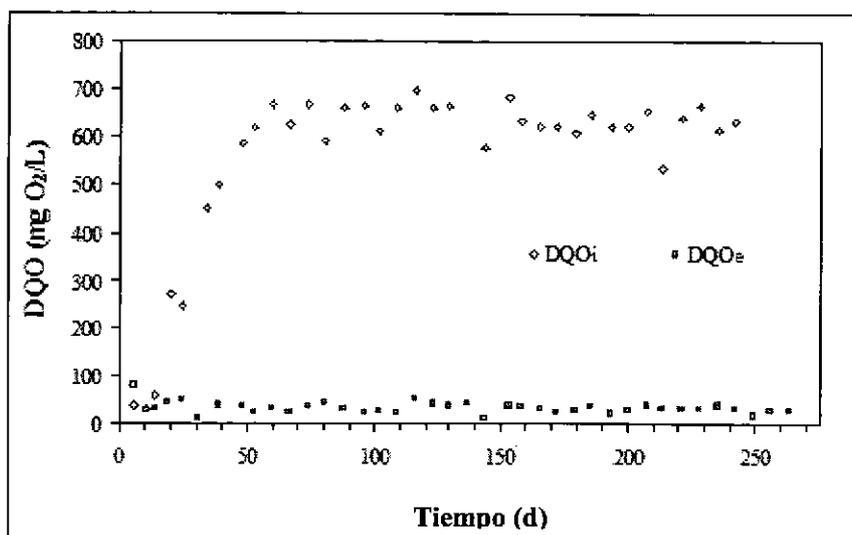


Figura 6.24. Evolución de la DQO.

6.3.7. Proceso de nitrificación en presencia de metales pesados

Para determinar la influencia de los metales pesados y del fenol sobre el proceso de nitrificación se analizó a diario el nivel de amonio en el efluente y tres veces a la semana el contenido de nitrato y de nitrito en el efluente. La evolución de la nitrificación se muestra en las Figuras 6.25 y 6.26. Se representa la concentración de nitrógeno en forma de nitrato y el porcentaje de nitrificación. En el sistema en continuo la concentración de nitrito es en el efluente prácticamente inexistente a diferencia de los ensayos en discontinuo donde se había acumulado. La concentración de amonio en el efluente ha sido realmente baja, excepto cuando el reactor se alimentó con níquel alcanzándose concentraciones de hasta 30 mg/L en el efluente, siendo el porcentaje medio de nitrificación superior al 60 %. Si se compara el efecto de los distintos metales, el cinc junto con el cadmio han sido los que menor efecto ejercieron sobre el proceso de la nitrificación, con un porcentaje de nitrificación que osciló entre un 65 hasta un 96 %. Cuando se alimentó al reactor con cromo en concentraciones crecientes, se observó como éste ejercía un efecto inhibitor; aumentando la concentración de amonio en el efluente y disminuyendo el porcentaje de nitrificación a medida que aumentaba la concentración del metal. El porcentaje de nitrificación ha variado entre el 63 % y el 80 %. Todavía se observó un mayor efecto inhibitor cuando se alimentó al reactor con níquel. Este efecto inhibitor es observado debido a que aparece una concentración de amonio de alrededor de 20 mg/L, para una concentración de 0,45 mM de níquel, encontrándose un porcentaje de nitrificación del orden del 15 % a partir del día 230

hasta el día 260, recuperándose el sistema a partir del día 270. Lee y col. (1997) en un reactor continuo de tanque agitado y con un cultivo de bacterias nitrificantes puras observaron que las bacterias *Nitrosomonas* son más sensibles que las *Nitrobacter* al cobre y al níquel, acumulándose amonio y no nitrito. Concluyeron que, utilizando un modelo geoquímico de especiación (MINTEQA2/PRODEFA), posiblemente las especies $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ y $\text{Ni}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ sean las responsables de la inhibición de la oxidación del amoníaco.

Al comparar los datos obtenidos en el reactor con los ensayos realizados en discontinuo se observaron comportamientos similares en el caso del cinc, cromo y níquel; variando ligeramente la nitrificación en presencia de cadmio. La aclimatación del medio a este metal ha sido superior en los ensayos en continuo que en los realizados en discontinuo.

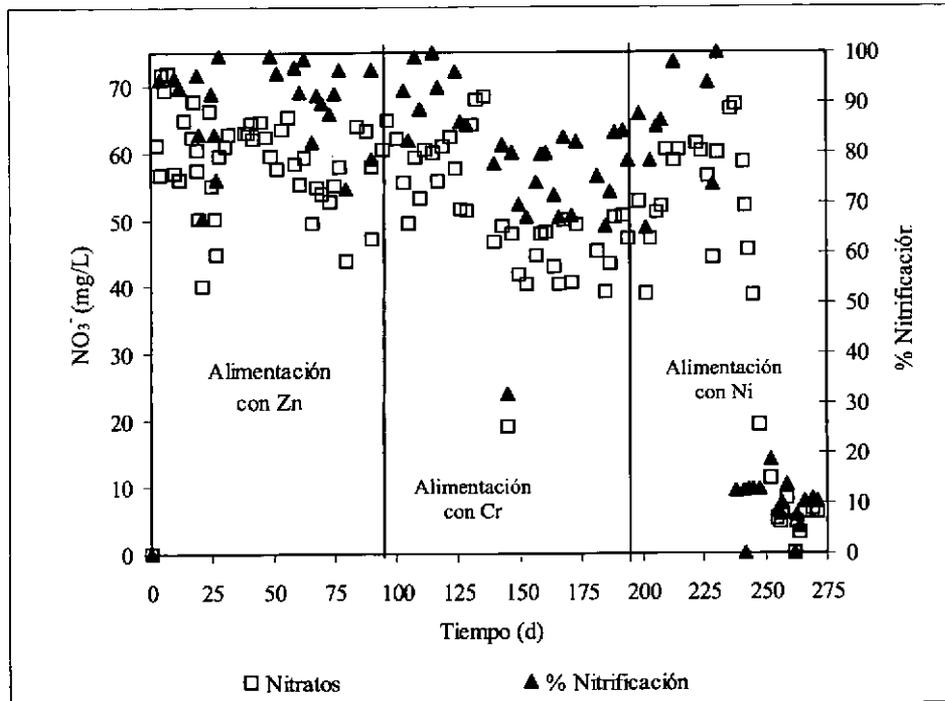


Figura 6.25. Representación gráfica de la nitrificación en presencia de los metales pesados cromo, níquel y cinc.

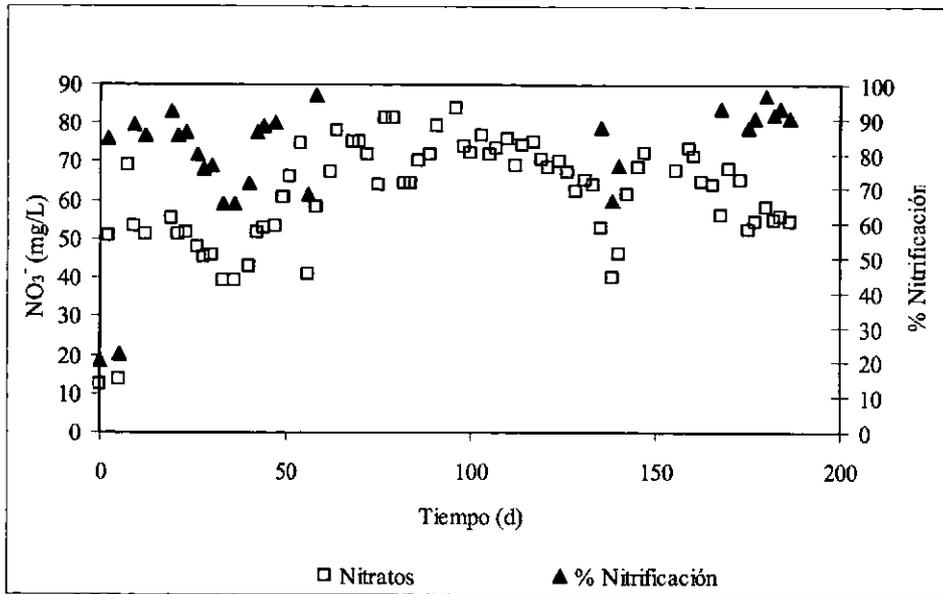


Figura 6.26. Representación gráfica de la nitrificación en presencia del cadmio.

Una vez eliminados de la alimentación los metales pesados se observó un lavado de lodos, apreciándose además un fuerte descenso en el proceso de nitrificación hasta la recuperación del sistema después de transcurridos aproximadamente algo más de una semana.

Ensayo con concentraciones de cinc en un rango de 0,05 mM hasta 1,5 mM

Para el estudio del efecto del fenol y de las concentraciones crecientes de cinc sobre el proceso de nitrificación, se ha seguido el mismo modo de operación que en el caso anterior. En la Figura 6.27 se representan las concentraciones de amonio tanto en el influente y en el efluente, así como la concentración de nitrato.

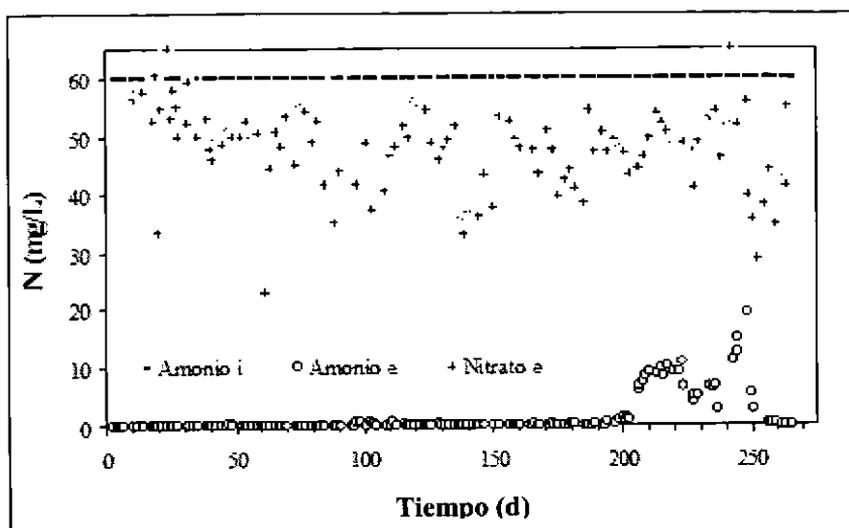


Figura 6.27. Evolución de la concentración de nitrógeno en el influente y en el efluente.

La concentración de amonio en el efluente durante los 199 días, nunca supera la concentración de 0,7 mg N-NH₃/L, lo que supone una media de eliminación de este compuesto del 98,87 %. A partir de ese día comienza a aumentar la concentración de amonio en el efluente, oscilando el porcentaje de eliminación entre el 68,2 y el 98,2 %. Después del día 250 en que se eliminó el cinc de la alimentación, decrece el amoníaco en el efluente.

En la Figura 6.28 se presenta el efecto del cinc sobre el proceso de la nitrificación. La concentración de nitrato en el efluente oscila, en todo el período de operación, entre el 35,9 mg/L y 55,8 mg/L correspondiéndose con un porcentaje de nitrificación de 59,9 % y de 92,9 %, respectivamente. También podemos observar el efecto del fenol sobre el proceso de nitrificación. Durante los primeros 39 días se nota un descenso en la oxidación de amoníaco. Una vez que se llega a una concentración de 275 mg/L de fenol el porcentaje de nitrificación se estabiliza en un 82,5 %. Las cargas puntuales de 825 mg/L de fenol durante un tiempo de 12 horas ejercen una fuerte inhibición sobre el proceso de nitrificación, cayendo a valores de 38 %, 55 %, 72 % y 69 %, en las cuatro ocasiones en que se llevaron a cabo las sobrecargas.

Al igual que se observó un lavado de los lodos al eliminar el cinc de la alimentación, puede apreciarse un fuerte descenso de la nitrificación después del día 250 de operación, cayendo la concentración de nitratos hasta los 28,9 mg N-NO₃⁻/L en el día 252. A continuación se produce una recuperación del sistema hacia el día 264 obteniéndose un

91,5 % de nitrificación. La concentración de nitritos igual que ocurrió durante el período de operación fue despreciable.

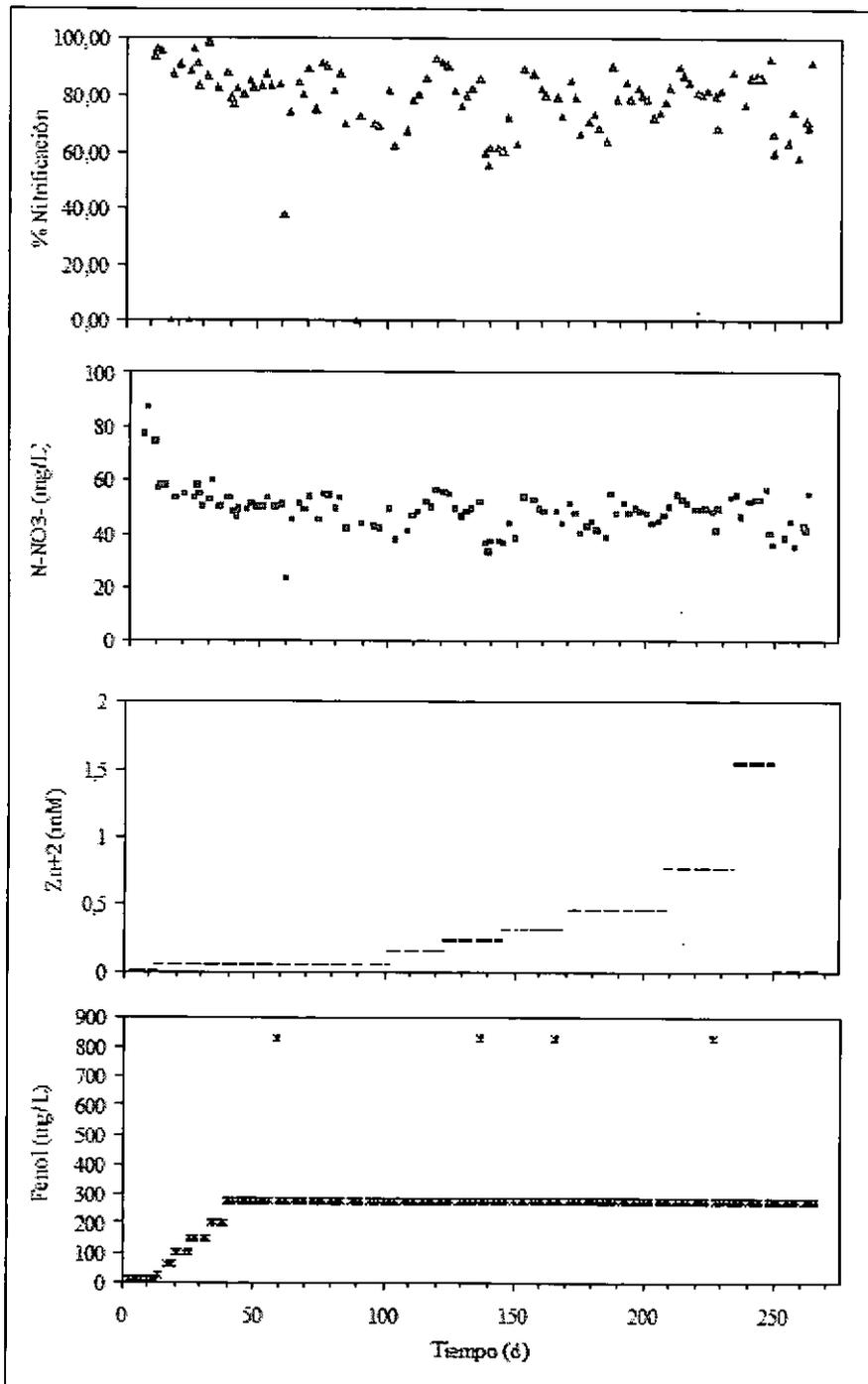


Figura 6.28. Evolución del proceso de nitrificación con la concentración de cinc y fenol.

6.3.8. Ensayos aerobios en un reactor de lodos activos en presencia de una mezcla de metales pesados

El presente ensayo se llevó a cabo con el fin de poder estudiar el efecto de la mezcla de los metales pesados estudiados, cinc, cadmio, cromo y níquel, sobre el cultivo mixto de bacterias nitrificantes y bacterias heterótrofas degradadoras de fenol.

Las condiciones de trabajo han sido las comentadas en el apartado 6.3.4. El objetivo de este estudio ha sido ir variando la concentración de la mezcla de los metales pesados en el influente manteniendo constante la concentración de la fuente de carbono en torno a los 100 mg C_6H_5OH/L . La concentración de los metales varió, en la misma proporción para cada uno, de 0,05 mM hasta 0,20 mM. En la Tabla 6.4 se indican las concentraciones de metales pesados en la alimentación durante el período de operación. Al igual que cuando se estudió el efecto de los metales pesados por separado sobre el proceso de nitrificación, se operó el reactor de lodos activos con un TRH entre 2,5 – 3 días.

Tabla 6.4. Concentraciones de metales y fenol en la alimentación

Tiempo (d)	Metales Ni,Cd,Cr, Ni	C_6H_5O (mg/L)	Concentración metales (mM)
0-27	Sin metal	100	0
28-40	Mezcla	100	0,05
45-60	Mezcla	100	0,10
63-90	Mezcla	100	0,20
91-119	Sin mezcla	100	0
120-135	Mezcla	100	0,05
139-167	Sin mezcla	100	0

Al comienzo del ensayo con la introducción de la mezcla de metales pesados al reactor, a partir del día 28, la concentración de biomasa era de 1 g SSV/L. En la Figura 6.29 se representa la evolución de este parámetro, apreciándose como durante todo el proceso la concentración de la biomasa va descendiendo. En torno al día 40 se realiza una inoculación alcanzándose unos 3,5 g SSV/L pero también se observa una disminución al introducir la mezcla de metales en el influente, a partir de los días 46, 63 y 121. Esta

pérdida de biomasa ya se había observado al operar el reactor con los metales por separado.

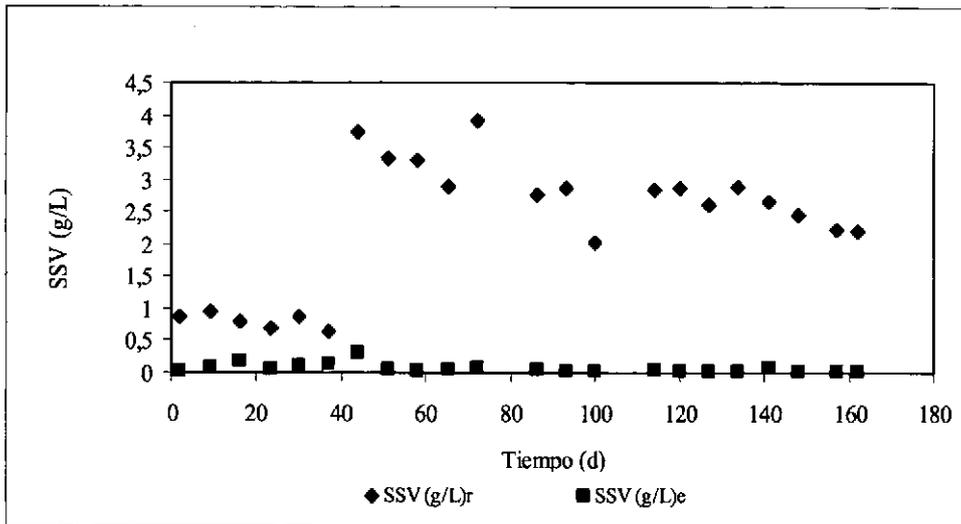


Figura 6.29. Evolución de la biomasa en el reactor tanto en el reactor como en el efluente.

El pH es otro factor importante en un proceso biológico y su evolución la podemos observar en la Figura 6.30. El pH ha oscilado en torno a 5,5 y 8. Disminuye cuando los metales se encuentran presentes en el medio. A consecuencia de esto se observó una pequeña desestabilización del reactor y el efecto negativo de la mezcla de los metales pesados cuando se encuentran presentes en el medio, incluso a concentraciones bajas, confirmándolo con la degradación del fenol y con el proceso de nitrificación.

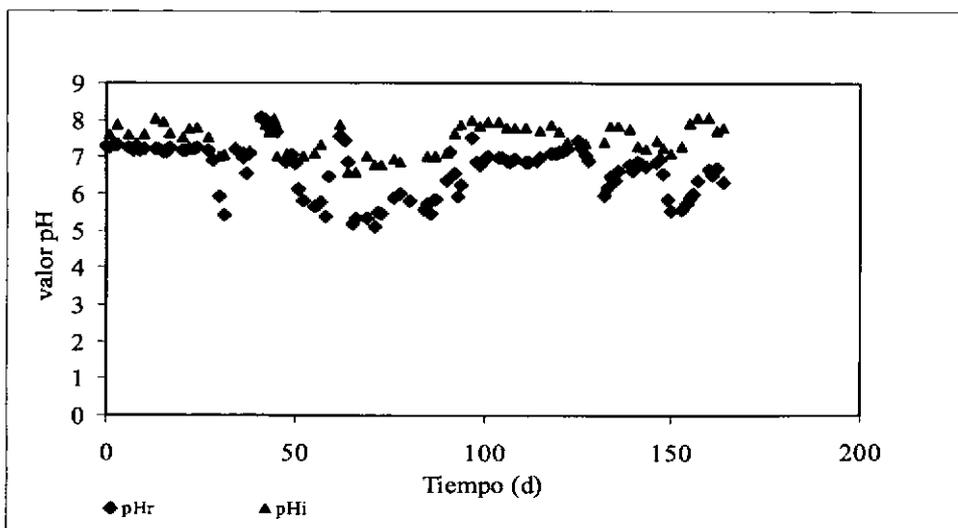


Figura 6.30. Evolución del pH en el influente y en el reactor.

6.3.8.1 Biodegradación del fenol en presencia de la mezcla de metales pesados

Los cationes metálicos fueron introducidos en el medio como disoluciones ácidas de los cloruros correspondientes a dichos metales. La concentración de la mezcla ha sido de 0,05, 0,10 y 0,20 mM de cada uno de los cuatro metales estudiados (Cd, Cr, Ni y Zn). El valor teórico de la concentración de los metales en la alimentación es mayor a la medida experimental, entre un 5 y 8 %. Esto se debe a la formación de un precipitado visible en el influente una vez introducida la mezcla de los metales.

La eficacia de degradación del fenol ha sido durante todo el período de operación del reactor superior a 95% (Figura 6.31). Los valores de la DQO en el efluente se muestran en la Figura 6.32. La DQO en el efluente osciló entre 15 y 40 mg/L, superior a la obtenida cuando el reactor funcionó con los metales introducidos individualmente. La degradación del fenol ha tenido lugar en su totalidad, correspondiendo la DQO del efluente a productos de degradación del fenol.

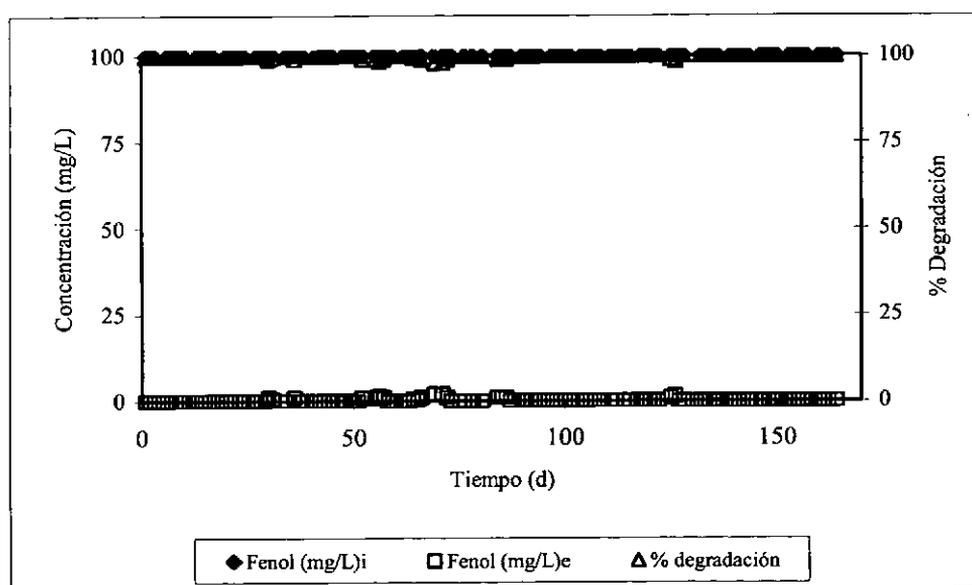


Figura 6.31. Concentración de fenol en el influente, en el efluente y el porcentaje de degradación.

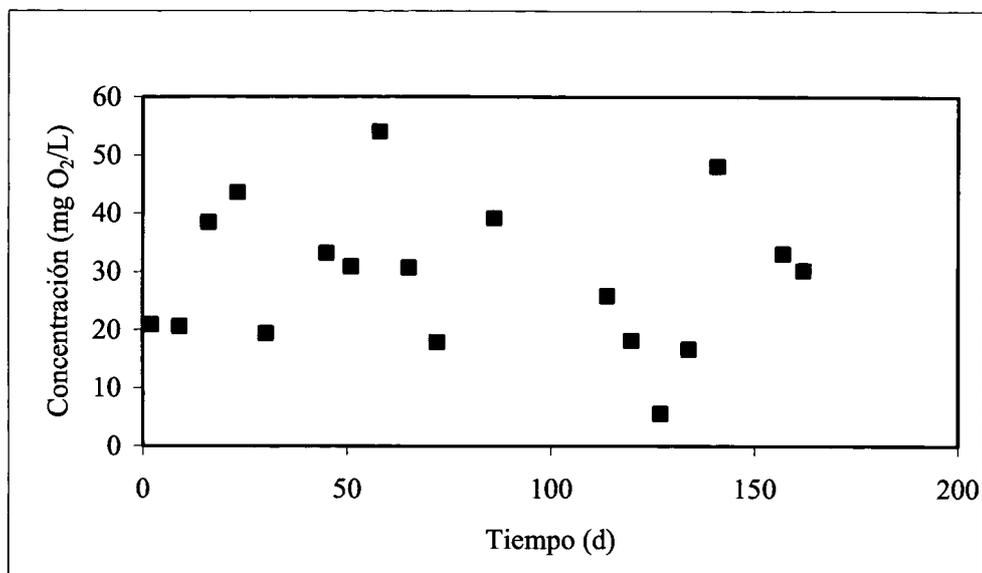


Figura 6.32. Representación gráfica de la DQO en el reactor de lodos activo en presencia de la mezcla de metales pesados.

6.3.8.2 Nitrificación en presencia de metales pesados

La influencia de la mezcla de metales pesados sobre el proceso de la nitrificación fue observada mediante el análisis del amonio y por el contenido de nitratos y nitritos en el efluente. La evolución de la nitrificación es recogida en la Figura 6.33. No se detectaron nitritos no ha aparecido en el efluente, al igual que en los casos donde el reactor había sido alimentado con sólo un tipo de metal. Respecto a la concentración de amonio, se observa como ésta aumentó en el efluente coincidiendo con la presencia de metales en el medio, alcanzándose concentraciones de 30 mg/L de amonio, cuando en el medio se introdujo la concentración de 0,10 mM de los metales, aunque también tuvo lugar una aclimatación de la biomasa a la mezcla de metales llegando a una estabilización en la nitrificación. La concentración de nitrato por lo tanto en el medio disminuye. La mezcla de metales pesados a concentraciones bajas inhibe el proceso de nitrificación causando una desestabilización del sistema de lodos activos.

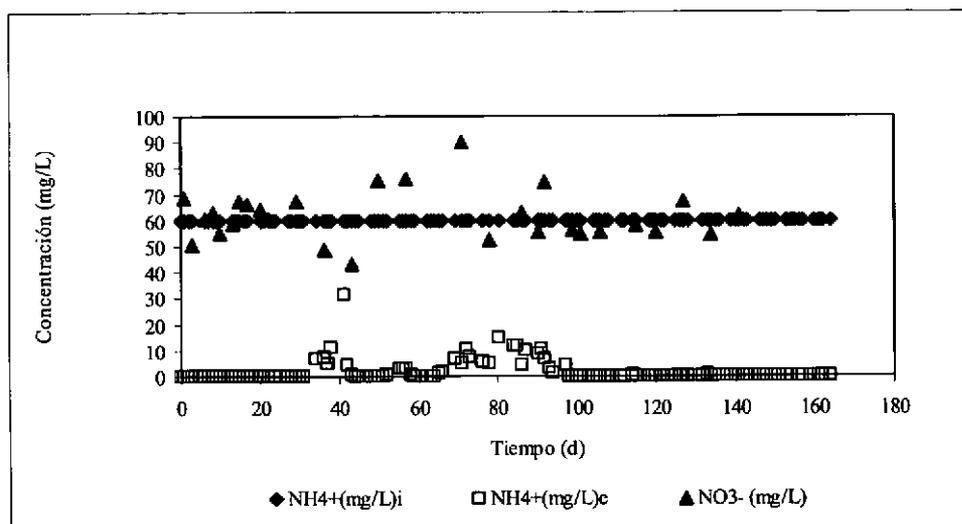


Figura 6.33. Representación gráfica de la nitrificación en presencia de la mezcla de metales pesados. (i) influente; (e) efluente

6.4. Conclusiones

6.4.1. Ensayos en discontinuo en presencia de metales pesados

- Se llevaron a cabo estudios de adsorción de los metales en la biomasa previamente a la realización de los estudios de nitrificación. Se observó adsorción de los metales por la biomasa, y se ajustaron los resultados obtenidos a la isoterma de Langmuir. La adsorción del cinc y del cadmio han sido similares, siendo el níquel el metal menos adsorbido. Disminuyendo el porcentaje de metal adsorbido con la concentración del metal en el medio.
- Del estudio de la biodegradación del fenol se concluye que la degradación tiene lugar en su totalidad para las concentraciones de metales estudiadas de cadmio, cromo, níquel y cinc. Si bien se observa un tiempo de retardo antes de comenzar la degradación.
- El proceso de nitrificación se ve inhibido por la presencia de metales en el medio, siendo el níquel el que ejerció mayor toxicidad sobre el proceso nitrificante, inhibiendo este proceso casi en su totalidad para una concentración de 2 mM. El cadmio y el cinc poseen una toxicidad similar, aunque el cinc presenta

concentraciones de nitrito superiores a las de cadmio. El cromo fue el metal que ejerció un menor efecto inhibitor para el proceso de nitrificación.

6.4.2. Ensayos en un reactor de lodos activos en presencia de metales pesados

El sistema de lodos activos fue alimentado con 60 mg N-NH₄⁺/L, y con concentraciones de fenol de 50 y 100 mg/L. Se añadieron a la alimentación los metales cinc, cromo, cadmio y níquel, por separado a distintas concentraciones.

- Durante la operación del sistema y para las diferentes concentraciones de metales estudiadas el porcentaje de biodegradación de fenol siempre fue superior al 95 %. En cambio el proceso de nitrificación se vio inhibido con algunas concentraciones de metales. El níquel es el metal que ejerció una mayor toxicidad en el medio, mientras que el cadmio y el cinc fueron los metales que menos inhibición causaron.
- La mezcla de los metales pesados, cinc, cadmio, cromo y níquel ejercieron un efecto inhibitor en el proceso de nitrificación, acumulándose amonio en el efluente a medida que se aumentó la concentración de la mezcla de metales pesados en el medio. La biodegradación del fenol no se vio afectada por la presencia de metales pesados. Sin embargo se determinó cierta DQO en el efluente del reactor, alcanzándose valores de 60 mg/L. Esta DQO corresponde a productos de degradación.

6.5. Referencias

Amor, L.; Vázquez, J.; Kennes, C. and Veiga, M. C. (2000). Effect of heavy metals on phenol removal and on nitrification. Proc. 1st World Water Congress of the International Water Association. July 3-7. Paris.

Barth, E. F.; Ettinger, M. B.; Salotto, B. V. and McDermott, G. N. (1965). Summary report on the effects of heavy metals on the biological treatment processes. *Journal of Water Pollut Control Fed* 37 (1); 86-96.

Battistoni, P.; Fava, G. and Ruello, M. L. (1993). Heavy metal shock load in activated sludge uptake and toxic effects. *Water Research* 27 (5); 821-827.

Benefield, L. D.; Judkins, J. F. and Weand, B. L. (1992). Process chemistry for water and wastewater treatment. *Prentice-Hall*, New Jersey.

Benmoussa, H.; Martin, G.; Richard, Y. and Leprince, A. (1986). Etude de l'inhibition de la nitrification par les cations de métaux lourds. *Water Research* 20 (11); 1333-1339.

Brady, J. M. and Tobin, J. M. (1995). Binding of hard and soft metals to *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 17; 791-796.

Cabrero A.; Fernández S.; Mirada F. and García J. (1998). Effects of copper and zinc on the activated sludge bacteria growth kinetics. *Water Research* 32; 1355-1362.

Doelman P.; Jansen E.; Michels M. and Van Til M. (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biological Fertilized Soil* 17; 177-184.

Ghirardini, A. V.; Avezzù, F. and Cescon, P. (1992). The fate of heavy metals in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* 25 (4-5); 413-419.

Goldstone, M. E.; Kirk, P. W. W. and Lester, J. N. (1990). The behaviour of heavy metals during wastewater treatment. II. Lead, nickel and zinc. *The Science of the Total Environment* 95; 253-270.

Hänel K. (1988). Biological treatment of sewage by the activated sludge process. Ellis Horwood series in Water and Wastewater Technology. Edited by Chichester Ellis Horwood, New York, John Willey & Sons. Pp. 200-237.

Hassen, A.; Saidi, N.; Cherif, M. and Boudabous, A. (1998). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* 65; 73-82.

Kodukula, P. S., Patterson, J. W. and Surampalli, R. Y. (1994). Sorption and precipitation of metals in activated sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 43; 874-880.

Lee, Y-W.; Ong, S-K. and Sato, C. (1997). Effects of the heavy metals on nitrifying bacteria. *Water Science and Technology* 36 (12); 69-74.

Madoni, P.; Davoli, D.; Gorbi, G. and Vescovi, L. (1996). Toxic effects of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Water Research* 30 (1); 135-141.

Mattuschka, B. and Straube, G. (1993). Biosorption of metals by a waste biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 58; 57-63.

Mishra, S. P.; Tiwari, D.; Dubey, R. S. and Mishra, M. (1998). Biosorptive behaviour of casein for Zn⁺², Hg⁺² and Cr⁺³: effects of physico-chemical treatments. *Bioresource Technology* 63; 1-5.

Nakamura, Y. M. and Sawada, T. (2000). Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75; 137-142.

Neufeld, R. D. and Hermann, E. R. (1975). Heavy metal removal by acclimated activated sludge. *Journal of Water Pollut Control Fed* 47 (2); 310-329.

Nkhalambayausi-Chirwa, E. M. and Wang, Y.T. (2001). Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in a fixed-film coculture bioreactor: reactor performance. *Water Research* 35 (8); 1921-1932.

Sujarittanonta, S. and Sherrard, J. H. (1981). Activated sludge nickel toxicity studies. *Journal of Water Pollut Control Fed* 53; 1314-1322.

Vázquez, J. (2000). Biodegradación y efecto del fenol sobre los procesos de nitrificación y desnitrificación: estudios en discontinuo y en un reactor de lodos activos. Tesis de licenciatura. Universidade de A Coruña.

CONCLUSIONES

En una primera parte de este trabajo se estudió la biodegradación de compuestos monoaromáticos (tolueno, etilbenceno y *o*-xileno) con cultivos bacterianos puros y mixtos y en presencia de cationes divalentes de metales pesados como cadmio, níquel y cinc. La segunda parte se centró en la biodegradación del fenol y el efecto que produce en el proceso de nitrificación, tanto en ensayos en discontinuo como en un reactor de lodos activos; se estudió asimismo el proceso de nitrificación y biodegradación del fenol en presencia de metales pesados (cadmio, cinc, cromo y níquel). Las principales conclusiones que se obtienen son las siguientes:

Degradación de alquilbencenos

Los compuestos orgánicos volátiles son contaminantes comunes de la atmósfera, aguas y suelos, siendo importante seleccionar cultivos mixtos y puros capaces de degradar eficazmente estos contaminantes. En los ensayos llevados a cabo en discontinuo las especies bacterianas *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. son capaces de crecer en presencia de tolueno, etilbenceno y *o*-xileno. Ambas especies bacterianas fueron capaces de crecer en un rango de pH (2,5-6), aunque el pH óptimo de crecimiento es de 6.

Las constantes cinéticas (K_s , K_I y μ_{max}) se determinaron para ambas clases de bacterias diferenciándose las especies en el valor de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}).

De las cepas estudiadas, la especie *Bacillus* fue capaz de degradar, con más eficacia, los alquilbencenos.

Cinética de inhibición en la biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos en presencia de metales pesados.

Los compuestos orgánicos volátiles además de ser contaminantes comunes del medioambiente suelen encontrarse junto a metales pesados como el cadmio, níquel y cinc. Los metales pesados pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano afectando a la velocidad de degradación de los alquilbencenos. La degradación del tolueno, etilbenceno y *o*-xileno tiene lugar en una secuencia diferente

para las especies bacterianas empleadas en el estudio, *Bacillus* y *Pseudomonas*, dando lugar a un metabolismo favorecedor de la degradación del *o*-xileno para el caso de la especie *Bacillus*, no observándose en el caso de la especie *Pseudomonas*. Se observa un período de adaptación de los microorganismos, variando esta adaptación en función de la concentración de tóxico.

El estudio de la biodegradación en presencia de metales pesados muestra un efecto inhibitorio incluso a bajas concentraciones independientemente del alquilbenceno utilizado. El níquel ha sido el metal que resultó menos tóxico.

Los resultados de degradación se han ajustado al modelo cinético de Andrews, el cual suministra una estimación cuantitativa del efecto de la inhibición sobre la degradación de los compuestos monoaromáticos.

Ensayos de biodegradación de fenol y su efecto sobre el proceso de nitrificación.

Ensayos en discontinuo

Se realizaron estudios de nitrificación en presencia de diferentes concentraciones de fenol. Se observó una completa biodegradación del fenol en un rango de concentración de 100 a 2500 mg/L, ajustándose los datos de biodegradación al modelo cinético de Monod.

Concentraciones de fenol superiores a 1000 mg/L causaron un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, produciendo acumulación de amonio y nitrito.

Ensayos en un reactor de lodos activos

Los resultados obtenidos en el reactor de lodos activos donde se ha operado manteniendo constante la concentración de amonio, la degradación de fenol se ha mantenido por encima del 99 %, para concentraciones de DQO en un rango de 30 a 2700 mg DQO/L).

El proceso de nitrificación no se ha visto inhibido por la existencia de fenol en el medio, siendo el porcentaje de eliminación del amonio, a igual que el fenol, del 99 %.

Ensayos de biodegradación de fenol y su efecto sobre el proceso de nitrificación en presencia de metales pesados

Ensayos en discontinuo

Inicialmente se realizaron estudios de adsorción de metales, observándose que los cationes metálicos eran adsorbidos por la biomasa, ajustándose los datos obtenidos a la isoterma de Langmuir.

A continuación se pasó a estudiar la degradación del fenol en presencia de los metales pesados (cadmio, cinc, cromo y níquel) obteniéndose que el fenol se degrada totalmente. Se observó un tiempo de retardo antes de que comenzara la degradación del fenol.

El proceso de nitrificación se vio inhibido por la presencia de metales pesados. El níquel ha sido el catión metálico que ejerció una mayor toxicidad sobre este proceso. El cadmio y el cinc ejercieron una toxicidad similar, siendo el cromo el metal con un menor efecto inhibitorio.

Ensayos en un reactor de lodos activos

En el estudio de nitrificación en el reactor de lodos activos en presencia de metales pesados se observó una aclimatación de los lodos a los cationes metálicos, siendo el porcentaje de degradación del fenol superior al 95 %. El proceso de nitrificación se vio inhibido por la presencia de los metales pesados a igual a igual que en los ensayos en discontinuo. El níquel fue el metal con un mayor efecto inhibitorio, mientras que los metales, cadmio y cinc, son los que ejercieron menor toxicidad para el proceso nitrificante.

Asimismo cuando los metales pesados estaban presentes en mezcla ejercieron un efecto inhibitor en el proceso de nitrificación, aumentando la acumulación de amonio a

medida que la concentración de la mezcla de metales aumentaba en el medio. La degradación del fenol no se vio prácticamente afectada por la presencia de la mezcla de metales, siendo la mayor concentración encontrada de DQO en el efluente de hasta 60 mg/L.

