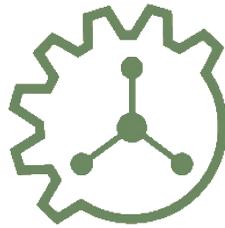




VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

VNIVERSITAT [E] VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria



Departament d'Enginyeria Química

Degradación de Disruptores Endocrinos de Estructura Fenólica en Procesos de Tratamiento de Aguas Residuales

Memoria que, para optar al grado de doctor de la Universitat de València, presenta
Miguel Rafael Abargues Llamas.

Valencia, 2015

Directores: Dra. Aurora Seco Torrecillas

Dr. Alberto Bouzas Blanco

Portada diseñada por Elvira Catalá Bolós

A mis padres, abuela, hermana, mujer e hija

Agradecimientos

El trabajo incluido en la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración de muchas personas con las que he convivido durante todo este tiempo. A ellas les dedico estas líneas en muestra de agradecimiento.

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a Aurora Seco Torrecillas y José Ferrer Polo por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como la posibilidad de desarrollar mi trabajo de tesis con ellos.

Expresar mi agradecimiento a la Universitat de València por la beca concedida durante estos años y a la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana, por su colaboración con este grupo de investigación. También al Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València, por el buen trato, así como la ayuda que siempre he recibido.

En especial a mis directores de tesis, la doctora Aurora Seco Torrecillas y el doctor Alberto Bouzas Blanco, así como al doctor José Ferrer Polo, por su orientación, ayuda y consejo durante la realización de éste trabajo.

A la doctora Pilar Campins Falcó, por su imprescindible ayuda en momentos muy importantes de esta tesis.

También le agradezco al doctor Denis Mangin haberme permitido trabajar con ellos durante este tramo final de mi tesis.

A mis compañeros del grupo de investigación, ya que en mayor o menor medida han cedido, de forma desinteresada, parte de su tiempo y trabajo para la realización de la presente tesis.

A los doctores, Nuria, Josep, Luis, Daniel, Ramón, Joaquín, Vicky y Paqui por estar siempre dispuestos a tender una mano y aportar sus conocimientos en la resolución de los problemas surgidos durante todo este tiempo.

A Freddy, Juan, Ángel y Laura C., por todos los “viajecitos” a la planta piloto para traerme infinidad de muestras y de quienes jamás he oído ninguna queja.

A Laura S., José Pastor y Matt porque la cromatografía es un mundo complejo y siempre es mejor tener un oído al que preguntar.

Javier Eduardo, por las instructivas conversaciones de todos los recovecos de la planta, que han sido muy fructíferas y necesarias.

Javier Claros, Marcela y Brenda, por toda la alegría que aportasteis al laboratorio, y por todo lo que he aprendido de vosotros.

A Mónica y Ana Ruiz por compartir vuestros conocimientos sobre las algas y ayudarme en los montajes, las algas es un mundo muy complejo, y toda ayuda es bienvenida.

A Emérita, Berta, Sara, Marta, Vanesa, Sonia y Ana Peral por su ayuda en el laboratorio, gracias a vosotras el trabajo plasmado en esta tesis ha sido más fácil.

A Patricia, Silvia, Nacho y Joana, ya que, aunque nos conocimos en el tramo final de este trabajo vuestra contribución ha sido muy importante.

A Álex, Tao, Ruth, Nuria Zamorano, Josué, Rebecca y Héctor, porque los momentos que hemos podido compartir no han sido muchos, pero han merecido la pena.

A Alejandro Catalá, por esos consejos académicos que no han caído en saco roto.

A Laura Martín y Juan Mora por haber confiado en mis capacidades como responsable de cromatografía. Al igual que al laboratorio de Intercontroler@s, Toñi (y a su corazoncito merengue), Raquel (Little Rachel), Conchi, Mireia, Oreto y Marta por haberme aceptado en el laboratorio, así como enseñado otra forma de ver la Química.

A Miguel de la Guardia, María Luisa Cervera y María José Medina, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia.

Por último, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia. En especial a mis padres y mi hermana, por todo el cariño y apoyo durante tanto tiempo. Siempre han estado a mi lado y si he llegado donde lo he hecho ha sido, en una gran parte, por todo lo que he aprendido de ellos.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi familia política, a mis suegros, cuñados y sobrinos, porque siempre me han tratado como uno más.

Quiero dedicar el presente trabajo a mi mujer y mi hija. A mi mujer, Elvira, por acompañarme durante tanto tiempo, ni recuerdo cuanto es, en el que nos hemos encontrado con momentos buenos y malos, por soportar todas mis “peculiaridades”, que al final seguro que cansan, por todos tus consejos, objetivos y desinteresados, por tus educativas y gratuitas clases de AutoCad, por todo esto y por todo lo que nos queda por

vivir, muchas gracias. Y a María, mi hija, quien desde el primer momento de su vida ha sido la alegría de la mía.

Resumen

Resumen

El trabajo recogido tanto en los resultados como en las conclusiones de la presente tesis está encaminado a esclarecer el comportamiento de algunos de los microcontaminantes orgánicos incluidos en la Directiva 2000/60/CE bajo diversas condiciones de trabajo en estaciones depuradoras de aguas residuales. Para ello se ha estudiado un grupo de microcontaminantes cuya presencia en el medio ambiente, bien sea en la fracción soluble de las aguas continentales o bioacumulados en sedimentos y/o biota, es frecuente. La presencia de dichos compuestos es debida, fundamentalmente, a la industrialización y a los actuales hábitos de la sociedad. Los microcontaminantes tipo elegidos son: octilfenol, 4-n-nonilfenol, t-nonilfenol, estrona, 17 α -estradiol, 17 β -etinilestradiol, pentaclorofenol y bisfenol-A. Estos microcontaminantes están catalogados como compuestos disruptores endocrinos (CDE). Al comienzo de la presente tesis se evaluaron únicamente a los analitos; octilfenol, 4-n-nonilfenol, t-nonilfenol, estrona, 17 α -estradiol y 17 β -etinilestradiol, pero debido a la inclusión de pentaclorofenol y bisfenol-A en los Anexos II y III de la Directiva 2008/105/CE respectivamente, estos fueron incluidos posteriormente.

Los estudios se realizaron sobre agua residual real, siendo las condiciones de trabajo empleadas, las típicas que presenta una EDAR: condiciones aerobias y anaerobias. Estos experimentos se llevaron a cabo tanto en tratamientos secundarios (a escala planta piloto y planta industrial) como postratamientos (a escala laboratorio y planta piloto). Los tratamientos secundarios propuestos para la eliminación de estos compuestos fueron: planta piloto con un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR), planta piloto con un biorreactor aerobio de membrana sumergida (aMBR) y planta industrial de fangos activados (TC). Mientras que los postratamientos fueron: planta piloto operando en configuración UCT y reactor de microalgas operando a escala laboratorio. Los estudios realizados en los sistemas secundarios emplearon como afluente agua proveniente del decantador primario o del desarenador de la planta depuradora de la Cuenca del Carraixet situada en la población de Alborai (España), mientras que los estudios en postratamientos se llevaron a cabo con el efluente del tratamiento secundario SAnMBR. Para poder realizar los correspondientes balances de masa de

los compuestos estudiados, se llevó a cabo la toma de muestra de forma que englobase tanto la fracción soluble como la suspendida.

El control de las concentraciones de estos compuestos se evaluó mediante, cromatografía de gases acoplada a detección de espectrometría de masas. De esta forma se ha podido conocer tanto los rendimientos de eliminación, degradación y adsorción de los compuestos en los diferentes procesos de degradación estudiados, así como las cinéticas de degradación de los mismos. El resto de análisis efectuados en la presente tesis se han llevado a cabo mediante técnicas gravimétricas (sólidos suspendidos), espectrofotométricas (nutrientes), volumétricas (alcalinidad, ácidos grasos volátiles y DQO) y bioensayos (DBO).

El diseño de experimentos se realizó con el objetivo de facilitar la comparación de los rendimientos de eliminación de cada CDE en los procesos secundarios y postratamientos. De esta forma se pudo conocer cuál es el proceso que mejor rendimiento de eliminación aporta, tanto en la etapa secundaria como postratamiento. Además, se estudió el rendimiento global del proceso conjunto (SAnMBR-UCT, escala planta piloto) formado por una etapa anaerobia de membranas y un postratamiento operando en una configuración UCT. Asimismo se estudió, el proceso conjunto formado por una etapa anaerobia de membranas (planta piloto) y un postratamiento basado en cultivo de microalgas (a escala laboratorio, cultivo de microalgas con iluminación artificial y sin aireación forzada).

Los primeros estudios se basaron en la comparación de las concentraciones de los disruptores endocrinos a lo largo de la línea de aguas y fangos en los dos reactores de membranas (SAnMBR y aMBR) y en la planta industrial (TC). A la vista de los resultados obtenidos, especialmente para la planta piloto SAnMBR, se observó la necesidad de incluir una etapa de postratamiento que mejorase los resultados obtenidos por el tratamiento anaerobio. Por este motivo el efluente del SAnMBR se sometió a dos tipos de postratamiento. En el primero se acopló a un postratamiento formado por una etapa aerobia; la planta piloto completa presentó el esquema SAnMBR-UCT. En el segundo el afluente se sometió a un postratamiento basado en un cultivo de microalgas, el cual se llevó a cabo en régimen discontinuo.

Otros experimentos se llevaron a cabo de forma simultánea, a escala laboratorio, para comprender el efecto de los parámetros involucrados en la degradación de disruptores en un reactor con cultivo de microalgas. Los parámetros estudiados fueron: oxígeno disuelto, luz y microalgas. El estudio de estos tres parámetros tanto de forma individual como combinados proporcionó la información necesaria para la determinación de los rendimientos de eliminación para cada parámetro, así como los parámetros cinéticos en la etapa de degradación.

Resum

El treball presentat tant als resultats com a les conclusions de la presente tesi està encaminat a esclarir el comportament d'alguns dels microcontaminants orgànics inclosos a la Directiva 2000/60/CE en diferents condicions de treball en estacions depuradores d'aigües residuals. Per això s'ha estudiat un grup de microcontaminants els quals es troben freqüentment presents en el medi ambient, be siga en la fracció soluble de les aigües continentals o bioacumulats en sediments i/o biota. La presència dels citats compostos es deguda, fonamentalment, a la industrialització i als actuals hàbits de la societat. Els microcontaminants tipus escollits son: octifenol, 4-n-nonilfenol, t-nonilfenol, estrona, 17 α -estradiol, 17 β -etinilestradiol, pentaclorfenol i bisfenol-A. Estos microcontaminats estan catalogats com a compostos disruptors endocrins (CDE). Al començament de la present tesi s'avaluaren únicament els analits; octifenol, 4-n-nonilfenol, t-nonilfenol, estrona, 17 α -estradiol i 17 β -etinilestradiol, però degut a la inclusió del pentaclorfenol y bisfenol-A en el Annexes II i III de la Directiva 2008/105/CE respectivament, aquets foren inclosos posteriorment com analits de referencia.

Els estudis es varen realitzar en aigua residual reial, sent les condicions de treball emprats, les típiques que es presenten a una EDAR: condicions aeròbies i anaeròbies. Estos experiments es van dur a terme tant en tractaments secundaris (a escala planta pilot i planta industrial) com post-tractaments (a escala laboratori y planta pilot). Els sistemes secundaris proposats per a la eliminació de aquets compostos foren: planta pilot amb un bioreactor anaerobi de membrana submergida (SAnMBR), planta pilot amb un bioreactor aerobi de membrana submergida (aMBR) i planta industrial de fangs activats (TC). Mentre que els post-tractaments van ser: planta pilot operant en configuració UCT i reactor de microalgues operant a escala laboratori. Els estudis realitzats als sistemes secundaris varen emprar com afluents d'aigua provinent del decantador primari de la planta depuradora de la Conca del Carraixet situada a la població d'Alboraia (Espanya), mentre que els estudis en post-tractaments es varen dur a terme en el affluent del tractament secundari SAnMBR. Per a poder realitzar els corresponents balanços de massa dels compostos estudiats, es va dur a terme la toma de mostra de manera que englobara tant la fracció soluble com la suspesa.

El control de les concentracions de aquests compostos es va avaluar mitjançant cromatografia de gases acoblat a detecció de espectrometria de masses. De aquesta manera s'ha pogut conèixer tant els rendiments d'eliminació del compostos en els diferents processos de degradació estudiats, així com les cinètiques de degradació del mateixos. La resta d'anàlisi efectuats a la present tesi s'han dut a terme mitjançant tècniques gravimètriques (sòlids suspesos), espectrofotomètriques (nutrients), volumètriques (alcalinitat, àcids grassos volàtils i DQO) i bioassajos (DBO).

El disseny dels experiments es van realitzar amb el objectiu de facilitar la comparació dels rendiments d'eliminació de cada CDE als processos secundaris i post-tractaments. De aquesta manera es va poder conèixer quin es el procés que millor rendiment aporta, tant a la etapa secundària com post-tractament. A mes, es va estudiar el rendiment global del procés conjunt (SAnMBR-UCT, escala planta pilot) format per una etapa anaeròbia de membranes i un post-tractament operant en una configuració UCT. Així mateix, es va estudiar, el procés conjunt format per una etapa anaeròbia de membranes (SAnMBR, planta pilot) i un post-tractament basat en un cultiu de microalgues (a escala laboratori, cultiu de microalgues amb il·luminació artificial i sense aireig forçada).

Els primers estudis es varen basar en la comparació de les concentracions dels disruptors endocrins en la línia d'aigües i de fangs en els dos reactors de membranes (SAnMBR i aMBR) i en la planta industrial (TC). A la vista del resultats obtinguts, especialment per a la planta pilot SAnMBR, es va observar la necessitat de incloure una etapa de post-tractament que millorassen els resultats obtinguts en el tractament anaerobi. El primer es va acoblar a un post-tractament format per una etapa aeròbia; la planta pilot completa va presentar un esquema SAnMBR-UCT. En el segon, el afluent es va sotmetre a un post-tractament basat amb un cultiu de microalgues, el qual es va dur a terme en règim discontinu.

Altres experiments es van realitzar de manera simultània, a escala laboratori, per a comprendre l'efecte dels paràmetres involucrats en la degradació de disruptors a un reactor amb cultiu de microalgues. Els paràmetres estudiats van ser: oxigen dissolt, llum i microalgues. L'estudi d'aquest tres paràmetres, tant de manera individual com combinada, va proporcionar la informació necessària per a

la determinació dels rendiments d'eliminació per a cada un d'ells, així com els paràmetres cinètics a l'etapa de degradació.

Abstract

The results and conclusions reflected in this thesis work aims to explain the behaviour of some organic micropollutants include in Directive 2000/60/EC under various working conditions in wastewater treatment plants. For this reason, a group of micropollutants whose the occurrence in the environment, both in the soluble fraction of inland waters and bioaccumulate in sediment and/or biota, is common. The occurrence of these compounds is due mainly to the industrialization and current habits of society. Micropollutants chosen type are: octylphenol, 4-n-nonylphenol, t-nonylphenol, estrone, 17 α -estradiol, 17 β -ethynylestradiol, pentachlorophenol and bisphenol-A. These micropollutants are classified as endocrine disrupting compounds (EDC). At the beginning of this thesis they were evaluated only the analytes; octylphenol, 4-n-nonylphenol, t-nonylphenol, estrone, 17 α -estradiol and 17 β -ethynylestradiol, but due to the inclusion of pentachlorophenol and bisphenol-A in Annexes II and III of Directive 2008/105/EC respectively, these were subsequently included as reference analytes in this thesis.

The studies were carried out with real wastewater, employing typical operating conditions of a WWTP: aerobic and anaerobic conditions. These experiments were carried out both in secondary treatments (a pilot plant and industrial plant scale) as post-treatment (laboratory scale and pilot plant scale). The proposed secondary processes for remove these compounds were: an anaerobic submerged membrane bioreactor pilot plant (SANMBR), an aerobic submerged membrane bioreactor pilot plant (aMBR) and conventional activated sludge (CAS). While the post-treatments were: UCT configuration pilot plant and microalgae photobioreactor configuration operating at laboratory scale. Studies on secondary systems were carried out with the effluent of primary settler or degritter of Carraixet wastewater treatment plant located in the town of Alboria (Spain), while studies in post-treatments were carried out with secondary treatment SANMBR effluent. To achieve the corresponding mass balance of the studied compounds, sampling was carried out in both the soluble fraction and suspended fraction.

The concentrations of these compounds were monitored by a gas chromatography coupled to mass spectrometric detection technique. Thus, it could know both removal yields in different degradation studied processes and their

degradation kinetics. The remaining analyses in this thesis have been carried out by gravimetric techniques (suspended solids), spectrophotometric (nutrients), volumetric (alkalinity, VFA and COD) and bioassays (BOD).

The design of experiments was carried out in order to facilitate comparison of the removal efficiencies of each CDE in secondary and post-treatment processes. In this way, it was possible to know which is the process that provides better removal efficiency, both in the secondary treatments and post-treatments. Besides, the global efficiency of the coupled processes was studied (SAnMBR-UCT, pilot plant scale) consisted of an anaerobic membrane process and UCT post-treatment. It was also studied, the global process consists of an anaerobic membrane process (pilot plant) and microalgae culture (a laboratory scale, cultivation of microalgae with artificial lighting without forced aeration).

The first studies carried out were the comparison of the concentrations of CDE along the water line in two pilot plants (SAnMBR and aMBR) and conventional activated sludge. Considering the results obtained, especially for SAnMBR pilot plant, it can be observed a post-treatment step was necessary in order to improve the results obtained from anaerobic treatment. For this reason, the effluent of SAnMBR was underwent two types of post-treatment. The first experiment coupled the SAnMBR effluent to a post-treatment consisting of an aerobic stage working in UCT configuration. The second experiment coupled the SAnMBR effluent to a microalgae culture, which was carried out in batch mode.

Others experiments were simultaneously carried out in lab-scale for understand the effect of three basic parameters involved in microalgae grown in the degradation and kinetics of CDE. Studied parameters were: dissolved oxygen, light and microalgae. The study of these three parameters both individually and in combination provide the necessary information to determine the removal efficiencies for each parameter, as well as the kinetic parameters in degradation step.

Índice

1. Introducción	35
1.1. La contaminación de las aguas.....	37
1.2. Directiva Marco del Agua 2000/60/CE.....	39
1.3. Procesos de depuración de aguas residuales	43
1.3.1. Proceso de Fangos Activados.....	44
1.3.2. Biorreactores de Membrana.....	46
1.3.2.1. Aplicación de la tecnología de membranas para la eliminación de disruptores endocrinos.....	50
1.3.3. Microalgas.....	52
1.3.3.1. Tipos de algas y función fotosintética	53
1.3.3.2. Aplicación de los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales.....	56
1.3.3.3. Eliminación de disruptores endocrinos con cultivos de microalgas.....	58
1.4. Biodegradación de los disruptores endocrinos y sus precursores en EDAR	60
1.4.1. Alquilfenoles polietoxilatos.....	60
1.4.1.1. Octilfenol y 4-nonilfenol (ramificado)	64
1.4.1.2. Productos de degradación de OP y t-NP	67
1.4.2. 4-n-nonilfenol (lineal)	69
1.4.3. Bisfenol-A.....	69
1.4.4. Pentaclorofenol.....	71
1.4.5. Estrona, 17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol	72
1.5. Métodos de análisis de CDE	73
1.5.1. Tratamiento de muestras y extracción de analitos.....	73
1.5.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida	73
1.5.3. Microextracción en fase sólida (SPME).....	74
1.5.3.1. Fundamentos teóricos de la SPME.....	77
1.5.3.2. Procedimientos de SPME	81
1.5.3.3. Etapa de absorción/adsorción.....	81
1.5.3.4. Etapa de desorción.....	83
2. Objetivos	85
3. Materiales y metodología.....	89
3.1. Tipos de tratamientos estudiados.....	91
3.1.1. Tratamiento convencional de fangos activados	91

3.1.2. Biorreactor anaerobio de membrana sumergida	93
3.1.3. Biorreactor aerobio de membrana sumergida.	94
3.1.4. Planta piloto de fangos activados, esquema UCT	95
3.1.5. Microalgas.....	96
3.2. Balance de masa.....	100
4. Métodos de análisis.....	103
4.1. Reactivos	105
4.2. Muestreo	106
4.3. Métodos de análisis de macrocontaminantes en agua residual.....	107
4.4. Instrumentos y condiciones cromatográficas	109
5. Resultados.....	113
5.1. Optimización de los métodos de análisis	116
5.1.1. Microextracción en fase sólida	117
5.1.2. Dispersión de matriz en fase sólida	124
5.1.3. Control de calidad de la señal analítica.....	126
5.2. Degradación de CDE en una planta industrial convencional de fangos activados (proceso TC).....	127
5.2.1. Fracción soluble	128
5.2.2. Fracción suspendida.....	129
5.3. Degradación de CDE en un biorreactor aerobio de membrana sumergida (proceso aMBR)	130
5.3.1. Fracción soluble	130
5.3.2. Fracción suspendida.....	131
5.4. Degradación de CDE en un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (proceso SAnMBR)	131
5.4.1. Degradación de CDE en un proceso SAnMBR combinado con un postratamiento mediante sistema de fangos activados con configuración UCT.....	133
5.4.1.1. Fracción soluble.....	134
5.4.1.2. Fracción suspendida	139
5.4.1.3. Balance de masa a la planta piloto SAnMBR-UCT	141
5.4.2. Degradación de CDE en un proceso SAnMBR combinado con un postratamiento mediante cultivo de microalgas.....	148

5.4.2.1. Evaluación de la eliminación de CDE por luz, oxígeno y microalgas	151
5.4.2.2. Balance de masa al cultivo de microalgas	158
5.4.2.3. Cinética de degradación de CDE.....	162
5.4.2.3.1. Cinética de degradación en los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “P”	168
5.4.2.3.2. Cinética de degradación en los experimentos “PM”	177
5.4.2.3.3. Validación de las constantes cinéticas.....	184
5.5. Estudio comparativo	187
5.5.1. Comparación de los tratamientos secundarios.	187
5.5.1.1. Fracción soluble.....	189
5.5.1.2. Fracción suspendida	192
5.5.2. Comparación de los postratamientos para el efluente del SAnMBR	195
5.5.2.1. Fracción soluble.....	196
5.5.2.2. Fracción suspendida	197
6. Conclusiones.....	201
7. Desarrollos futuros	209
7.1. Métodos analíticos.....	209
7.2. Degradación de los disruptores endocrinos	209
7.3. Degradación de los disruptores endocrinos en una planta piloto con cultivo de microalgas.....	210
Anexo I. Acrónimos y nomenclatura.....	219
Anexo II. Vista general de las plantas piloto.....	221
Anexo III. Propiedades cromatográficas, espectrales y físicas de los disruptores endocrinos	225
Anexo IV. Espectros de masas	229
Anexo V. Mantenimiento del equipo cromatográfico	233
Anexo VI. Gráficas de calibración del modelo cinético	239
Referencias y Bibliografía.....	251

Relación de Figuras

FIGURA 1.	ESQUEMA TÍPICO DEL TRATAMIENTO DE FANGOS ACTIVADOS.	45
FIGURA 2.	CONFIGURACIONES DE UN REACTOR DE BIOMEMBRANA DE RECIRCULACIÓN EXTERNA (A) Y DE BIOMEMBRANA SUMERGIDA (B) (ADAPTADO DE JUDD Y JUDD, 2011).	47
FIGURA 3.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS PUBLICADAS ENTRE 1986 Y 2014 BASADAS EN DEPURACIÓN DE AGUA RESIDUAL MEDIANTE PROCESOS DE MEMBRANA (SCOPUS, 2015).	48
FIGURA 4.	DIAGRAMA DE FLUJO DE OPERACIÓN DE LOS MÓDULOS DE MEMBRANA (ADAPTADO DE GIMÉNEZ, 2014). NOMENCLATURA: FR: CICLO FILTRACIÓN-RELAJACIÓN; V: CICLO VENTILACIÓN; D: CICLO DESGASIFICACIÓN.	50
FIGURA 5.	REFERENCIAS PUBLICADAS ENTRE 2002 Y 2014 RELACIONADAS CON LA ELIMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN UN PROCESO BIOLÓGICO DE MEMBRANAS (SCOPUS, 2015).	51
FIGURA 6.	REFERENCIAS PUBLICADAS ENTRE 2003 Y 2014 RELACIONADAS CON LA ELIMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS MEDIANTE MICROALGAS (SCOPUS, 2015).	60
FIGURA 7.	AGRUPACIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE POLIETOXILATOS, ASÍ COMO LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE CADA UNO DE ELLOS.	61
FIGURA 8.	PROCESO DE DEGRADACIÓN DE LOS ALQUILFENOLES POLIETOXILATOS EN PROCESOS ANAEROBIOS Y AEROBIOS (ADAPTADO DE CORVINI ET AL., 2006A Y LIAN Y LIU, 2013).	63
FIGURA 9.	EJEMPLOS DE CARBONOS CUATERNARIOS (OCTILFENOL Y EJEMPLO DE 4-NONILFENOL RAMIFICADO) Y SECUNDARIOS EN POSICIÓN ALFA (4-N-NONILFENOL LINEAL).	66
FIGURA 10.	CINÉTICA DE DESAPARICIÓN DEL OP (20 μ M) Y DE FORMACIÓN DE 4-TERT-OCTILCATECOL BAJO CONDICIONES DE IRRADIACIÓN (MAZELLIER Y LEVERD, 2003).	67
FIGURA 11.	MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE LOS DIFERENTES ISÓMEROS DE LOS NONILFENOLES RAMIFICADOS PROPUESTO POR CORVINI ET AL., 2006B.	68
FIGURA 12.	ESQUEMA DE UN SOPORTE COMERCIAL DE SPME (ADAPTADO DE MESTER Y STURGEON, 2005).	75
FIGURA 13.	COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ABSORCIÓN Y ADSORCIÓN (ADAPTADO DE GORECKI ET AL., 1999).	77
FIGURA 14.	CANTIDAD DE ANALITO EXTRAÍDO POR LA FIBRA FRENTE A LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ANALITO EN LA MUESTRA. SE MUESTRAN TRES CONSTANTES DE EQUILIBRIO DIFERENTES. $C_{F\text{ MAX}} = 1,0$ G/L, $V_F = 0,5$ μ L, $V_S = 2$ ML. (ADAPTADO DE GORECKI ET AL., 1999).	80
FIGURA 15.	ESQUEMA DE LA EDAR DE LA CUENCA DEL CARRAIXET SITUADA EN LA COMARCA DE L'HORTA NORD, ALBORAIA. IMAGEN EXTRAÍDA DE LA PÁGINA WEB DE LA ENTITAT DE SANEJAMENT D'AIGÜES (PÁGINA WEB: HTTP://WWW.EPSAR.GVA.ES/SANEJAMENT/INSTALACIONES/EDAR.ASPX?ID=8).	92
FIGURA 16.	DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT. NOMENCLATURA: RT: ROTOTAMIZ; TH: TANQUE DE HOMOGENEIZACIÓN; RAN: REACTOR ANAEROBIO; TM: TANQUES DE	

MEMBRANA; RD: RECIPIENTE DE DESGASIFICACIÓN; CIP: CLEAN-IN-PLACE; B: BOMBA; R: RESISTENCIA Y S: SOPLANTE (ADAPTADO DE GIMÉNEZ ET AL., 2011).	94
FIGURA 17. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PLANTA PILOTO DE FANGOS ACTIVADOS CONFIGURACIÓN UCT. NOMENCLATURA: B: BOMBA; R: RESISTENCIA Y S: SOPLANTE (ADAPTADO DE SÁNCHEZ-RAMÍREZ ET AL., 2015).	95
FIGURA 18. DIAGRAMA DEL SISTEMA DE FOTOBIOREACTORES. A) SECCIÓN LONGITUDINAL Y B) SECCIÓN TRANSVERSAL. LAS COMBINACIONES DE PARÁMETROS FUERON: LUZ, OXÍGENO Y MICROALGAS (“POM”), LUZ Y OXÍGENO (“PO”), LUZ (“P”), LUZ Y MICROALGAS (“PM”) Y OXÍGENO (“O”).	99
FIGURA 19. FIBRAS Y SOPORTES EMPLEADOS EN LA TÉCNICA SPME.	110
FIGURA 20. EQUIPO CROMATÓGRAFO DE GASES CON DETECCIÓN DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EMPLEADO PARA LA DETECCIÓN DE CDE.	112
FIGURA 21. EFICACIA DE LA EXTRACCIÓN POR SPME CON EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN.	118
FIGURA 22. EFICACIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN CON RESPECTO AL VOLUMEN DE MUESTRA EMPLEADO EN LA ETAPA DE SPME.	120
FIGURA 23. DEPENDENCIA DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO EN FUNCIÓN DEL PH DEL MEDIO EN LA ETAPA DE EXTRACCIÓN POR SPME.	121
FIGURA 24. DEPENDENCIA DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO EN FUNCIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL PROCESO DE DESORCIÓN.	122
FIGURA 25. RECUPERACIÓN OBTENIDA PARA CADA CDE EN LA ETAPA DE EXTRACCIÓN DE DMFS.	125
FIGURA 26. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OP EN LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT.	136
FIGURA 27. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE T-NP EN LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT. ..	136
FIGURA 28. ESQUEMAS SOBRE LOS QUE SE APLICAN LOS BALANCES DE MASA. LOS SISTEMAS ESTUDIADOS SON: A) SANMBR, B) UCT Y C) SANMBR-UCT.	142
FIGURA 29. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OP, T-NP, 4-NP Y BPA EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL FOTOBIOREACTOR CON CULTIVO DE MICROALGAS E ILUMINADO ARTIFICIALMENTE (EXPERIMENTO “PM”).	150
FIGURA 30. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE DISRUPTOR (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) DURANTE EL EXPERIMENTO “1”.	152
FIGURA 31. EFECTO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE OP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LOS EXPERIMENTOS “POM”, “PO”, “P” Y “O”.	154
FIGURA 32. EFECTO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE T-NP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LOS EXPERIMENTOS “POM”, “PO”, “P” Y “O”.	155
FIGURA 33. EFECTO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE 4-NP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LOS EXPERIMENTOS “POM”, “PO”, “P” Y “O”.	156
FIGURA 34. EFECTO DE SOBRE LA DEGRADACIÓN DE BPA, EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LOS EXPERIMENTOS “POM”, “PO”, “P” Y “O”.	157
FIGURA 35. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN EL EXPERIMENTO “P” (REACTOR NO AIREADO).	171

FIGURA 36.	EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN EL EXPERIMENTO "POM".	172
FIGURA 37.	EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN EL EXPERIMENTO "PO".	172
FIGURA 38.	EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN EL EXPERIMENTO "O".	173
FIGURA 39.	EVOLUCIÓN DEL OXÍGENO DISUELTOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN DEL EXPERIMENTO "PM"...	180
FIGURA 40.	EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN EL EXPERIMENTO "PM".	181
FIGURA 41.	REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO "PM" Y EL AJUSTE DEL MODELO CINÉTICO PARA EL DISRUPTOR OP.	185
FIGURA 42.	REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO "PM" Y EL AJUSTE DEL MODELO CINÉTICO PARA EL DISRUPTOR T-NP.	185
FIGURA 43.	REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO "PM" Y EL AJUSTE DEL MODELO CINÉTICO PARA EL DISRUPTOR 4-NP.	186
FIGURA 44.	REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO "PM" Y EL AJUSTE DEL MODELO CINÉTICO PARA EL DISRUPTOR BPA.	186
FIGURA 45.	DIAGRAMA DE FLUJO DEL POSTRATAMIENTO A ESCALA PLANTA PILOTO Y BASADA EN CULTIVO DE MICROALGAS. NOMENCLATURA: THI : TANQUE DE HOMOGENEIZACIÓN INTERMEDIO; FBR : FOTOBIOREACTOR; TM : TANQUE DE MEMBRANA Y CIP : CLEAN-IN-PLACE.	212
FIGURA 46.	VISTA GENERAL DE LA PLANTA SANMBR.	221
FIGURA 47.	VISTA GENERAL DE LA PLANTA PILOTO AMBR.	222
FIGURA 48.	VISTA GENERAL DE LA PLANTA PILOTO UCT.	222
FIGURA 49.	VISTA GENERAL DE LA PLANTA PILOTO PPCM.	223
FIGURA 50.	ESPECTRO DE MASAS PARA CADA UNO DE LOS CDE ESTUDIADOS EN MODO BARRIDO COMPLETO (INTERVALO DE TRABAJO COMPRENDIDO ENTRE 100 Y 300 M/z), A UN NIVEL DE CONCENTRACIÓN DE 5 µG/L CADA UNO.	229
FIGURA 51.	INFORME DE RESULTADOS DE LA HERRAMIENTA AUTOTUNE.	236
FIGURA 52.	INFORME DE RESULTADOS DE LA HERRAMIENTA TUNE EVALUATION.	237
FIGURA 53.	INFORME DE RESULTADOS DE LA HERRAMIENTA AIR AND WATER CHECK.	238
FIGURA 54.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "POM" PARA EL DISRUPTOR OP.	239
FIGURA 55.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "P" PARA EL DISRUPTOR OP.	240
FIGURA 56.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "PO" PARA EL DISRUPTOR OP.	240
FIGURA 57.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "O" PARA EL DISRUPTOR OP.	241
FIGURA 58.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "POM" PARA EL DISRUPTOR T-NP.	241
FIGURA 59.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "P" PARA EL DISRUPTOR T-NP.	242
FIGURA 60.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO "PO" PARA EL DISRUPTOR T-NP.	242

FIGURA 61.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “O” PARA EL DISRUPTOR T-NP.	243
FIGURA 62.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “POM” PARA EL DISRUPTOR 4-NP.	243
FIGURA 63.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “P” PARA EL DISRUPTOR 4-NP.	244
FIGURA 64.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “PO” PARA EL DISRUPTOR 4-NP.	244
FIGURA 65.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “O” PARA EL DISRUPTOR 4-NP.	245
FIGURA 66.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “POM” PARA EL DISRUPTOR BPA.	245
FIGURA 67.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “P” PARA EL DISRUPTOR BPA.	246
FIGURA 68.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “PO” PARA EL DISRUPTOR BPA.	246
FIGURA 69.	GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL EXPERIMENTO “O” PARA EL DISRUPTOR BPA.	247

Relación de Tablas.

TABLA 1.	NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL EXISTENTES PARA LAS SUSTANCIAS PRIORITARIAS ESTUDIADAS. RESUMEN DEL ANEXO I DE LA DIRECTIVA 2013/39/UE.....	42
TABLA 2.	DISEÑO FACTORIAL COMPLETO OBTENIDOS PARA TRES PARÁMETROS: LUZ (“P”), OXÍGENO DISUELTO (“O”) Y MICROALGAS (“M”).....	97
TABLA 3.	VARIACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO CON LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL INYECTOR.....	121
TABLA 4.	FACTORES DE CALIDAD DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CDE EN LA FRACCIÓN SOLUBLE....	123
TABLA 5.	FACTORES DE CALIDAD DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CDE EN LA FRACCIÓN SUSPENDIDA.....	126
TABLA 6.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL AFLUENTE Y EFLUENTE DEL PROCESO TC.....	128
TABLA 7.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN LA FRACCIÓN SUSPENDIDA DEL AFLUENTE Y REACTOR DEL PROCESO TC.....	129
TABLA 8.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL AFLUENTE Y EFLUENTE DEL PROCESO AMBR.....	130
TABLA 9.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL ESTUDIO PRELIMINAR DEL PROCESO SANMBR.....	132
TABLA 10.	CARACTERÍSTICAS PROMEDIO DEL AGUA DE ENTRADA A LA PLANTA SANMBR-UCT.....	134
TABLA 11.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS DISRUPTORES DETECTADOS (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT.....	135
TABLA 12.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE EE2 Y PCP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT.....	138
TABLA 13.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS DISRUPTORES DETECTADOS (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN LA FRACCIÓN SUSPENDIDA DE LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT.....	139
TABLA 14.	BALANCE DE MASA CORRESPONDIENTE A OP, T-NP, 4-NP Y BPA PARA LA PLANTA PILOTO SANMBR-UCT.....	144
TABLA 15.	BALANCE DE MASA DE LA FRACCIÓN SOLUBLE CORRESPONDIENTE A OP, T-NP, 4-NP Y BPA PARA LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL SISTEMA SANMBR-UCT.....	147
TABLA 16.	DISEÑO FACTORIAL EMPLEADO PARA ESTUDIAR LAS PARÁMETROS; LUZ (P), OXÍGENO DISUELTO (O) Y MICROALGAS (M).....	151
TABLA 17.	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL REACTOR “POM”.....	153
TABLA 18.	CONCENTRACIONES DE OXÍGENO DISUELTO.....	153
TABLA 19.	BALANCE DE MASA PARA LAS CONFIGURACIONES DE LUZ, OXÍGENO DISUELTO Y MICROALGAS ESTUDIADAS.....	160

TABLA 20.	BALANCE DE MASA DE LA FRACCIÓN SOLUBLE CORRESPONDIENTE A OP, T-NP, 4-NP Y BPA EN LOS EXPERIMENTOS "POM" Y "PM".	162
TABLA 21.	DISEÑO FACTORIAL EMPLEADO PARA ESTUDIAR CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE OP, T-NP, 4-NP Y BPA.	169
TABLA 22.	EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS DEL REACTOR "POM"	170
TABLA 23.	RECUENTO MICROBIOLÓGICO DE DEL REACTOR "POM".	170
TABLA 24.	CONSTANTES CINÉTICAS OBSERVADAS (K_{OBS}) Y TIEMPO DE VIDA MEDIA ($T_{1/2}$) PARA LOS DISRUPTORES OP, T-NP, 4-NP Y BPA.....	174
TABLA 25.	PROMEDIO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE SEGUNDO ORDEN PARA LOS DISRUPTORES ESTUDIADOS. LOS VALORES DE K_{O_2} Y K_{OH} SE EXPRESAN EN $L \cdot MOL^{-1} \cdot MIN^{-1}$	176
TABLA 26.	EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS DEL REACTOR "PM".	178
TABLA 27.	RECUENTO MICROBIOLÓGICO DEL REACTOR "PM".	178
TABLA 28.	CONSTANTES CINÉTICAS OBSERVADAS (K_{OBS}) Y TIEMPO DE VIDA MEDIA ($T_{1/2}$) PARA LOS DISRUPTORES OP, T-NP, 4-NP Y BPA.....	182
TABLA 29.	CONSTANTES CINÉTICAS DE PSEUDO-PRIMER (K_{O_2}') Y SEGUNDO ORDEN (K_{O_2}).....	182
TABLA 30.	RELACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE PSEUDO-PRIMER ORDEN Y LA CONCENTRACIÓN DE OD ENTRE EL EXPERIMENTO "PM" Y EL RESTO ("POM", "P", "PO" Y "O").	183
TABLA 31.	CARACTERÍSTICAS PROMEDIO DEL AGUA DE ENTRADA A LOS TRATAMIENTOS SECUNDARIOS.	188
TABLA 32.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN CADA PUNTO DE MUESTREO DE LOS SISTEMAS SANMBR Y TC PARA LA FRACCIÓN SOLUBLE.	189
TABLA 33.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN CADA PUNTO DE MUESTREO DEL SISTEMA AMBR PARA LA FRACCIÓN SOLUBLE.	190
TABLA 34.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN AFLUENTE Y EFLUENTE PARA EL PROCESO SANMBR PARA LOS DOS TIEMPOS DE RETENCIÓN HIDRÁULICO ESTUDIADOS.	192
TABLA 35.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP Y T-NP EN CADA PUNTO DE MUESTREO DE LOS SISTEMAS SANMBR Y TC PARA LA FRACCIÓN SUSPENDIDA.	193
TABLA 36.	PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE OP, T-NP Y 4-NP EN EL REACTOR DEL PROCESO SANMBR PARA LOS DOS TIEMPOS DE RETENCIÓN HIDRÁULICO ESTUDIADOS.....	194
TABLA 37.	EL PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS CDE (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) EN LOS TRES PUNTOS DE MUESTREO DE SISTEMA DE POSTRATAMIENTO UCT.....	196
TABLA 38.	RENDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE LOS DISRUPTORES (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) PARA EL PROCESO UCT Y PROCESO COMBINADO.....	196
TABLA 39.	CONCENTRACIÓN DE LOS DISRUPTORES (OP, T-NP, 4-NP Y BPA) HALLADOS EN LAS FRACCIONES SUSPENDIDAS LOS PROCESOS UCT Y MICROALGAS ("POM" Y "PM").	198
TABLA 40.	CONCENTRACIONES DE LOS CDE EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LOS PUNTOS DE MUESTREO ESTABLECIDOS PARA LA PPCM.	213
TABLA 41.	CONCENTRACIONES DE LOS CDE EN LA FRACCIÓN SUSPENDIDA DEL FOTOBIOREACTOR DE LA PPCM.	213

TABLA 42.	BALANCES DE MASA CORRESPONDIENTES A OP, T-NP Y 4-NP PARA LA PLANTA PPCM. ...	214
TABLA 43.	ESTRUCTURA QUÍMICA, TIEMPO DE RETENCIÓN, IONES DE CUANTIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICOS DE LOS COMPUESTOS ANALIZADOS. LOS VALORES DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN OCTANOL-AGUA (EXPRESADO COMO LOG K_{ow}) PARA LOS COMPUESTOS HA SIDO PREDICHO POR EL SOFTWARE INFORMÁTICO ALOGPS 2.1 DESARROLLADO POR VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY (VCCLAB, 2005; TETKO ET AL., 2005). ENTRE PARÉNTESIS SE MUESTRA LA ABUNDANCIA RELATIVA DE CADA ION.	225

Introducción

1. Introducción

Los recursos naturales son aquellos elementos que la naturaleza ofrece y que el hombre puede utilizar para beneficiarse de ellos.

El agua es el recurso más importante y el líquido más abundante de La Tierra, siendo éste la base de toda forma de vida conocida. Aproximadamente las tres cuartas partes del organismo están constituidas por agua, y ésta interviene en la mayor parte del metabolismo. En las plantas desempeña un importante papel en la fotosíntesis y, además, sirve de hábitat a una gran parte de los organismos.

Dada la importancia del agua para la vida de todos los seres vivos, y debido al aumento de las necesidades y consumo de ella por el continuo desarrollo de la humanidad, la generación de aguas residuales también se ha visto incrementada. Al mismo tiempo, las sociedades han ido aumentando el número de normativas y leyes para controlar la contaminación del agua. Estas leyes exigen cada vez unos mayores niveles de depuración de las aguas, por lo que se obliga a una mejora continua de los procesos de depuración de ésta. Además, la presencia de microcontaminantes orgánicos a niveles de concentración de ultratrazo (concentraciones inferiores al ng/L) ha obligado a la Comisión Europea (CE) a crear legislación específica para su control y eliminación.

Algunas de las herramientas utilizadas para prevenir el deterioro de la calidad del agua son el tratamiento de efluentes industriales y municipales, la desinfección de aguas, los desarrollos en ingeniería para el tratamiento de agua, así como una transferencia tecnológica cada vez más rápida de los centros de investigación a la industria. Dichas herramientas son aplicables a la eliminación de microcontaminantes, y se pueden realizar en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR). Todas estas herramientas, sin embargo, no están disponibles muy a menudo en los países en vías de desarrollo.

1.1. La contaminación de las aguas

Durante muchos años la medida de la contaminación del agua se basaba en la determinación de parámetros tales como Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), amonio, nitratos, fosfatos o sólidos

suspendidos. Estos contaminantes se encuentran generalmente en el agua en concentraciones del orden de mg/L.

El incremento a nivel mundial de la contaminación del agua con muchos productos químicos, tanto naturales como industriales, hace que éste sea uno de los problemas fundamentales dentro de la disciplina medioambiental. Un gran número de estos productos químicos que contaminan las aguas se catalogan como microcontaminantes orgánicos. Los microcontaminantes comprenden sustancias orgánicas e inorgánicas procedentes de procesos industriales, así como, pesticidas, fármacos, productos de higiene personal y hormonas, tanto naturales como de origen antropológico. A pesar de que los microcontaminantes se encuentran en concentraciones reducidas (niveles de concentración comprendidos entre pg/L y µg/L) muchos de ellos presentan graves problemas toxicológicos, debido a que estos compuestos son biológicamente activos y presentan un reducido índice de biodegradabilidad. Por este motivo, la contaminación medioambiental asociada a dichos microcontaminantes orgánicos es una de las preocupaciones existentes en la actualidad. Los principales problemas medioambientales actuales relacionados con esta clase de compuestos son la contaminación de agua potable, la bioacumulación de compuestos xenobióticos en los alimentos y la amenaza de la biodiversidad debido a los efectos adversos sobre el sistema endocrino de los seres vivos.

Los compuestos disruptores del sistema endocrino (CDE) forman parte de una subclase dentro de los microcontaminantes. Han sido definidos por la Comisión Europea como *“una sustancia exógena que causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto o su progenie, como consecuencia de cambios en la función endocrina”* (Lintelmann et al., 2003). Algunos de estos compuestos tales como el 17α-etinilestradiol (EE2) o 17β-estradiol (E2) disponen de elevada actividad estrogénica incluso a muy baja concentración (Jobling y Sumpter, 1993; Ge et al., 2009). Dependiendo de la dosis expuesta y del metabolismo del organismo expuesto al disruptor endocrino, este último se muestra responsable de muchos efectos adversos sobre organismos acuáticos, tales como, masculinización de caracoles, feminización de peces (Desbrow et al., 1998; Halling-Sorensen, 2000) o inhibición del crecimiento (Halling-Sorensen, 2000; Cleuvers, 2005).

En respuesta al deterioro de las aguas por contaminación debido a compuestos organohalogenados, organofosforados, órganoestánicos, sustancias con propiedades cancerígenas, mutágenas o endocrinas, sustancias bioacumulables, cianuros, metales, arsénico, fitosanitarios, materia en suspensión, sustancias que contribuyen a la eutrofización y sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno, se aprobó la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Esta Directiva ha supuesto, entre otros aspectos, el inicio de un nuevo camino para diseñar una estrategia que permita luchar contra la contaminación del agua de una forma más completa y efectiva. La Directiva Marco del Agua 2000/60/CE surge para cubrir la necesidad de desarrollar una política comunitaria integrada en materia de prevención y control de la contaminación de las aguas. La presente Directiva debería contribuir a la progresiva reducción de los vertidos de sustancias peligrosas en el agua.

1.2. Directiva Marco del Agua 2000/60/CE

La Directiva Marco del Agua 2000/60/CE (DMA) tiene como objetivo establecer un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas. En los artículos 4 y 16, se establece la obligación de aplicar las medidas orientadas a reducir progresivamente los vertidos, las emisiones y las pérdidas de las sustancias prioritarias e interrumpir o suprimir gradualmente las emisiones, los vertidos y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias. La DMA define sustancia prioritaria peligrosa como: “las sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo”. La Comisión Europea, según lo expuesto en el Anexo VIII de la Directiva 2000/60/CE, presentará una propuesta que establezca una lista de sustancias prioritarias que presenten un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él, así como un orden prioritario entre dichas sustancias. Dicha propuesta se basa en la ecotoxicidad acuática y su toxicidad humana a través de vías acuáticas de exposición, así como en pruebas de seguimiento de la contaminación ambiental y otros factores que indiquen la posibilidad de que exista

contaminación ambiental, tales como, el volumen de producción o de utilización de la sustancia, así como el modo en que se use. La Directiva 2000/60/CE en su Anexo VIII establece una primera lista indicativa de los principales contaminantes catalogados por grupos de compuestos. Estos grupos son: compuestos organohalogenados y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático; compuestos organofosforados; compuestos órgano-estánicos; sustancias y preparados, o productos derivados de ellos, cuyas propiedades cancerígenas, mutágenas o que puedan afectar a la tiroides, esteroidogénica, a la reproducción o a otras funciones endocrinas en el medio acuático o a través del medio acuático estén demostradas; hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables; cianuros; metales y sus compuestos; arsénico y sus compuestos; biocidas y productos fitosanitarios; materias en suspensión; sustancias que contribuyen a la eutrofización (en particular nitratos y fosfatos); y sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno (y computables mediante parámetros tales como DBO o DQO).

La primera lista de sustancias seleccionadas apareció en la Decisión 2455/2001/CE de 20 de noviembre de 2001, donde se incluyen 33 sustancias prioritarias. Esta lista de sustancias es examinada cada cuatro años, y las revisiones tienen en cuenta toda la información procedente de los Estados miembros, el Comité de Toxicología, Ecotoxicología y Medio ambiente, la Agencia Europea de Medio Ambiente, los programas comunitarios de investigación, las asociaciones empresariales europeas y las organizaciones de protección del medio ambiente. A través de proyectos como CADOX, EMCO, POSEIDON, P-THREE, la Comisión Europea promueve la generación de soluciones tecnológicas para el tratamiento de contaminantes que hasta el momento no ha sido posible eliminar (European Commission, 2013) (http://ec.europa.eu/environment/water/index_en.htm). Posteriormente, la Comisión Europea acordó una nueva Directiva (Directiva 2008/105/EC, posteriormente modificada por la Directiva 2013/39/UE), la cual, basándose en lo dispuesto en el artículo 16 de la Directiva 2000/60/CE, estableció unas normas de calidad ambiental (NCA) para las sustancias prioritarias. Su objeto es establecer estas NCA para las sustancias prioritarias y otros contaminantes, con el objetivo de conseguir un buen estado químico de las aguas. Las normas de calidad ambiental se definen como la concentración de un determinado

contaminante o grupo de contaminantes en el agua, los sedimentos o la biota, que no debe superarse en aras de la protección de la salud humana y el medioambiente.

La Directiva 2008/105/CE establece las NCA para 33 sustancias prioritarias (ampliado a 45 sustancias prioritarias por la Directiva 2013/39/UE), y para otros contaminantes no definidos en la Directiva 2000/60/CE. Las NCA fijadas en la Directiva 2008/105/CE y en la Directiva 2013/39/UE establecen valores de concentración del orden de $\mu\text{g/L}$ o inferior. Por lo tanto, se debe realizar un esfuerzo con el fin de mejorar las tecnologías existentes, así como desarrollar nuevas, con el fin de obtener una depuración satisfactoria y alcanzar los objetivos de calidad fijados por la directiva en los medios receptores.

Las Directivas 2008/105/CE y 2013/39/UE establecieron mediante las NCA los límites permitidos en aguas continentales y otras aguas superficiales, expresadas como valor medio anual (NCA-MA) o como concentración máxima admisible (NCA-CMA). En la Directiva 2008/105/CE también se estableció que los Estados miembros deben, entre otras cosas, controlar los sedimentos y la biota, según proceda, con la frecuencia adecuada para facilitar datos suficientes para un análisis fiable de tendencia a largo plazo de las sustancias prioritarias que tienden a acumularse en los sedimentos o la biota. Posteriormente, la Directiva 2013/39/UE estableció NCA de biota para algunas de las sustancias prioritarias.

Los microcontaminantes, también catalogados como disruptores endocrinos, estudiados en la presente tesis son: 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol (octilfenol, OP), 4-nonilfenol ramificado (t-NP), 4-n-nonilfenol (4-NP), pentaclorofenol (PCP), bisfenol-A (BPA), estrona (E1), 17β -estradiol (E2) y 17α -etinilestradiol (EE2). De entre dichos disruptores endocrinos, el OP, 4-NP y PCP se encuentran incluidos en la Directiva 2000/60/CE como sustancias prioritarias, y en el anexo I de la Directiva 2008/105/CE se indicaban los valores de las NCA. En la Directiva 2013/39/UE se ratifican dichos niveles para OP y PCP. En el caso de los nonilfenoles, la Directiva 2008/105/CE fija el valor de NCA para el nonilfenol lineal (4-NP). Sin embargo, la Directiva 2013/39/UE incluye el 4-NP como sustancia peligrosa en su Anexo I, pero no le proporciona un valor de NCA. Asimismo, el nonilfenol ramificado (t-NP) no figuraba en la Directiva 2008/105/CE, y en la Directiva 2013/39/UE se incluye como sustancia peligrosa prioritaria, y se establece un valor de NCA. En el caso de las hormonas estrogénicas, E2 y el EE2, únicamente figuran en la Directiva

2013/39/UE, la cual las incluyó en una primera lista de observación sin establecer NCA, a pesar de que el borrador de esta directiva (Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo 2011/0429 (COD)) sí estableció las NCA para E2 y EE2. El único fin de esta lista de observación es el de recabar datos de seguimiento que faciliten la determinación de medidas adecuadas para afrontar el riesgo que suponen dichas sustancias. Por otra parte, el BPA no se incluye en la Directiva 2013/39/UE pese a figurar en el Anexo III de la Directiva 2008/105/CE, el cual muestra las sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias.

Los valores de NCA-MA y NCA-CMA para los disruptores endocrinos estudiados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Normas de calidad ambiental existentes para las sustancias prioritarias estudiadas. Resumen del anexo I de la Directiva 2013/39/UE.

Compuesto	Número CAS	NCA-MA (µg/L)		NCA-CMA (µg/L)	
		Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales
Octilfenol (OP)	140-66-9	0,1	0,01	n.a.	n.a.
4-n-nonilfenol (4-NP)	104-40-5	0,3*	0,3*	2*	2*
Pentaclorofenol (PCP)	87-86-5	0,4	0,4	1	1
4-nonilfenol ramificado (t-NP)	84852-15-3	0,3	0,3	2	2
17β-estradiol (E2)	50-28-2	4 · 10 ⁻⁴ **	8 · 10 ⁻⁵ **	n.a.	n.a.
17α-etinilestradiol (EE2)	57-63-6	0,1**	0,1**	n.a.	n.a.
Bisfenol A (BPA) ***	80-05-7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Estrona (E1) ***	53-16-7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

(*) NCA establecida por la Directiva 2008/105/CE, posteriormente no contemplada por la Directiva 2013/39/UE.

(**) NCA establecida por la Propuesta de la Directiva 2011/0429 (COD) no incluida en la revisión final.

(***) Compuestos sin NCA establecida en ninguna de las Directivas aplicables.

(n.a.). No aplicable.

Respecto a la periodicidad de los controles en las aguas, la Directiva 2000/60/CE, en su anexo V, establece el intervalo máximo con que los Estados

miembros deben efectuar los controles, que para el caso de las sustancias prioritarias se fija en 1 mes. La directiva permite la modificación de este intervalo cuando los conocimientos técnicos y el criterio de los especialistas justifiquen unos intervalos mayores. La periodicidad en biota y sedimentos queda establecida en la Directiva 2008/105/CE, la cual será determinada por los Estados miembros para obtener los suficientes datos y observar la tendencia a largo plazo. En cualquier caso, el seguimiento deberá hacerse al menos una vez al año, salvo si los conocimientos técnicos y el dictamen de expertos justifican otro intervalo.

Respecto al control de sustancias prioritarias en biota y sedimentos, la Directiva 2008/105/CE establece que los Estados miembros deben controlar ambas matrices con la frecuencia adecuada para facilitar datos suficientes para un análisis fiable de tendencia a largo plazo de las sustancias prioritarias que tienden a acumularse en biota y sedimentos. La Directiva 2013/39/UE, además de ratificar lo citado en la Directiva 2008/105/CE, establece NCA para la biota, ya que algunas sustancias muy hidrófobas se acumulan en la biota y son difícilmente detectables en agua. Los valores de NCA para la biota y sedimentos no se muestran en la Tabla 1 ya que la directiva no los aplica a los compuestos estudiados. De esta manera, se debe prestar atención únicamente a la evolución de estos contaminantes con el fin de cumplir lo dictaminado en las directivas citadas.

Como complemento a la regulación establecida hasta la fecha en relación con el seguimiento del estado químico de las aguas, se ha adoptado la Directiva 2009/90/CE, por la que se establecen las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. La Directiva 2009/90/CE fija los criterios de funcionamiento mínimos de los métodos de análisis que deberán aplicar los Estados miembros en su seguimiento del estado de las aguas, sedimentos y seres vivos, así como normas dirigidas a demostrar la calidad de los resultados analíticos.

1.3. Procesos de depuración de aguas residuales

Los tratamientos biológicos tuvieron en un principio como objeto la eliminación de la materia orgánica de las aguas residuales. Posteriormente se les ha ido dando otros usos como la eliminación de nutrientes. Los tratamientos biológicos son

aquellos procesos en los que la mejora en la calidad del agua se produce por medio de reacciones bioquímicas en las que intervienen determinados microorganismos. Así como estos microorganismos son capaces de metabolizar los contaminantes mayoritarios del agua residual, también pueden emplear contaminantes minoritarios en su proceso metabólico.

A pesar de que en la actualidad la tecnología más extendida en la gestión de la depuración de agua residual es el proceso de fangos activados, existe una gran variedad de tecnologías que son capaces de proporcionar un efluente de alta calidad química y biológica. Entre estas técnicas se encuentran las basadas en biorreactores de membranas o cultivos de microalgas. La tecnología de biomembranas ha sido muy estudiada a escala planta piloto, y su implantación en EDAR se ha realizado de forma muy discreta en procesos aerobios. Respecto a los cultivos de microalgas, los más usados se basan en microalgas fotoautótrofas, por lo que estos son capaces de eliminar nutrientes, pero no materia orgánica. Este hecho ha restringido los procesos de microalgas a tratamientos terciarios. Al igual que los biorreactores de membrana, la tecnología de microalgas presenta una discreta implantación en EDAR.

1.3.1. Proceso de Fangos Activados

Los procesos biológicos se pueden clasificar según el estado en el que se encuentran los microorganismos en el reactor biológico. Se habla de procesos de cultivo en suspensión cuando los microorganismos están dispersos en el licor mezcla, y de cultivo fijo cuando la biomasa se encuentra fija en un medio inerte que es atravesado por el agua residual.

El objetivo principal de la depuración de aguas residuales es la eliminación de materia orgánica y nutrientes (Tchobanoglous et al., 2003). Tanto en tratamientos convencionales de fangos activados (TC) como en biorreactores de membranas (MBR), la materia orgánica está sujeta a procesos de sorción, volatilización y degradación tanto química como biológica y, en los MBR, también de retención en la membrana. Por otro lado, la materia inorgánica está sometida a procesos de sorción, precipitación y asimilación por el fango.

En general, el proceso de fangos activados es el sistema biológico de depuración más extendido actualmente para tratar aguas residuales, tanto domésticas como industriales. Fue desarrollado en Inglaterra por los trabajos de Andern y Lockett en 1914 y denominado así al producir una masa activada de microorganismos capaz de estabilizar un residuo orgánico por vía aerobia. En la actualidad, existen muchas versiones del proceso original, pero todas con la misma base (Tchobanoglous et al., 2003). Un esquema general del proceso se puede observar en la Figura 1.

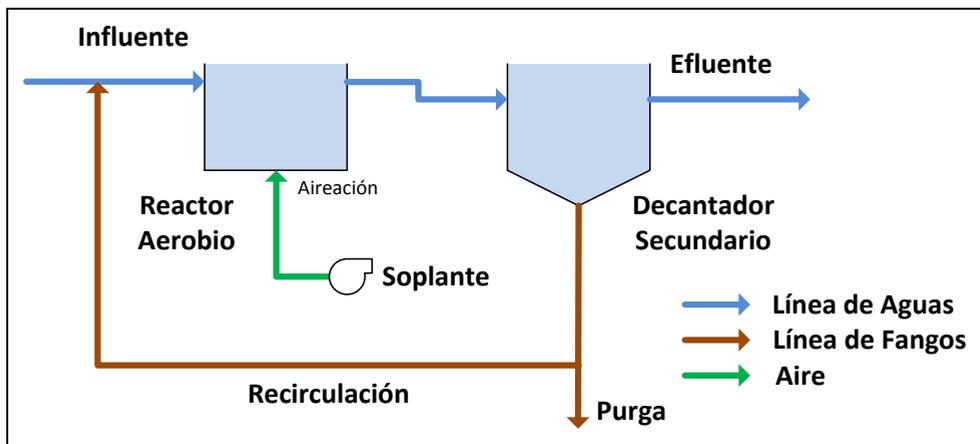


Figura 1. Esquema típico del tratamiento de fangos activados.

A escala industrial el proceso de depuración de aguas residuales por fangos activados consta de:

- una primera etapa de aireación, en la que se produce la asimilación y degradación de la materia orgánica por parte de los microorganismos.
- una segunda etapa en donde se lleva a cabo la sedimentación de los fangos generados en la primera.
- una recirculación de fangos, necesaria para conseguir tiempos de retención celular superiores al tiempo de retención del agua en el sistema.

Por lo tanto, en el tratamiento por fangos activados, el reactor aerobio pone en contacto el agua residual a tratar con los microorganismos responsables del proceso, los cuales se encuentran en suspensión en el seno del citado reactor. Si se generan condiciones en las que no existe limitación de oxígeno ni de sustrato, es posible alcanzar velocidades elevadas de actividad microbiana. De esta forma, se consigue tanto el consumo de la materia orgánica como su transformación a productos finales estables. El sistema de fangos activados también puede incluir una etapa anaerobia y anóxica, las cuales son necesarias para la eliminación biológica de nutrientes.

La concentración de biomasa en el reactor biológico se regula mediante los caudales de purga y recirculación de fango decantado. En este proceso, el tiempo de retención hidráulico (TRH) del sistema no coincide con el tiempo de retención celular (TRC) o edad del fango. El TRC se define como el tiempo de residencia medio de la biomasa en el reactor y es uno de los parámetros más importantes en el diseño del proceso, ya que la acción de los microorganismos depende entre otros factores del tiempo que se mantengan en contacto con la materia orgánica.

1.3.2. Biorreactores de Membrana

Los biorreactores de membrana (MBR) se basan en los mismos principios que los reactores de fangos activados (TC), por lo que respecta al proceso biológico. La principal diferencia entre ambos radica en el modo en el que se separa la biomasa del agua tratada. Los MBR emplean una separación sólido-líquido con una membrana, la cual evita el proceso de sedimentación y se obtiene un permeado libre de sólidos y patógenos (Tchobanoglous et al., 2003). Este sistema estaba inicialmente basado en configuraciones de recirculación externa, donde las membranas son un proceso ubicado en una unidad separada. Sin embargo, en la actualidad se emplea la configuración sumergida, donde las membranas se encuentran sumergidas en el reactor biológico (ver Figura 2).

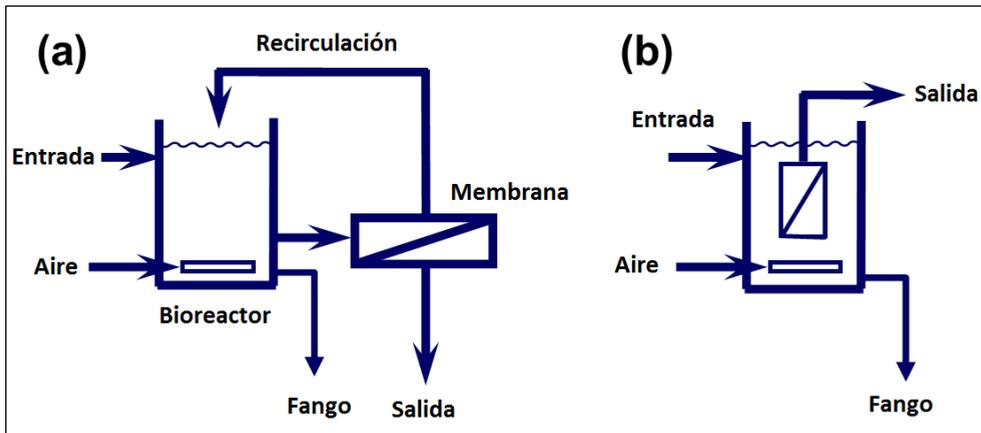


Figura 2. Configuraciones de un reactor de biomembrana de recirculación externa (a) y de biomembrana sumergida (b) (Adaptado de Judd y Judd, 2011).

Las ventajas de un tratamiento por biomembranas son: efluente libre de sólidos suspendidos, desinfección parcial por filtración, reducidas dimensiones de trabajo y retención de la mayor parte de microorganismos, generando una mayor diversidad microbológica.

A pesar de que la tecnología de membrana existe desde hace aproximadamente 35 años, hay muy pocas publicaciones científicas hasta mediados de la década de 1990. En la Figura 3 se observa la evolución de las publicaciones científicas en biorreactores de membranas en los últimos años. En esta figura se muestran tanto los biorreactores aerobios como los anaerobios. La búsqueda bibliográfica comprende desde la primera publicación en 1986 hasta 2014. Se observa cómo a partir del año 2005 la aparición de este tipo de publicaciones experimenta un aumento considerable, mientras que es a partir del año 2009 cuando se observa una estabilización en dichas publicaciones. Los datos mostrados en la Figura 3 fueron extraídos de la base de datos Scopus (2015). Los términos empleados para realizar la búsqueda fueron “membrane”, “bioreactor” y “wastewater”. Mientras que los campos de búsqueda para ambos términos fueron “Article title”, “Abstract” y “Keywords”.

Geográficamente el 75% de dichas publicaciones se centró en ocho países: Reino Unido, Estados Unidos, Japón, Francia, China, Corea del Sur, Alemania y Canadá (Yang et al., 2006).

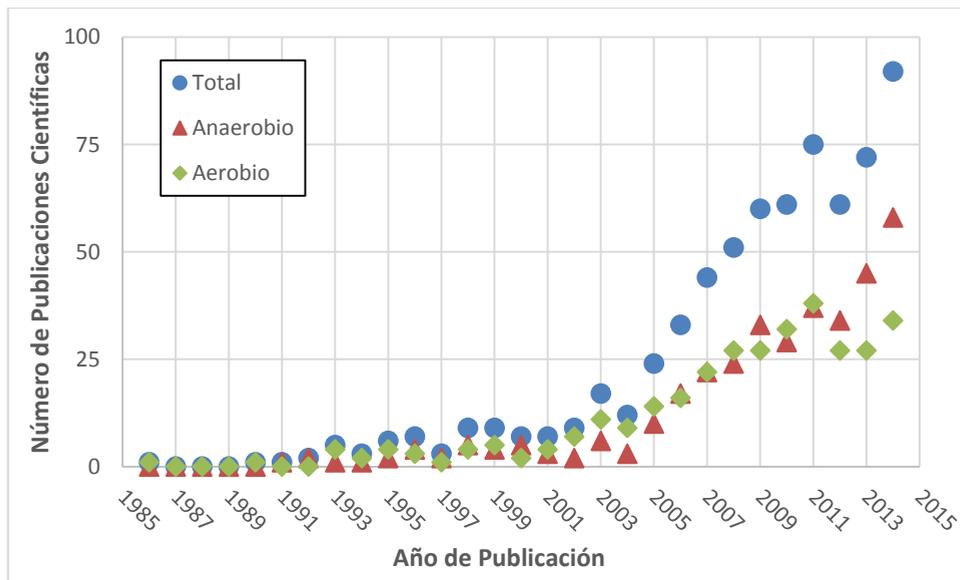


Figura 3. Referencias bibliográficas publicadas entre 1986 y 2014 basadas en depuración de agua residual mediante procesos de membrana (Scopus, 2015).

Inicialmente la tecnología de membranas se aplicó a procesos aerobios, posteriormente se extendió su uso a procesos anaerobios, los cuales se consideran alternativas atractivas para el desarrollo de sistemas sostenibles de tratamiento de aguas residuales.

Los biorreactores de membranas aerobios presentan un elevado coste de funcionamiento debido principalmente al proceso de aireación asociado a la limpieza de las membranas. Este efecto se puede ver acrecentado si la concentración de sólidos suspendidos es elevada, ya que también lo hace la viscosidad. En estos casos la demanda energética empleada en la aireación aumenta (Kraume y Drews, 2010).

Las ventajas ofrecidas por un tratamiento biológico anaerobio acoplado a la tecnología de membranas son: baja producción de residuo biológico, bajo aporte de nutrientes, capacidad para tratar altas cargas orgánicas, y la producción de biogás como un producto final que da lugar a la producción de energía neta dentro de la planta de tratamiento mediante un equipo de cogeneración (Huang et al., 2010).

Los biorreactores de membranas anaeróbicos tienen un elevado potencial para aguas residuales con elevada carga orgánica, las cuales presentan una elevada concentración de sólidos suspendidos, ya que éstos se quedan retenidos en la membrana. Pero incluso para aguas con poca carga orgánica, las cuales suelen tratarse con MBR aerobios, los MBR anaerobios pueden ser una buena alternativa (Kraume y Drews, 2010). Los costes operacionales para un MBR anaerobio son menores debido a que los rendimientos de crecimiento de la biomasa son menores y se produce biogás, lo que ocasiona un menor gasto en gestión de fangos y un beneficio por el aprovechamiento energético del biogás (Fuchs et al., 2003). La ausencia de eliminación de nutrientes y los largos períodos de puesta en marcha son algunas de las limitaciones de este tipo de tratamiento (Kraume y Drews, 2010).

Una de las principales desventajas del proceso de membranas reside en la deposición de materiales sobre la superficie de la membrana en la etapa de filtración. Este fenómeno se conoce como ensuciamiento o fouling. La mayoría de estudios, tanto en procesos aerobios como anaerobios, se han orientado hacia la mejora y desarrollo de nuevos materiales para membranas y la mejora del proceso de lavado que reduzcan la formación de ensuciamiento, así como en el establecimiento de etapas eficientes de contralavado y burbujeo (Drews, 2010).

Los trabajos enfocados hacia la limpieza física de membranas anaerobias basadas en el establecimiento de un adecuado programa de operación, demuestran ser una herramienta eficaz para evitar la formación de una torta de sólidos sobre la superficie de la membrana (Robles et al, 2013). Las etapas físicas básicas de operación son: a) Filtración, se ejerce una depresión en el interior de las fibras, favoreciendo que el permeado atraviese la membrana, b) Relajación, se detiene la depresión y el flujo y el biogás reintroducido favorece la eliminación de una parte de la torta, c) Contralavado, se impulsa una parte del permeado previamente filtrado en sentido contrario al de la etapa de filtración, eliminando la torta más resistente, d) Desgasificación, consiste en una filtración puntual a un flujo más elevado y de corta duración que permite arrastrar el gas acumulado en la cabeza de las fibras y llevarlo al desgasificador, e) Ventilación, se reintroduce una parte del permeado al tanque de membrana, haciéndolo pasar previamente por el desgasificador en lugar de a través de las membranas.

Algunos autores (Robles, 2013; Giménez, 2014) observaron que el correcto diseño de ciclos de limpieza basados en el empleo de las etapas previamente descritas evita la formación de fouling irreversible, haciendo innecesario el empleo de una limpieza química. El protocolo de lavado desarrollado en estos trabajos está programado para que se active cuando la presión transmembrana sea mayor de 0,4 bar. La secuencia de actuación de cada una de las etapas individuales se define en referencia a un ciclo básico de filtración-relajación (FR). En la Figura 4 se presenta un diagrama de flujo de la secuencia de operación de los módulos de membrana:

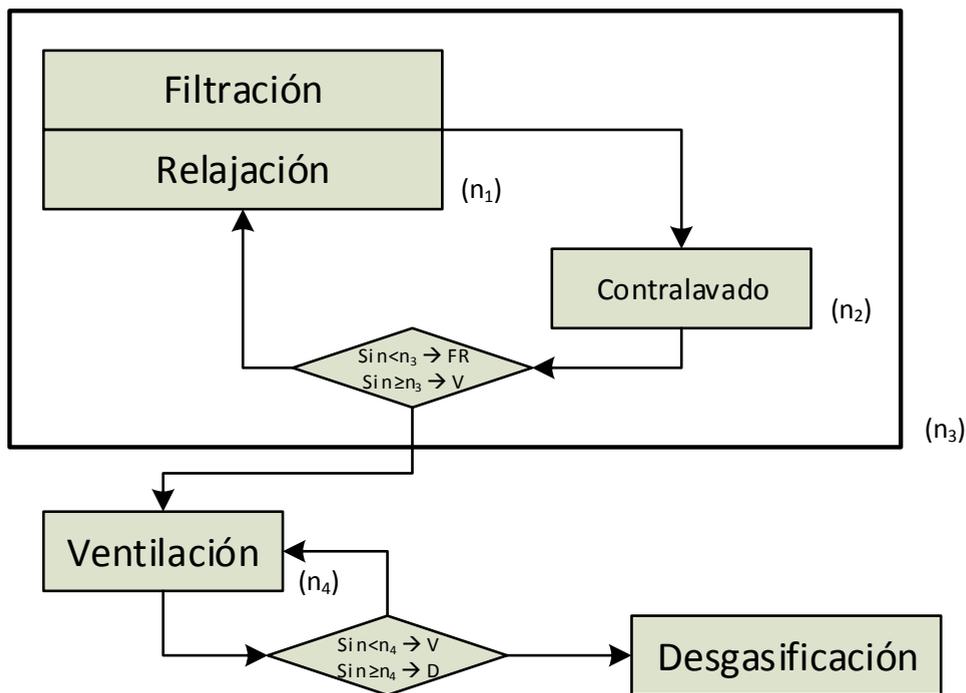


Figura 4. Diagrama de flujo de operación de los módulos de membrana (Adaptado de Giménez, 2014). Nomenclatura: FR: Ciclo Filtración-Relajación; V: Ciclo Ventilación; D: ciclo Desgasificación.

1.3.2.1. Aplicación de la tecnología de membranas para la eliminación de disruptores endocrinos

En la Figura 5 se observa la evolución de las publicaciones científicas orientadas a la eliminación de disruptores desde la primera publicación 2002, hasta la

actualidad. Los términos empleados para realizar la búsqueda fueron “membrane”, “bioreactor”, “endocrine” y “disruptor”. En la Figura 5 se puede observar como el número de publicaciones es reducido, alcanzando un máximo en 2010 con 8 publicaciones.

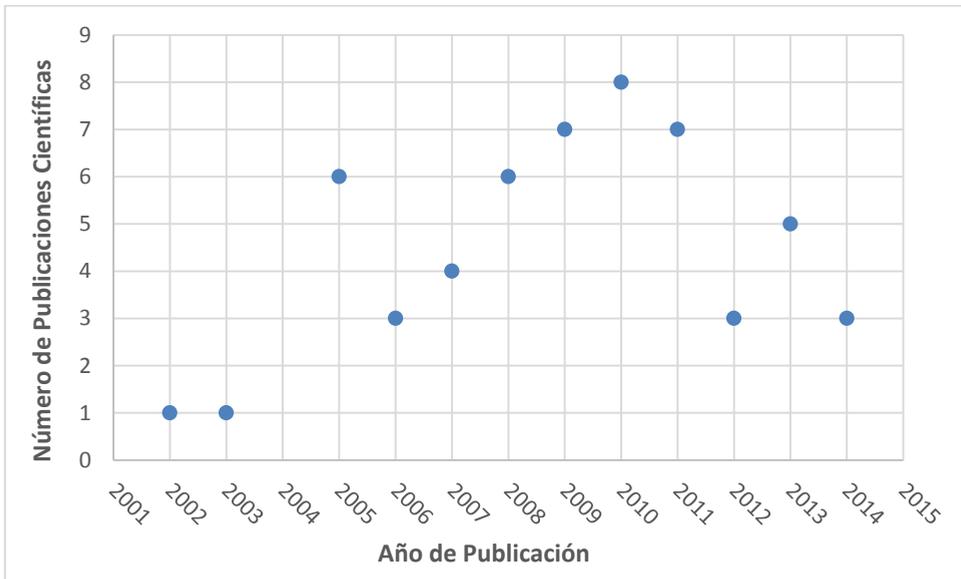


Figura 5. Referencias publicadas entre 2002 y 2014 relacionadas con la eliminación de disruptores endocrinos en un proceso biológico de membranas (Scopus, 2015).

Tras comparar los rendimientos de eliminación de microcontaminantes (t-NP, E2 y EE2) tanto en sistemas convencionales de fangos activados, como en biorreactores de membrana, se observó que los rendimientos de eliminación mejoraron al emplear biorreactores de membranas (Holbrook et al., 2004; Cirja et al., 2006). Otros estudios sobre el comportamiento de microcontaminantes (t-NP y BPA) en un proceso de biomembranas, observaron que la eliminación de los microcontaminantes se basaba en la adsorción de los mismos sobre las partículas de fango (Wintgens et al., 2002). Monsalvo et al. (2014) llevaron a cabo estudios basados en el comportamiento de los microcontaminantes (OP, t-NP, BPA, E1, E2 y EE2) en una planta piloto de membranas anaerobias. En su estudio concluyeron que la principal vía de eliminación de estos microcontaminantes fue la biodegradación, asimismo el proceso de sorción sobre la biomasa y el fouling representaba un papel

importante en la capacidad de eliminación de microcontaminantes del biorreactor de membranas anaerobio.

Los estudios de Li et al. (2000) se centraron en la etapa de filtración de la membrana, y concluyeron que el parámetro Peso Molecular de Corte (PMC) es independiente de la eliminación de los alquilfenoles polietoxilatos (precursores de OP y t-NP). Otros autores indican que este comportamiento es atribuible a la capa de gel formada en la superficie de la membrana durante su uso (Comerton et al., 2009). Sin embargo, la formación de este gel es contraproducente para el uso de la membrana, ya que produce un aumento de la presión transmembrana, aumentando así, el consumo de energía necesaria para la etapa de filtración.

Experimentos realizados en discontinuo indican que un aumento del TRC también mejora la eliminación de los E1, E2 y EE2. Además, una baja concentración de sólidos en el biorreactor de membrana produce un aumento de la eliminación de los disruptores endocrinos (Joss et al., 2004; Shi et al., 2004).

1.3.3. Microalgas

El término microalga incluye a los microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas tanto las cianobacterias como las algas eucariotas.

Las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz solar y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. De esta forma, las microalgas se dividen en:

- Fotoautótrofas: aquellas que obtienen la energía de la luz solar y carbono de compuestos inorgánicos.
- Fotoheterótrofas: las que obtienen la energía de la luz solar y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- Mixotrófica: algas que son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos. Por lo tanto, obtienen la energía de la luz solar y del carbono orgánico. Su fuente de carbono procede tanto de carbono orgánico como inorgánico.

- Heterótrofas: los compuestos orgánicos son la única fuente de energía y carbono.

Actualmente, la producción fotoautótrofa de algas es la única técnica económicamente viable a gran escala. Las aplicaciones de las microalgas son muy amplias: biorremediación, alimentación animal (acuicultura), producción de biocombustibles, ácidos grasos poliinsaturados, biofertilizantes o proteínas recombinantes (Brennan y Owende, 2010), entre otras.

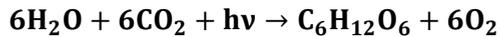
La composición de las algas depende del proceso de cultivo y de la especie considerada. En general, las cianobacterias tienen un contenido de hasta un 20% en lípidos, mientras que el contenido lipídico de algas eucariotas oscila entre el 20 y el 50 % en peso seco (Brennan y Owende, 2010). La relación C:N varía entre 6:1 y 9:1, y la relación N:P varía entre 16:1 y 30:1, dependiendo de las especies consideradas. La fórmula molecular que se puede considerar de forma general para representar la composición de las algas es $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ (Grobbelaar, 2004), por lo que se puede deducir que un kilogramo de microalgas contendría: 523,9 g de carbono, 74,5 g de hidrógeno, 296,5 g de oxígeno, 92,2 g nitrógeno y 12,76 g de fósforo. Sin embargo, estudios experimentales concluyeron que un kilogramo de microalgas contenía: 480 g de carbono, 46 g de nitrógeno, 9,9 g de fósforo, 8,2 g de potasio, 3,8 g de Mg y 2,2 g de azufre (Lardon et al., 2009; Ras et al., 2011). Asimismo, el tamaño de las microalgas eucariotas puede variar entre 0,5 y 30 μm , mientras que las cianobacterias pueden llegar a medir hasta 200 μm (Markou y Georgakakis, 2011).

1.3.3.1. Tipos de algas y función fotosintética

La mayoría de las microalgas emplean la energía solar para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP^+ a NADPH. El NADP^+ es la forma oxidada del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas. La forma reducida, NADPH, tiene como función la fijación del CO_2 en hidratos de carbono. El NADPH actúa como transportador de energía, la cual se

emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas.

La estequiometría del proceso fotosintético en el que se libera oxígeno molecular es:



donde, h es la constante de Planck y ν la frecuencia de la energía lumínica.

La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, orgánulos citoplasmáticos exclusivos de las células fotosintéticas. En su interior se encuentra el estroma, un medio interno donde tienen lugar las reacciones oscuras del ciclo de Calvin. El estroma alberga componentes necesarios para la fotosíntesis, como la principal enzima responsable de la fijación del anhídrido carbónico, la RBP-carboxilasa o RuBisCO. Es una proteína formada por 16 polipéptidos que cataliza la transformación del anhídrido carbónico a una forma orgánica.

Los pigmentos fotosintéticos se encuentran localizados en la membrana de los tilacoides, sacos aplanados que forman parte de la estructura de la membrana interna del cloroplasto. Los pigmentos que absorben la luz solar son:

- Clorofila: La *clorofila a* es un pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en química. Absorbe en dos regiones del espectro, el rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm). Las células fotosintéticas casi siempre contienen un segundo tipo de clorofila, la *clorofila b*, la cual tienen un espectro de absorción ligeramente diferente al de la *clorofila a*. El contenido de clorofila del alga fitoplanctónica está comprendido entre el 1 y 2 % en peso seco.
- Carotenoides, los cuales absorben en la región del azul (400-500 nm) y se encuentran principalmente en las bacterias purpúreas. Los carotenoides se dividen en carotenos y xantofilas.
- Ficobilinas, que absorben en la región anaranjada del espectro (600-650 nm). Tan solo presentes en cianobacterias y algas rojas.

Cyanobacteria

El filo de las *cyanobacteria* o cianofíceas son un extenso grupo de bacterias perteneciente al reino de las procariotas. Las *cyanobacteria* son organismos planctónicos sin motilidad propia, con diferencias morfológicas entre sí, y su presencia es común en medios extremos.

Las *cyanobacteria* tienen junto a la clorofila dos pigmentos, ficocianina y ficoeritrina, que les confieren el aspecto azul-verdoso característico. Dentro del filo de las *cyanobacteria*, el género *Spirulina*, tiene su intervalo de pH óptimo comprendido entre 9 y 10. La temperatura óptima de crecimiento varía en función de la cepa de trabajo. La eficiencia de fijación de anhídrido carbónico es de las más altas de las microalgas. Las especies del género *Spirulina* son capaces de crecer en medios con elevada carga orgánica y, junto con especies de los géneros *Oscillatoria* y *Anabaena*, son capaces de emplear el nitrógeno molecular (N_2) como única fuente de nitrógeno. Y es este nitrógeno molecular el que reducen a amonio con la ayuda de una enzima nitrogenasa. La especie *Spirulina platensis* es la más estudiada debido a su importancia dentro del campo de la alimentación y producción de metabolitos.

El género *Anabaena* corresponde a un grupo de *cyanobacteria* del orden *Nostocales* de reproducción asexual. Este género es autótrofo por tener una clorofila dispersa, común en agua dulce (también se encuentran en aguas saladas y en hábitats terrestres). El género *Anabaena*, tiene su rango óptimo de pH entre 7,4 y 8,4, viéndose afectado su rendimiento a pH mayores de 9. Por último, el género de *cyanobacteria* de agua dulce *Nostoc*, perteneciente a la familia *Nostocaceae*, del orden *Nostocales*, que forma colonias esféricas y compuestas de filamentos.

Chlorophyta

El filo de las *chlorophyta* son un grupo importante de microalgas pertenecientes al reino de las eucariotas, las cuales deben su color a la clorofila a y b, carotenoides y xantofilas presentes en su estructura. Dicho grupo es capaz de provocar florecimientos. La clase más destacada de *chlorophyta* son las *chlorophyceae*, entre

las que a su vez destaca el orden de las *Chlorococcales* que se caracterizan por estar desprovistos de flagelos.

Dentro del filo de las *chlorophyta* se encuentran los géneros *Neochloris* y *Scenedesmus* que pertenecen a la clase de las *chlorophyceae*, mientras que el género *Chlorella* pertenece a la clase de las *Trebouxiophyceae*. Dentro del género *Neochloris*, la especie *Neochloris oleoabundans* presenta un elevado contenido en lípidos, por lo que se ha considerado como un organismo candidato para cosméticos y la producción de biocombustibles, así como material de alimentación para los mejillones de agua dulce. Esta especie es capaz de acumular hasta el 80 % de sus lípidos totales en forma de triglicéridos. Las especies del género *Scenedesmus* se emplean para la obtención de bioproteínas. Las especies pertenecientes al género *Chlorella* se emplean en la depuración de aguas debido a su elevada capacidad para la eliminación de nutrientes.

1.3.3.2. Aplicación de los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales

La fitorremediación es un conjunto de tecnologías que utilizan las plantas para la eliminación o transformación de contaminantes de origen antropológico. Dentro de esta definición se incluyen los nutrientes presentes en el agua. Debido a que la mayoría de las microalgas empleadas en la depuración de agua residual son fotoautótrofas, éstas son incapaces de degradar la materia orgánica. Sin embargo existen estudios que demuestran su capacidad para la asimilación de nutrientes (Ruiz-Martínez et al., 2012; Kim et al., 2013; Ruiz-Martínez et al., 2014), lo que cobra especial importancia en zonas sensibles al vertido de nutrientes. La fitorremediación lleva asociada una producción de biomasa, ya sean plantas superiores, macroalgas o microalgas.

Debido a su capacidad de eliminación de nutrientes las microalgas han sido muy utilizadas en la depuración de aguas tanto urbanas como industriales.

Agua residual urbana.

La principal ventaja del empleo de microalgas para la depuración de agua residual radica en su capacidad para la eliminación de nutrientes, principalmente

nitrógeno y fósforo. Por ello la mayoría de estudios se centran en el empleo de microalgas como sistema de tratamiento terciario, es decir, el paso intermedio entre la etapa de eliminación de la materia orgánica, y la etapa de vertido. Algunas especies como *Chlorella* y *Scenedesmus* presentan una elevada tolerancia a medios con altas concentraciones de nutrientes (Park et al, 2010; Wang et al., 2010). Una de las primeras descripciones del empleo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales se remonta a los trabajos de Oswald et al. (1957). Las algas han ido ganando atención desde entonces debido a su potencial para acumular nutrientes de las aguas residuales urbanas (de-Bashan y Bashan, 2010) y agrícolas (Olguín, 2003). Junto a los cultivos de algas en suspensión, otros autores han investigado la depuración de aguas residuales mediante algas fijas en medios como el alginato, quitosán o mediante biofilms (Abe et al., 2008).

El empleo de *Chlorella elipsoidea* como tratamiento secundario de aguas residuales proporcionó eliminaciones del 99 % y 95 % de nitrógeno y fósforo total, respectivamente (Yang et al., 2011). Igualmente se consiguieron rendimientos de eliminación de nutrientes a escala de laboratorio superiores a 67 % y 97 % para amonio (N-NH_4^+) y fosfato (P-PO_4^{3-}), respectivamente (Ruiz-Martínez et al., 2012).

Mediante la especie *Neochloris oleoabundans* algunos autores fueron capaces de eliminar completamente nitrógeno y fósforo de aguas residuales con elevadas concentraciones de nitrato y fosfato (218 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ y 108 mg $\text{P-PO}_4^{3-}/\text{L}$), obteniendo de forma paralela una elevada producción de biomasa ($0,58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (Wang y Lan, 2011).

Se han estudiado tanto monocultivos como cultivos de varias especies de microalgas en aguas residuales artificiales y reales, concluyendo, sobre un extenso número de especies de microalgas, que éstas son aptas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales y que la eficacia del proceso es elevada. Algunas especies estudiadas pertenecen al filo de las *cyanobacteria*, tales como, *Phormidium* y *Spirulina platensis* (Lodi et al., 2003; Olguín et al., 2003), y otras al filo de las *chlorophyta*, tales como *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus obliquus* (Martínez et al., 2000; Park et al, 2010) y *Chlorella sp.* (Hernández et al., 2006; Wang et al., 2010).

Numerosos estudios se han centrado en la fijación de anhídrido carbónico por parte de las algas, debido al efecto invernadero del gas y al hecho de que las microalgas y cianobacterias pueden retener las moléculas del anhídrido carbónico más eficientemente que las plantas terrestres.

Las algas son capaces de contribuir a la degradación de los contaminantes presentes en el medio ambiente, ya sea por transformación directa del contaminante o por la mejora del potencial de degradación de la población microbiana existente. La biomasa algal resultante del tratamiento de las aguas residuales puede ser convertida en productos de valor añadido. En función de las especies de algas empleadas, la biomasa resultante se puede aplicar para diferentes propósitos, tales como la extracción de productos de valor añadido como carotenoides, la producción de biocombustible (Rawat et al., 2011) o bioplásticos (Hempel et al., 2011).

Agua residual industrial

En el caso de aguas residuales industriales, la concentración de nutrientes suele ser reducida, por lo que su eliminación no es una prioridad. Sin embargo, la eliminación de metales pesados o compuestos tóxicos orgánicos (hidrocarburos, biocidas, tensioactivos) se convierte en el factor de principal interés, los cuales pueden ser eliminados por adsorción sobre las microalgas bajo las condiciones apropiadas. Al presentar, generalmente, las aguas industriales una concentración de nutrientes inferior a las aguas residuales urbanas, las microalgas presentan una tasa de crecimiento más lenta, por lo que la biomasa generada es inferior.

1.3.3.3. Eliminación de disruptores endocrinos con cultivos de microalgas

En la bibliografía existen pocos trabajos donde se evidencia la posibilidad de emplear un cultivo de microalgas para la eliminación de disruptores endocrinos de las líneas, tanto de aguas como de fango.

En el trabajo de Nakajima et al., (2007) se observó cómo un cultivo formado por las especies *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Micractinium pusillum*, *Coelastrum reticulatum*, *Carteria cerasiformis*, *Gonium pectorale* y *Cyanophora paradoxa* fue capaz de

eliminar BPA por acción de la enzima glicosil transferasa seguida de una posterior bioacumulación en dicho cultivo. Otros autores estudiaron la fotodegradación de BPA, observándose cómo las microalgas mejoran el proceso de eliminación por fotodegradación debido a la secreción de radicales hidroxilo por parte de las microalgas (Peng et al., 2006). Dicho potencial de fotodegradación se ve mejorado en presencia de ácido húmico y Fe^{3+} . Respecto a la eliminación de OP y t-NP, se observó que un cultivo de *cyanobacteria* fue capaz de mejorar la eliminación de dichos compuestos a bajos niveles de concentración (Stoichev et al., 2010). Mientras que los trabajos de Corvini et al., (2006a) estudiaron la degradación de t-NP desde el punto de vista de la dinámica química, proponiendo un mecanismo donde la etapa inicial está compuesta por un ataque electrofílico sobre el carbono en la posición 4 del anillo aromático (ipso-sustitución). Para el estudio del citado mecanismo, los autores emplearon un cultivo de *Sphingomonas sp.*

Trabajos realizados con la cepa *Scenedesmus sp.* mostraron cómo era capaz de degradar tanto los mono- como los di- nitrofenol tras 5 días de aclimatación (Klekner y Kosaric, 1992). Las cepas *Scenedesmus sp.* y *Chlorococum sp.* convirtieron el α -endosulfán, insecticida catalogado como disruptor endocrino, en endosulfán sulfato, endosulfadiol, β -endosulfán, endosulfán aldehído y endosulfán éter (Sethunathan et al., 2004). También se observó cómo un cultivo de microalgas con siete especies distintas, entre las que se encuentran *Scenedesmus platydiscus* y *Chlorella minister* fueron capaces de eliminar elevadas concentraciones de pireno (Lei et al., 2002). Algunos trabajos estudiaron la capacidad de eliminación de antraceno con la cepa *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de crecimiento autotróficas y heterotróficas. El resultado observado fue que, bajo condiciones heterotróficas, el rendimiento de eliminación del antraceno fue superior al obtenido bajo condiciones autotróficas (Yan et al., 2002).

El número de publicaciones realizadas sobre la aplicación de microalgas a la eliminación de disruptores endocrinos es reducido. Los términos empleados para realizar la búsqueda fueron “algae”, “endocrine” y “disruptor”. La búsqueda bibliográfica realizada en la base de datos Scopus (2015) indica que la primera publicación se realizó en 2003 y hasta la actualidad el número de publicaciones no ha superado la centena. En la Figura 6 se muestra una clasificación de las

publicaciones en revistas científicas internacionales referentes a la eliminación de disruptores endocrinos por microalgas.

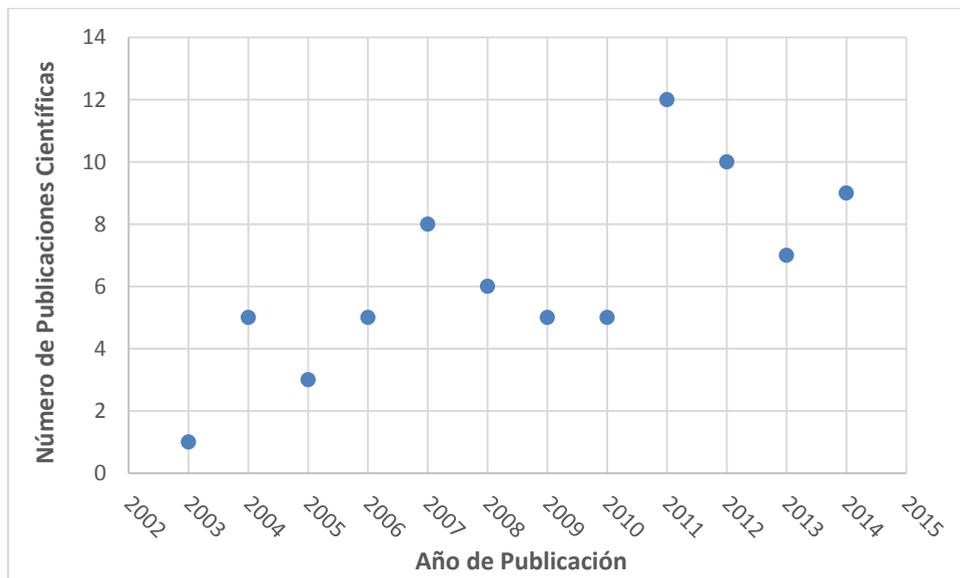


Figura 6. Referencias publicadas entre 2003 y 2014 relacionadas con la eliminación de disruptores endocrinos mediante microalgas (Scopus, 2015).

1.4. Biodegradación de los disruptores endocrinos y sus precursores en EDAR

1.4.1. Alquilfenoles polietoxilatos

Los alquilfenoles polietoxilatos (APEO) son un grupo de compuestos catalogados como tensioactivos no iónicos, ampliamente utilizados tanto a nivel doméstico como industrial. A su vez los alquilfenoles polietoxilatos están compuestos por dos grupos principales, los nonilfenoles polietoxilatos (NPEO) y los octilfenoles polietoxilatos (OPEO). Como se puede observar en la Figura 7, los APEO son un grupo de compuestos con un radical alquílico de longitud variable que engloba a los subgrupos OPEO y NPEO, cuyo radical alquílico presenta una longitud de 8 y 9 carbonos, respectivamente.

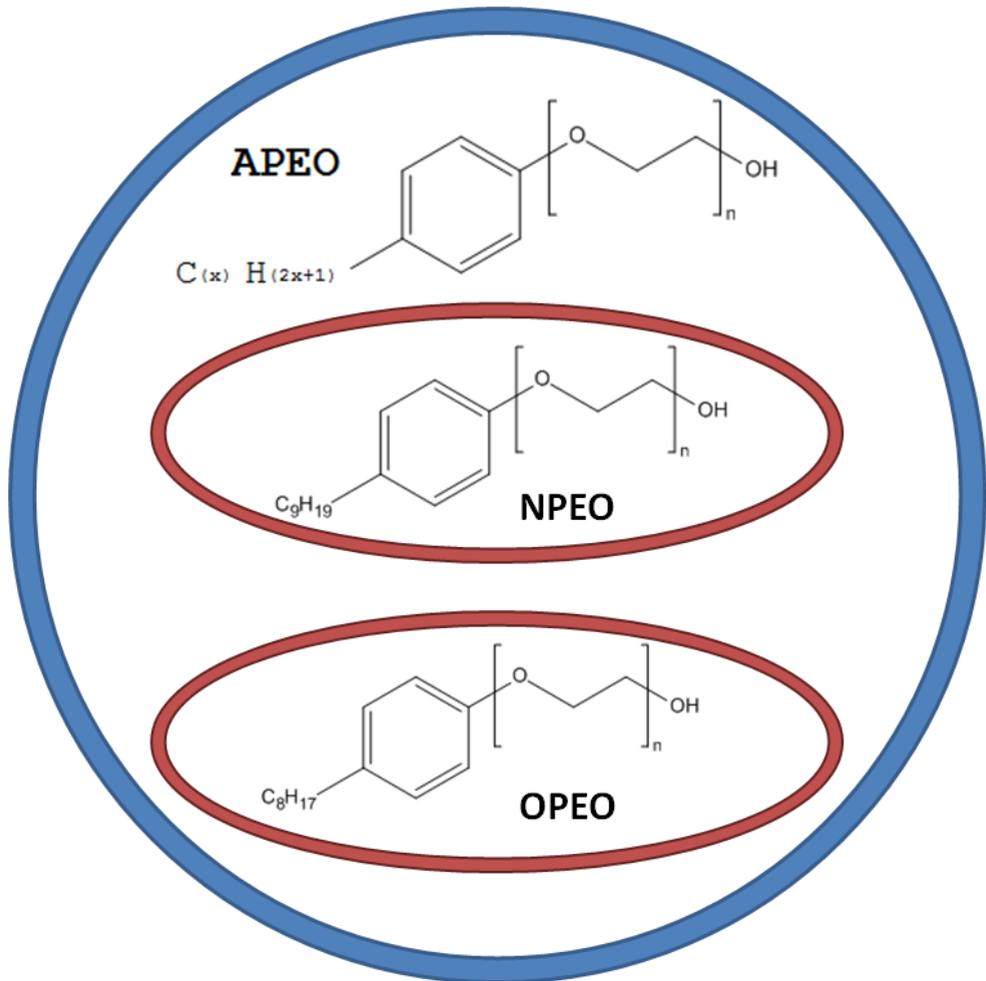


Figura 7. Agrupación de los diferentes grupos de polietoxilatos, así como la estructura química de cada uno de ellos.

A pesar del extendido uso de los nonilfenoles polietoxilatos, su uso ha sido restringido por la legislación vigente. Mediante el Reglamento 552/2009 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), se establecen las restricciones a la fabricación, la comercialización y el uso de determinadas sustancias, mezclas y artículos peligrosos. En el anexo XVII de dicho reglamento se establece que no se podrá ni comercializar ni usar los nonilfenoles polietoxilatos como sustancias o en mezclas con una concentración igual o superior al 0,1 % en peso. Los nonilfenoles

polietoxilatos también están sujetos al Reglamento 689/2008 relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos.

A pesar de las restricciones descritas para los nonilfenoles polietoxilatos, no existe legislación aplicable para los octilfenoles polietoxilatos.

Respecto al proceso de fabricación de NPEO y OPEO, éste se realiza mediante la fusión de grupos etoxi (-CH₂-CH₂-O-) sobre las moléculas de 4-nonilfenol (ramificado) (t-NP) y Octilfenol (OP) respectivamente. El proceso de degradación de NPEO y OPEO sigue el mecanismo inverso, por lo que los productos finales son t-NP y OP.

Varios autores han analizado la degradación de los alquilfenoles polietoxilatos en EDAR. La Figura 8 muestra un esquema de los procesos de degradación de los alquilfenoles polietoxilatos. Se ha observado que tras la aplicación de un tratamiento aerobio, el grupo funcional alcohol es parcialmente transformado en un grupo carboxilo, además de producirse la escisión de los grupos etoxi. Sin embargo, tras la aplicación de tratamientos únicamente anaerobios se produce la escisión gradual de los grupos etoxi (Sato et al., 2001; Sato et al., 2003; Lin et al., 2010) (ver Figura 8). El proceso anaerobio presenta como productos intermedios de degradación los alquilfenoles mono- y di- etoxilatos, mientras que el proceso aerobio presenta dos tipos de intermedios, el alquilfenoletoxicarboxilato y el ácido carboxílico alquilpolietoxicarboxilato. Bajo condiciones anaerobias, tanto los alquilfenoles mono- y di- etoxilatos como el alquilfenoletoxicarboxilato presentan como productos finales de degradación los alquilfenoles (OP y t-NP). Mientras la degradación del ácido carboxílico alquilpolietoxicarboxilato se produce únicamente bajo condiciones aerobias, obteniéndose como productos finales el ácido carboxílico alquiletoxicarboxilato de cadena corta ($n \leq 2$) (Lian y Liu, 2013).

El proceso de degradación bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias aumenta la toxicidad de los compuestos, debido al aumento del carácter lipófilo. Este efecto se debe a que la escisión de los grupos etoxi (-CH₂-CH₂-O-) de las moléculas polietoxiladas produce la eliminación de átomos polares (oxígeno), por lo que el carácter lipófilo aumenta (Careri et al., 2003). Cada uno de los grupos etoxi escindidos genera como subproducto de reacción el ácido glicólico (ver Figura 8).

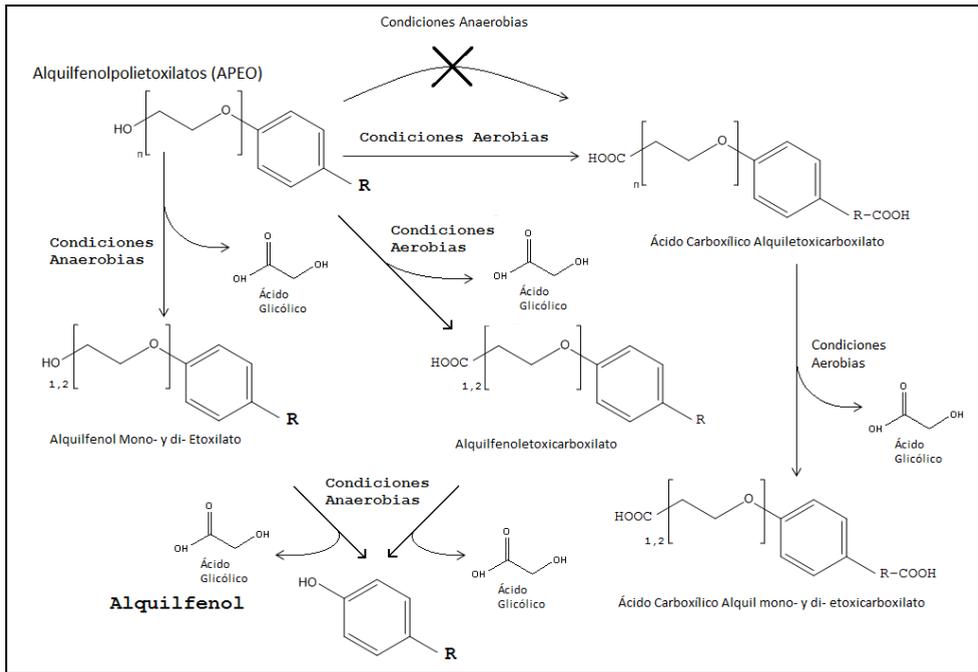


Figura 8. Proceso de degradación de los alquifenoles polietoxilatos en procesos anaerobios y aerobios (Adaptado de Corvini et al., 2006a y Lian y Liu, 2013).

Los alquifenoles (OP y t-NP) presentan una toxicidad mayor debido en parte a su mayor carácter lipófilo y, por lo tanto, a su mayor potencial de bioacumulación en los tejidos. Bajo condiciones anaerobias la degradación de los APEO aumentaría la concentración de alquifenoles en la fase soluble, que posteriormente podrían quedar retenidos en el fango producido (Giger et al., 1984; Ying et al., 2002; Clara et al., 2005b; McNamara et al., 2012). Sin embargo, bajo condiciones aerobias los APEO no producirían un incremento de la concentración de los alquifenoles, por lo que los tratamientos aerobios no parecen ser el causante de la presencia de nonilfenol (ramificado) en medios naturales (Jonkers et al., 2001; Lian y Liu, 2013).

Las referencias bibliográficas indican que el OP y el t-NP se pueden degradar bajo condiciones aerobias y anaerobias. Respecto al t-NP, Chang et al., (2007) observaron como un cultivo de fango anaerobio era capaz de degradar el t-NP. Los autores observaron cómo cultivos de bacterias sulfato-reductoras potenciaban la

degradación de este disruptor, mientras que cultivos de bacterias metanogénicas y nitrato-reductoras la inhibían. Respecto al OP, Liu et al., (2008) observaron que la toxicidad del OP interfería en la degradación de éste con fango tanto anaerobio como aerobio, por lo que registraron velocidades de degradación mayores a concentraciones bajas de OP. Estos autores observaron que la velocidad de degradación bajo condiciones aerobias era mayor a la determinada bajo condiciones anaerobias.

1.4.1.1. Octilfenol y 4-nonilfenol (ramificado)

La problemática de los alquilfenoles (OP y t-NP) empezó cuando fueron descritos como contaminantes persistentes en aguas residuales tratadas anaeróbicamente (Giger et al., 1984). El proceso de degradación anaerobio resumido en la Figura 8 fue confirmado con el trabajo de Janex-Habibi y colaboradores (2009), observándose un incremento de la concentración de alquilfenoles tanto en el fango anaerobio digerido como en la línea de aguas, lo que indica que ambientes anaerobios favorecen tanto la producción como la acumulación de alquilfenoles (Janex-Habibi et al., 2009).

La toxicidad presentada por el OP y el t-NP es debida a su actividad estrogénica, la cual se encuentra confirmada solo para los compuestos para- sustituidos (Jobling y Sumpter, 1993), y no para los compuestos orto- y meta- sustituidos. La mencionada actividad estrogénica se ve potenciada con el número de carbonos de la cadena alquílica. Dicha actividad se encuentra maximizada con una cadena de 9 carbonos, mientras la ausencia de dicha cadena (caso del fenol) o la protección del grupo alcohol (caso del anisol) produce una débil o nula actividad estrogénica (Tabira et al., 1999).

El t-NP presenta efectos adversos sobre el sistema endocrino de los organismos acuáticos en concentraciones superiores a 8,3 µg/L (Soto et al., 1995) además de ser bioacumulable en dichas especies (Hu et al., 2005; Bouzas et al., 2011).

En lo referente al OP, se ha observado que concentraciones superiores a 3 µg/L inducen la producción de la proteína vitelogenina e inhiben tanto el crecimiento testicular como la espermatogénesis por parte de la trucha macho arcoíris

(*Oncorhynchus mykiss*) (Jobling et al., 1996). Igualmente, se observó como la administración de OP a un grupo de ratas wistar (*Rattus norvegicus*) disminuyó la concentración de testosterona en sangre, el principal regulador de la espermatogénesis, lo que conduce a una disminución de la concentración de esperma (Othman et al., 2012).

Los nonilfenoles procedentes de la degradación de los NPEO son una mezcla de un elevado número de isómeros. Mediante un sistema jerárquico y lógico, y basándose en las normas de caracterización de alquilfenoles de la IUPAC, algunos autores han catalogado 211 isómeros de t-NP (Guenther et al., 2006). Muchos de los citados isómeros poseen algún carbono quiral, por lo que el número de isómeros posible aumenta hasta 550 (Guenther et al., 2006). Otros autores consiguieron, experimentalmente, identificar y caracterizar 23 de los citados isómeros (Wheeler et al., 1997; Thiele et al., 2004). Tanto t-NP como OP son compuestos resistentes a la degradación ya que el 85 % de los isómeros del t-NP y el OP (el cual se compone de un solo isómero) presentan un carbono alfa cuaternario en la cadena alquílica (Wheeler et al., 1997; Corvini et al., 2006a; Toyama et al., 2010) (ver Figura 9). Esto también hace que estas estructuras sean resistentes a la oxidación ω y β (van Ginkel, 1996; Cirja et al., 2006; Corvini et al., 2006a). Dicha propiedad es considerada la principal razón que explica la diferencia de biodegradabilidad entre el nonilfenol ramificado, t-NP (Número CAS 84852-15-3) y el lineal, 4-NP (Número CAS 104-40-5), que presenta un carbono alfa secundario.

La eliminación de OP y t-NP en una EDAR puede producirse mediante dos procesos: adsorción y biodegradación. Muchos estudios centran sus esfuerzos en la eliminación de estos fenoles en procesos convencionales de fangos activados y procesos de membrana (Clara et al., 2005a; Nakada et al., 2006), pero desafortunadamente, la mayoría de estos estudios fueron llevados a cabo a escalas y parámetros operacionales distintos, por lo que la comparación entre ellos resulta difícil (González et al., 2007; Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Liu et al., 2012).

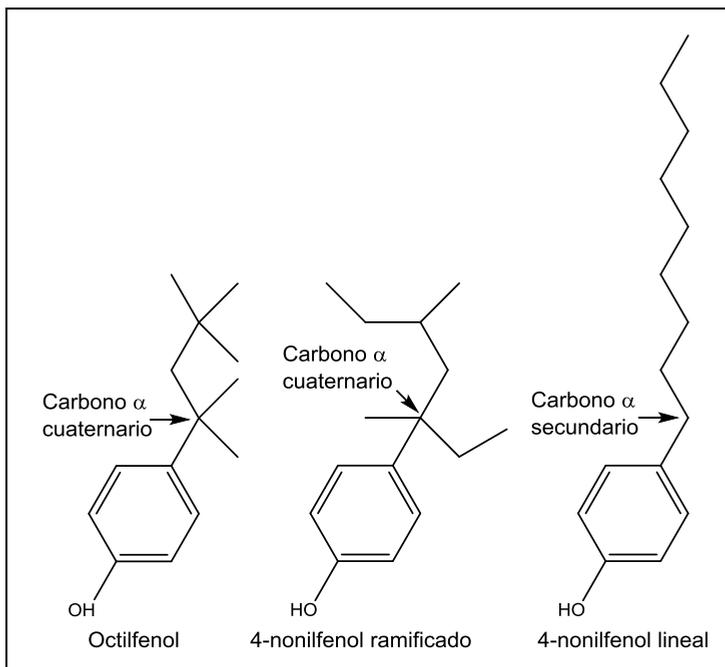


Figura 9. Ejemplos de carbonos cuaternarios (octilfenol y ejemplo de 4-nonilfenol ramificado) y secundarios en posición alfa (4-n-nonilfenol lineal).

El mecanismo de adsorción sobre el fango del proceso se ve favorecido bajo condiciones anaerobias. Bajo dichas condiciones, el proceso de degradación de los alquilfenoles polietoxilatos a alquilfenoles se ve potenciado, produciendo un aumento de su concentración en la fase soluble (Janex-Habibi et al., 2009). El aumento del gradiente de concentración entre ambas fases produce un desplazamiento del equilibrio hacia el proceso de adsorción sobre el fango anaerobio, mientras que en fango aerobio dicho gradiente es menor y el equilibrio de adsorción no favorece la retención sobre la fase suspendida (Tan et al., 2008). Por lo tanto, se observan concentraciones mayores, de dichos disruptores, en los fangos con tratamiento anaerobio que en fangos con tratamiento aerobio o anóxico.

Por otra parte, varios autores estudiaron la degradación de t-NP bajo la acción metabólica de ciertas especies de algas. En alguno de estos estudios se observó el potencial de biodegradación de la *cyanobacteria Microcystis aeruginosa*. Dicha *cyanobacteria* fue capaz de metabolizar este disruptor endocrino, aumentado, de

esta manera, su rendimiento de eliminación en el medio (Stoichev et al., 2010). Otros trabajos estudiaron el potencial de degradación de la microalga *Isochrysis galbana* sobre el t-NP, la cual fue capaz de bioconcentrar el t-NP hasta 6900 veces. Asimismo, el crustáceo *Artemia franciscana*, alimentado con la microalga *Isochrysis galbana*, creció un 25 % más en presencia de t-NP. Además, dicho crustáceo fue capaz de metabolizar el t-NP, reduciendo el riesgo de contaminación en niveles tróficos superiores (Correa-Reyes et al., 2007).

1.4.1.2. Productos de degradación de OP y t-NP

La identificación de los productos formados tras la degradación, tanto aerobia como anaerobia, de los alquilfenoles (OP y t-NP) es un campo poco estudiado. Los autores Mazellier y Leverd (2003) realizaron estudios sobre los productos de la degradación del OP, y emplearon para su degradación la combinación de los radicales hidroxilo generados en la fotólisis del peróxido de hidrógeno y la aireación forzada. Para su estudio irradiaron una disolución de OP aireada (concentración 20 μM), observando la desaparición del OP y la formación de 4-tert-octilcatecol (OC) como fotoproducto de degradación, así como un compuesto dimérico no determinado. Las cinéticas de desaparición del OP y de aparición del fotoproducto 4-tert-octilcatecol se observan en la Figura 10.

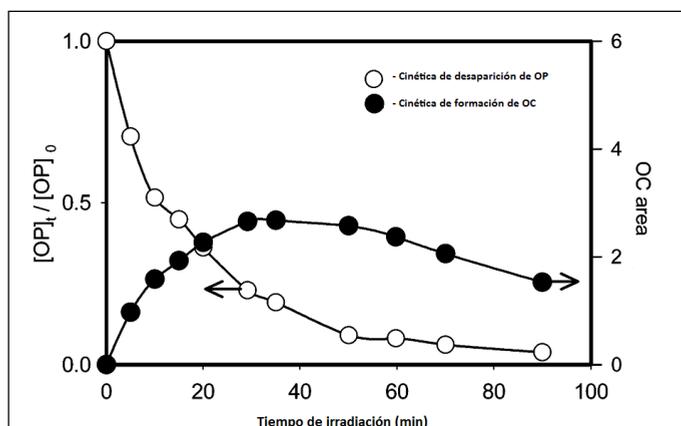


Figura 10. Cinética de desaparición del OP (20 μM) y de formación de 4-tert-octilcatecol bajo condiciones de irradiación (Mazellier y Leverd, 2003).

Los estudios de degradación realizados por estos autores fueron analizados mediante GC/MS.

Respecto a los nonilfenoles, algunos autores (Corvini et al., 2006b) han observado que el paso previo a la degradación de estos compuestos ocurre en el carbono de la posición 4 del anillo aromático. Emplearon para su estudio de degradación una cepa de *Sphingomonas* bajo condiciones aerobias y se observó como el mecanismo propuesto ocurría en un primer paso con una sustitución en posición ipso. De esta forma mediante una reacción hidrolítica se produce la escisión de la cadena alquílica del anillo aromático, formándose un carbocatión e hidroquinona como intermedios de reacción. El carbocatión obtenido puede experimentar tres tipos de reacciones, tal y como se muestra en la Figura 11. Los productos finales son: la formación de un alcoxifenol, hidroquinona como producto final junto con el correspondiente nonanol y la formación del 2-alkilbencendiol.

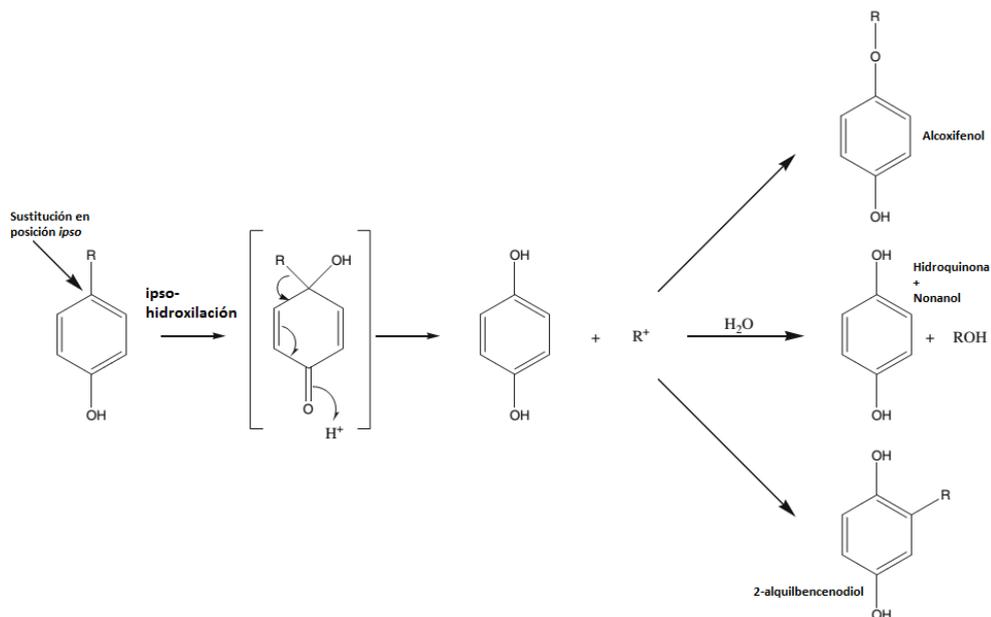


Figura 11. Mecanismos de degradación de los diferentes isómeros de los nonilfenoles ramificados propuesto por Corvini et al., 2006b.

1.4.2. 4-n-nonilfenol (lineal)

A pesar de ser un alquilfenol, tanto el origen como el comportamiento del 4-n-nonilfenol (4-NP) son diferentes de los alquilfenoles anteriormente citados (OP y t-NP). El 4-NP no forma parte del proceso de fabricación de los NPEO, por lo que la degradación de dicho grupo de compuestos etoxilatos no produce un incremento de la concentración de 4-NP en muestras medioambientales (Tanghe et al., 1999; Corvini et al., 2006a; de Weert et al., 2010). La Comisión Europea indica que el uso del 4-NP se limita a estudios de laboratorio, lo que explica su escasa aparición en entornos naturales (EC, 2002).

Debido a que la cadena alquímica del 4-NP es lineal, el carbono en α , el cual es un carbono secundario, se encuentra más desprotegido ante una reacción de adición electrofílica o sustitución nucleofílica, por lo que el potencial de degradación del 4-NP es mayor que el del t-NP (Gabriel et al., 2005; Corvini et al., 2006a). A pesar de la mayor degradabilidad del 4-NP, algunos estudios demostraron que ciertos microorganismos metabolizan con mayor eficacia los isómeros ramificados frente al lineal. De esta forma, un estudio observó que la degradación tanto del t-NP como del 4-NP se ven aceleradas mediante el empleo de una cepa fúngica (UHH 1-6-18-4), aislada de un río contaminado con nonilfenol (río Saale, próximo al núcleo urbano de Lettin, situado al norte de la ciudad de Halle (Saale, Alemania central)) y de una cepa de hyphomycetes *Clavariopsis aquatica*, una especie de hongo hallada frecuentemente en ríos y arroyos (Junghanns et al., 2005). También se observó que la cepa de bacterias *Sphingomonas xenophaga* fue incapaz de metabolizar compuestos fenólicos con un carbono α no cuaternario (4-NP e isómeros de t-NP con carbono α terciario o secundario). Sin embargo, se observó que sí fueron capaces de co-metabolizarlos empleando como sustrato compuestos fenólicos con carbono α cuaternario (Gabriel et al., 2005).

1.4.3. Bisfenol-A

El bisfenol-A (BPA) es un compuesto muy usado en multitud de industrias, tales como: plásticos para el envasado de alimentos y bebidas, retardantes de llama, adhesivos, materiales de construcción, componentes electrónicos, y recubrimientos de papel. El BPA presenta una débil actividad estrogénica, la cual es

aproximadamente 10^4 veces inferior a la producida por el estradiol (Ashby, 2001; Witorsch 2002). Sin embargo, la toxicidad del BPA se relaciona con el incremento de los casos de cáncer, localizados en testículos, próstata y glándulas mamarias (Keri et al., 2007). Los estudios llevados a cabo del efecto del BPA sobre invertebrados muestran un desarrollo tardío de la fase larvaria (Flint et al., 2012). En organismos acuáticos, el BPA afecta tanto al crecimiento como a la reproducción de los mismos, inhibiendo completamente la ovulación o reduciendo la calidad del esperma entre otros efectos. También se han observado efectos adversos en aves ante la exposición a BPA, tales como un incremento de la mortalidad o la feminización de embriones masculinos (Flint et al., 2012).

Respecto al uso del BPA, éste ha sido restringido en el mercado de productos de puericultura, teniendo en cuenta que actualmente existen dudas acerca de la nocividad de la exposición de los lactantes al BPA a través de biberones de policarbonato. La Comisión, a través de la Directiva 2011/8/UE, ha adoptado medidas preventivas en cuanto al uso de dicha sustancia en este tipo de productos con arreglo al principio de cautela. La Comisión ha puesto en marcha una medida voluntaria de sustitución, por lo que todos los biberones para lactantes del mercado de la Unión Europea que contengan BPA deberían haber sido sustituidos.

Varios autores confirman que el BPA presenta una escasa biodegradabilidad bajo condiciones anaerobias tanto en la fracción soluble como suspendida (Ike et al., 2006), mientras que la citada biodegradabilidad aumenta bajo condiciones aerobias (Ronen y Abeliovich, 2000; Kang y Kondo, 2002). Otros autores han estudiado la degradación del BPA en una corriente de fango empleando únicamente sistemas de pretratamiento tales como: hidrólisis alcalina, hidrólisis térmica, hidrólisis térmica alcalina, oxidación térmica y oxidación térmica alcalina. Los resultados observados fueron que la degradación del BPA fue superior en un pretratamiento basado en oxidación térmica alcalina, debido principalmente a la contribución aportada por el radical $\cdot\text{OH}$ en la oxidación del BPA (Mohapatra et al., 2010). Otros estudios, tanto aerobios como anaerobios, realizados sobre una corriente de fango, concluyeron que el BPA es degradado aeróbicamente sin necesidad de periodo de aclimatación, no observándose dicha degradación bajo condiciones anaerobias (Ying y Kookana 2005). Estudios aerobios realizados a escala de laboratorio produjeron rendimientos de eliminación comprendidos entre

el 90 y el 94 % para tiempos de retención hidráulicos de 10 h y tiempos de retención celular comprendidos entre 3 y 20 d (Stasinakis et al., 2010).

1.4.4. Pentaclorofenol

Los clorofenoles son compuestos tóxicos, debido a que son sustancias poco biodegradables, lipofílicas y carcinogénicas (Gold et al., 1984). Dentro de este grupo, el pentaclorofenol (PCP) es considerado como el clorofenol más tóxico además de un disruptor endocrino (Gerhard et al., 1998; Beard y Rawlings 1999; Olivier et al., 2003). Sin embargo, el PCP presenta importantes rendimientos de eliminación bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias (Bhattacharya et al., 1995; Shen et al., 2005).

A pesar de que el PCP ha sido ampliamente utilizado como fungicida en la conservación de la madera, su uso fue restringido por la Unión Europea mediante la publicación de la Directiva del Consejo 91/173/CEE (DC 1991). Al igual que los nonilfenoles polietoxilatos, el PCP se encuentra sujeto a:

- Reglamento 552/2009, en el anexo XVII se establece que no se podrá comercializar ni usar pentaclorofenol como sustancia o en mezclas con una concentración igual o superior al 0,1 % en peso.
- Reglamento 689/2008, en su anexo I se establece que el pentaclorofenol se encuentra sujeto al procedimiento de consentimiento fundamentado previo.

Respecto a la degradación del PCP, el co-metabolismo microbológico se considera una excelente vía para la degradación del PCP. Huang et al., (2011) emplearon un proceso de co-metabolismo para la degradación de PCP, usando como co-sustancias metabolizables glucosa y acetato. Estos autores compararon los rendimientos de eliminación obtenidos con un proceso de co-metabolismo con los obtenidos en un proceso anaerobio convencional, observándose mayores rendimientos de eliminación con el proceso co-metabólico. Otros autores obtuvieron una degradación completa del PCP bajo la combinación de condiciones anaerobias-aerobias creadas en la celda (Huang et al., 2012).

1.4.5. Estrona, 17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol

La estrona (E1) y el 17 β -estradiol (E2) son hormonas sexuales femeninas de origen natural, mientras que el 17 α -etinilestradiol (EE2) es una hormona estrogénica sintética y el principal componente de la píldora anticonceptiva. E1 y E2 se derivan de las excreciones de humanos y del ganado (Lintelmann et al., 2003). Tanto las hormonas naturales (E1 y E2) como la sintética (EE2) tienen un comportamiento descrito como disruptor endocrino, pudiendo ocasionar reducción de la fertilidad en algunos organismos acuáticos (Nagpal y Meays, 2009). Dichas hormonas presentan un coeficiente de partición octanol-agua elevado ($\log K_{ow} = 3,6 - 4,0$), por lo que dichas sustancias presentan tendencia a quedarse retenidas en la materia orgánica (ver Tabla 43 en el Anexo III). A pesar de que se degradan bajo condiciones aerobias, éstas parecen mantenerse inalteradas bajo condiciones anaerobias (Lai et al. 2002a; Lai et al. 2002b)

Las hormonas naturales, E1 y E2, son fáciles de degradar, mientras que el EE2, debido a su origen artificial, es más resistente a la biodegradación. Varios estudios obtuvieron rendimientos de eliminación superiores al 80 % para E1 y E2. El EE2 se pudo eliminar de la fracción soluble mediante mecanismos de adsorción con un tratamiento primario. Este comportamiento se debe a la naturaleza hidrofóbica del EE2 (Nakada et al., 2006; Zhou et al., 2010).

Por otro lado, otros autores llevaron a cabo estudios con diferentes tipos de fango, llegando a la conclusión de que fangos primarios digeridos tanto en condiciones mesofílicas (37 °C, y un TRC de 30 d) como termofílicas (55 °C, y un TRC de 20 d) producían una eliminación mayor de hormonas estrogénicas que un fango mixto digerido bajo las mismas condiciones (fango procedente de tratamiento primario y secundario mezclados en proporción de 60 % (v/v) de primario y 40 % (v/v) de secundario). La eliminación de dichas hormonas en fango primario digerido fue superior al 50 %, bajo condiciones mesofílicas y termofílicas, mientras que dicha eliminación en un fango mixto estuvo comprendida entre el 12 y el 39 % (Paterakis et al., 2012).

1.5. Métodos de análisis de CDE

1.5.1. Tratamiento de muestras y extracción de analitos

Los contaminantes orgánicos suelen estar presentes en el agua a niveles de traza, por lo que la aplicación de una técnica instrumental directa no es capaz de cuantificarlos, siendo necesaria una etapa previa de preconcentración. La preconcentración de la muestra mejora tanto la sensibilidad como la selectividad, debido a que al mismo tiempo que se aumenta la concentración, se eliminan interferentes. En la actualidad, para el análisis de muestras medioambientales se emplean diferentes técnicas de preconcentración. Las más empleadas son la extracción líquido-líquido (Gallignani et al., 2005) y, especialmente, la extracción en fase sólida (SPE) (Rodil et al., 2009) debido al menor consumo de disolventes orgánicos, menores tiempos de extracción y menor manipulación de la muestra.

Tanto la miniaturización como la automatización son dos de los objetivos actuales de la química analítica. De esta forma se reduce tanto el consumo de disolventes como los errores del operador. Las técnicas más extendidas que han experimentado dicha miniaturización son: la microextracción líquido-líquido (Wu et al., 2005), la extracción en fase sólida en línea (Khan et al., 2012), la extracción por sorción sobre barras magnéticas agitadoras (Prieto et al., 2010), la microextracción en fase sólida (SPME) (Wang et al., 2011) o la microextracción en fase sólida en espaciado de cabeza (HS-SPME) (Zhang et al., 2010). El uso de técnicas miniaturizadas permite el empleo de una reducida cantidad de muestra, así como un reducido volumen de disolventes en la etapa de extracción, lo que implica una mayor capacidad de procesamiento de muestras y un menor coste del análisis. Algunas de estas técnicas pueden ser acopladas con el instrumento de medida, reduciendo así el riesgo de contaminación y aumentando la sensibilidad (Schurek et al., 2008).

1.5.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es una técnica de preparación de muestras, la cual se puede utilizar para extraer compuestos de una matriz, o para limpiar extractos orgánicos eliminando las interferencias que hayan sido co-extraídas previamente. Como técnica de extracción, es un proceso mediante el cual

cantidades traza de un analito son selectivamente retenidas, separadas y concentradas a partir de volúmenes relativamente grandes de muestras líquidas, gaseosas o extractos de muestras sólidas. Una novedad importante, que presenta la DMFS es que logra el aislamiento de compuestos mediante la disrupción de matrices sólidas. En este proceso la matriz y el dispersante se mezclan con ayuda de un mortero hasta lograr una dispersión homogénea de la matriz, resultando un procedimiento experimental muy sencillo en comparación con las técnicas clásicas.

La DMFS es una técnica de preconcentración muy usada debido al reducido consumo de disolventes, el menor tiempo de extracción y la pequeña manipulación de la muestra respecto a otras técnicas. El principio en el que se basa la DMFS es la diferencia de afinidad de los analitos entre el sorbente y la muestra. Existen en el mercado cinco tipos de sorbente, estando cada uno indicado para un tipo de analito. Tres de ellos llevan mucho tiempo comercializándose y son: sorbentes de sílice enlazada (Parrilla y Martínez Vidal, 1997), sorbentes de carbón (Steen et al., 1999) y sorbentes poliméricos (Lesniewska et al., 2012); mientras que los dos restantes han sido desarrollados más recientemente y son conocidos como inmunosorbentes (Lasakova y Jandera, 2009). Los sorbentes poliméricos pueden ser sintetizados mediante lo que se conoce como huella molecular, lo que hace que la selectividad del proceso de sorción sea más elevada (Ambrosini et al., 2012).

Una vez los analitos han sido retenidos en el sorbente, éstos se eluyen mediante un volumen reducido del solvente orgánico adecuado cuando la DMFS se realiza sin estar acoplada a una técnica cromatográfica, bien sea gaseosa o líquida (Porazzi et al., 2005; Conka et al., 2005). Por contra, si la técnica DMFS se encuentra acoplada a una técnica cromatográfica, los analitos son eluidos mediante la fase móvil propia de dicha técnica (Ma et al., 2010; Miller et al., 2010).

1.5.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

A pesar de que la extracción en fase sólida es una técnica que presenta muchas ventajas, se tiende en el campo del análisis medioambiental hacia técnicas que reduzcan la manipulación de la muestra, así como a eliminar el uso de disolventes orgánicos. Partiendo de la extracción en fase sólida, el grupo de investigación encabezado por J. Pawliszyn desarrolló la microextracción en fase sólida (SPME), la

cual elimina algunos inconvenientes de la extracción en fase sólida, dado que la eliminación de los solventes de elución es completa, los blancos mejoran notablemente y la extracción se reduce a unos pocos minutos e incluso segundos (Arthur y Pawliszyn, 1990).

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante el empleo de fibras. Dichas fibras se encuentran recubiertas de un material polimérico sobre el que se producen los procesos de sorción. La posterior desorción se realiza térmicamente o mediante un disolvente orgánico. Las fibras disponen de un diámetro pequeño, por lo que pueden ser introducidas dentro de una jeringa, facilitando su manipulación al mismo tiempo que se protege la fibra. Dichas fibras pueden acoplarse a cromatografía líquida o de gases. En la Figura 12 se muestra un esquema de un dispositivo convencional de SPME.

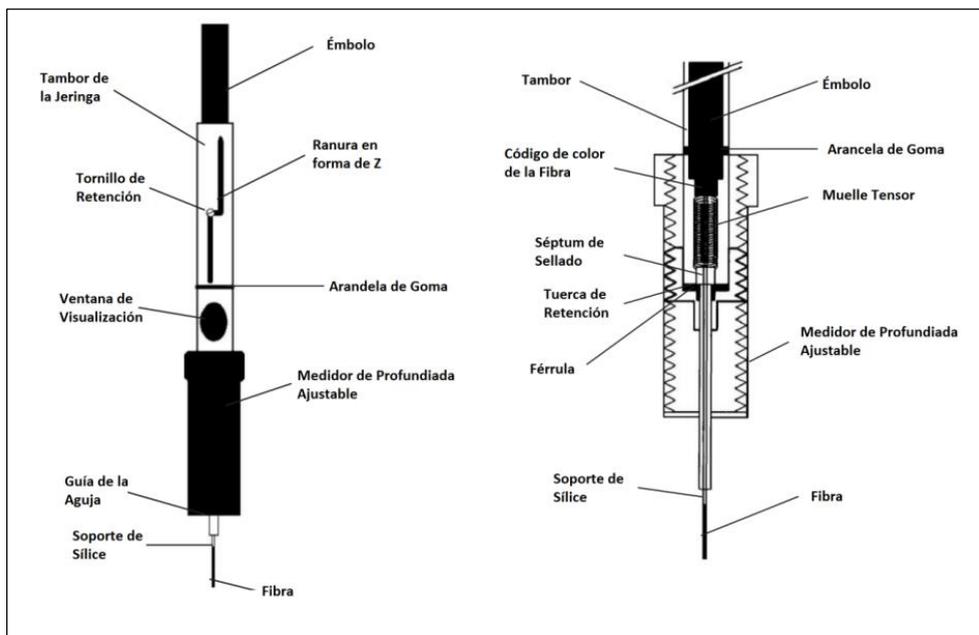


Figura 12. Esquema de un soporte comercial de SPME (Adaptado de Mester y Sturgeon, 2005).

Esta técnica cubre una gran cantidad de analitos con solo tres tipos de fibras para muestras líquidas (Wu et al., 2005; Tan et al., 2008), sólidas (Wang et al., 2011) y gaseosas (Koziel et al., 2001; Koziel y Novak, 2002). Los inconvenientes que presenta el empleo de SPME son que la fibra puede ser dañada durante el proceso

de agitación si existe un elevado porcentaje de materia suspendida en la muestra, y que en presencia de moléculas con un elevado peso molecular éstas pueden quedarse adheridas irreversiblemente a la fibra. Ambas situaciones ocasionan que tanto la reproducibilidad como la linealidad sean pobres (Alpendurada, 2000).

Existen dos mecanismos de extracción en función del sorbente empleado. El grupo formado por polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) y el resto de sorbentes, entre los que se incluyen polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), Carbowax-DVB, Carbowax-TR (plantilla con resina de divinilbenceno con tamaños de poro uniformes) y Carboxen, los cuales son mezclas de varias capas en las que la fase primaria de extracción es un sólido poroso. En el primer grupo los analitos son extraídos mediante un proceso de absorción, mientras que en el segundo grupo la extracción se produce mediante un proceso de adsorción. Independientemente de la naturaleza del sorbente, las moléculas de analito son inicialmente adheridas a la superficie de la fibra.

El hecho de que las citadas moléculas migren hacia el interior de la fibra o permanezcan adheridas a la superficie de esta depende del coeficiente de difusión del analito en la fibra. Los coeficientes de difusión de moléculas orgánicas en PDMS están próximos a los de los disolventes orgánicos, por lo que la difusión en PDMS es relativamente rápida y los analitos son extraídos vía absorción. Los coeficientes de difusión en la fibra de PA son inferiores en aproximadamente un orden de magnitud, pero todavía lo suficientemente grandes como para que la absorción sea el mecanismo de extracción primaria. Por contra, los coeficientes de difusión de la mayoría de las moléculas orgánicas en PDMS-DVB, Carbowax-DVB, Carbowax-TR y Carboxen son tan pequeños que dentro del marco de tiempo de análisis SPME, esencialmente todas las moléculas permanecen en la superficie de un recubrimiento. En caso de que las fibras permanecieran durante un tiempo muy elevado en contacto con los analitos orgánicos (días o semanas), estos analitos podrían difundirse en el recubrimiento de las fibras. Esta situación podría manifestarse en el análisis en un persistente efecto memoria difícil de eliminar incluso después de varios procesos de desorción. En la práctica, el mecanismo de adsorción es el que se produce para este tipo de fibras (Gorecki et al., 1999; Huck y Bonn G.K. 2000).

La Figura 13 muestra los estados inicial y de equilibrio del proceso de extracción para recubrimientos de absorción y de adsorción de tipo SPME.

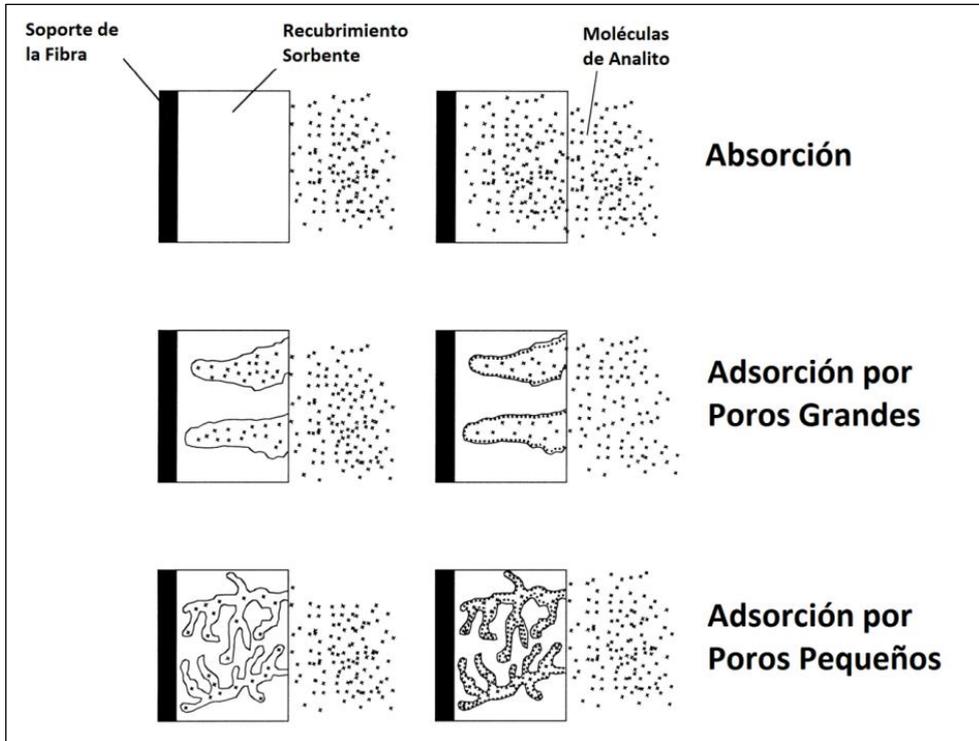


Figura 13. Comparación de los mecanismos de absorción y adsorción (Adaptado de Gorecki et al., 1999).

Algunas de las fases se comercializan con diferentes espesores lo que afecta tanto a la sensibilidad del método como al tiempo de equilibrio. Aunque una fibra gruesa requiere más tiempo de extracción, la sensibilidad obtenida es mayor.

1.5.3.1. Fundamentos teóricos de la SPME

El principio en el que se basa la SPME es la diferencia de afinidad entre la matriz de la muestra y la fibra por parte del analito (Louch et al., 1992; Pawliszyn et al., 1997b). La extracción se considera completa cuando se ha alcanzado el equilibrio entre ambas fases. La fibra que contiene los analitos adsorbidos es entonces

retirada de la matriz de la muestra y transferida al inyector del cromatógrafo para su desorción. El trabajo de Louch et al., (1992) confirma que existe una relación lineal entre la cantidad de analito adsorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra.

La Ecuación 1 describe el proceso en la etapa de equilibrio para fibras cuyo mecanismo de extracción sea por absorción.

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_0}{K_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

- n: cantidad de analito extraída por la fibra (μg)
- K_{fs} : coeficiente de distribución entre la fibra y la matriz de la muestra (adimensional)
- V_f : volumen de la fibra (mL)
- V_s : volumen de la muestra (mL)
- C_0 : la concentración inicial del analito en la muestra ($\mu\text{g/mL}$)

La Ecuación 1 indica la proporción entre la concentración de analito en la muestra (C_0) y la cantidad extraída por la fibra (n). En la mayoría de los casos el volumen de la muestra (V_s) es muy superior en comparación con el volumen de la fibra (V_f). En estos casos, la cantidad de analito extraída por la fibra es despreciable frente a la cantidad existente en la muestra, por lo que $K_{fs} \cdot V_f \ll V_s$ y la Ecuación 1 se simplifica en la Ecuación 2.

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

En la Ecuación 2 se observa que la cantidad de analito extraída es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de la muestra. De esta forma, la muestra puede ser expuesta

directamente al entorno o línea de producción correspondiente, siendo la cantidad de analito extraída directamente proporcional a la concentración en la matriz. Dicha aproximación no puede aplicarse en el caso en que los analitos presenten una afinidad muy elevada por la fibra (elevados K_{fs}) y el volumen de muestra sea reducido, debiendo aplicarse en estos casos la Ecuación 1.

El modelo matemático para las fibras que emplean el mecanismo de adsorción queda explicado mediante la Ecuación 3.

$$n = \frac{\Psi \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_o \cdot (C_{f \max} - C_f)}{V_s + \Psi \cdot V_f \cdot (C_{f \max} - C_f)} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde:

- Ψ : constante de equilibrio del analito libre en la muestra y el retenido sobre la fibra (L/ μ g)
- C_f : concentración final del analito en la superficie de la fibra (μ g/L)
- $C_{f \max}$: concentración máxima de analito en la superficie de la fibra (μ g/L)

La adsorción es un proceso en el que existe una competencia de los analitos por los centros activos de adsorción, siendo estos limitados, por lo que la relación lineal existente entre la concentración de analito en la muestra y la cantidad extraída por la fibra es lineal para un reducido intervalo de concentraciones. En el trabajo realizado por Gorecki et al., (1999) se desarrolló un modelo matemático de adsorción para las fibras de PDMS-DVB, Carbowax-DVB y Carbowax-TR. Existe una dependencia entre la concentración de equilibrio de un compuesto asociado a un determinado sorbente y su concentración en la matriz de la muestra, la cual es referida como isoterma de adsorción, siendo la isoterma de Langmuir la que mejor permite describir dicho proceso. En el modelo de Langmuir la superficie tiene un número limitado de centros activos de adsorción que pueden ser ocupados por el sorbato. El modelo aplica 4 supuestos: 1) la molécula se adsorbe en un estado inmóvil; 2) todos los centros activos son equivalentes; 3) cada centro activo únicamente puede adsorber una molécula; 4) no existen interacciones entre las moléculas adsorbidas y los centros activos adyacentes.

En la Figura 14 se observa la dependencia entre la cantidad de analito extraída por la fibra y la concentración inicial de analito en la muestra, para tres constantes de equilibrio distintas. Como se puede observar, a bajas concentraciones de analito la dependencia se aproxima a una línea recta. A concentraciones intermedias deja de observarse dicha respuesta lineal. Finalmente, a concentraciones superiores se observa la saturación de la respuesta, debido a que todos los centros activos se encuentran ocupados por moléculas de analito.

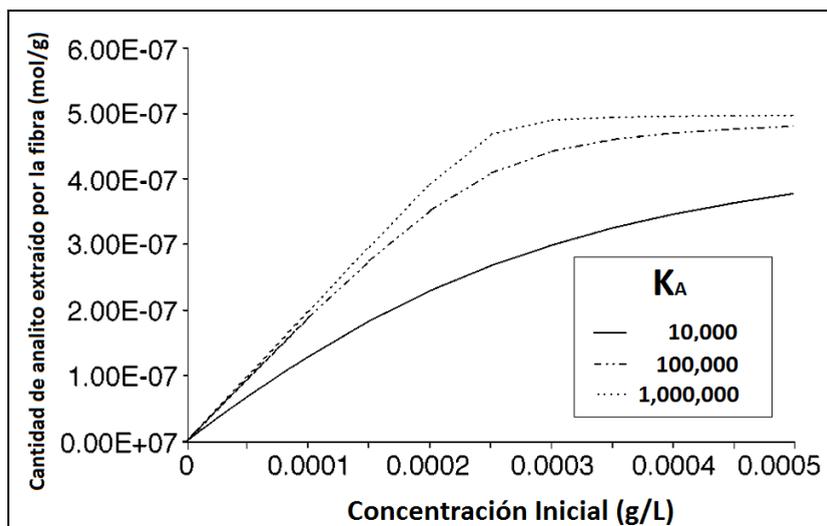


Figura 14. Cantidad de analito extraído por la fibra frente a la concentración inicial de analito en la muestra. Se muestran tres constantes de equilibrio diferentes. $C_{f\max} = 1,0 \text{ g/L}$, $V_f = 0,5 \mu\text{L}$, $V_s = 2 \text{ mL}$. (Adaptado de Gorecki et al., 1999).

La forma de las isothermas depende fuertemente del valor de la constante de equilibrio. Para constantes elevadas ($K_A = 10^6 \text{ L/g}$) la respuesta permanece prácticamente lineal hasta que la fibra llega a la etapa de saturación. Sin embargo, para constantes de equilibrio reducidas ($K_A = 10^4 \text{ L/g}$) se obtiene una respuesta cuasi-lineal, donde puede observarse la necesidad de concentraciones muy elevadas para alcanzar la etapa de saturación.

1.5.3.2. Procedimientos de SPME

Existen dos formas básicas para llevar a cabo una extracción por SPME: extracción por inmersión directa (Ma et al., 2010; Miller et al., 2010) o extracción del espacio de cabeza (HS-SPME) (Schurek et al., 2008; Zhang et al., 2010). Más recientemente se ha desarrollado la SPME con protección de membrana (Kloskowski et al., 2009; Spietelun et al., 2011). La SPME con protección de membrana es una técnica que consta de una membrana semipermeable que envuelve la fibra y evita que los compuestos superiores a un determinado peso molecular puedan quedarse retenidos en la fibra y dañarla. La técnica HS-SPME también permite proteger la fibra de posibles elementos de elevado peso molecular o interferencias no volátiles contenidas en la matriz de la muestra. Además permite valores extremos de pH o fuerza iónica sin dañar la fibra. Dicha técnica se encuentra restringida a compuestos volátiles o semivolátiles. La combinación SPME por inmersión directa con la cromatografía de gases es actualmente uno de los procedimientos de análisis más empleados (Niri et al., 2008; Johnson et al., 2012). En menor medida se utiliza la SPME combinada con cromatografía líquida de alta resolución (Wang et al., 2011; Khan et al., 2012).

La eficacia de la absorción/adsorción por SPME se puede mejorar mediante la optimización de las variables experimentales que afectan al proceso. Los parámetros son: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra y las características químicas de la muestra (Pawliszyn, 1997a).

1.5.3.3. Etapa de absorción/adsorción

Al desarrollar un método analítico basado en una extracción de SPME se debe determinar el tiempo de extracción necesario para alcanzar el estado de equilibrio, el cual es característico de cada pareja de analito-fibra, siendo el tiempo de equilibrio aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante (Pawliszyn, 1997a). Sin embargo para algunas parejas analito-fibra el tiempo de equilibrio es muy elevado, por lo que se trabaja en condiciones de no equilibrio, viéndose reducida la sensibilidad del método (Eisert y Levsen, 1996; Eisert y Pawliszyn, 1997a). En este último caso es importante llevar un control

estricto del tiempo, ya que pequeñas oscilaciones en dicho parámetro pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída, aumentando el error.

La temperatura de extracción es un parámetro que contribuye de dos formas distintas al proceso de extracción. Por un lado, el coeficiente de difusión aumenta con la temperatura, lo que produce que los analitos alcancen la fibra más fácilmente y la extracción sea más rápida. Por otro lado, debido a que el proceso de sorción sobre la fibra es exotérmico, el aumento de la temperatura produce que los analitos sean liberados a la matriz, afectando negativamente al proceso de extracción (Zhang y Pawliszyn, 1995).

La fuerza iónica también afecta al proceso de extracción, modificando la velocidad de transferencia de los analitos desde la muestra hacia la fibra. La presencia de sales en la muestra aumenta la fuerza iónica, lo que genera que el coeficiente de distribución de los analitos aumente, ya que los compuestos orgánicos con características apolares tendrán más tendencia a quedarse retenidos sobre la fibra apolar. La saturación con una sustancia salina puede emplearse para mejorar los límites de detección, así como para normalizar la señal de la muestra (Sarrion et al., 2002).

El efecto del pH depende de las características ácido-base del compuesto extraído. El pH de trabajo debe ser aquel que asegure que los analitos se encuentren en la forma neutra, siendo recomendable trabajar al menos dos unidades por debajo del pK_a de los analitos (Sarrion et al., 2002).

En parejas analito-fibra cuyo valor del coeficiente de distribución (K_{fs}) es grande, el volumen de muestra es un parámetro que afecta significativamente a la extracción. Estos valores pueden estimarse a partir de datos bibliográficos o calcularse mediante fórmulas matemáticas (Gorecki y Pawliszyn, 1997; Gorecki et al., 1998). Como se desprende de la Ecuación 1, en caso de que V_s (volumen de muestra) sea significativamente más grande que el producto $K_{fs} \cdot V_f$ (coeficiente de distribución y volumen de la fibra), la cantidad de analito es independiente del volumen de muestra elegido (Ecuación 2). Asumiendo un error del 5 %, el volumen de muestra se puede aproximar según la Ecuación 4 (Pawliszyn, 1997a):

$$V_s = 20 \cdot K_{fs} \cdot V_f$$

Ecuación 4

El empleo de volúmenes elevados de muestra no afectará a la sensibilidad del método (Pawliszyn J., 1997a).

1.5.3.4. Etapa de desorción

Los parámetros que afectan a la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizada: térmica o por solvente orgánico. La forma más común de llevar a cabo la desorción de los analitos es térmicamente en el inyector del cromatógrafo. Así, al aumentar la temperatura de la fibra la afinidad de los compuestos por la fibra se reduce, quedando en la atmósfera del inyector que posteriormente por la acción del gas portador se transfiere a la columna. En la Ecuación 5 se puede observar la dependencia del coeficiente de partición con la temperatura.

$$\log(K_{fs}) = a \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + b$$

Ecuación 5

donde:

- K_{fs} : coeficiente de partición (adimensional)
- a: constante característica (K)
- b: constante característica (adimensional)
- T: temperatura (K)

Los parámetros a optimizar en la desorción térmica son la temperatura y el tiempo de desorción. Respecto a la temperatura de desorción es aconsejable mantener la máxima permitida por la fibra, ya que según la Ecuación 5 a mayor temperatura menor afinidad por la fibra. Por otra parte, se debe elegir un tiempo de desorción lo suficientemente alto como para asegurar la total desorción de los analitos. Con un tiempo de desorción elevado se consigue una mayor sensibilidad

y una eliminación del efecto memoria, sin embargo se reduce el tiempo de vida útil de la fibra (Eisert y Pawliszyn, 1997).

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis consiste en estudiar y comprender los principios que rigen los procesos de degradación de los Compuestos Disruptores Endocrinos (CDE): octilfenol (OP), nonilfenol ramificado (t-NP), 4-n-nonilfenol (4-NP), pentaclorofenol (PCP), bisfenol-A (BPA), estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2) en diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales.

En el presente trabajo se comparan los rendimientos de eliminación de los disruptores endocrinos en procesos aerobios y anaerobios de depuración de agua residual. De esta forma se pretende establecer las configuraciones más eficientes para la eliminación de los citados disruptores endocrinos en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Para abordar el objetivo general de la tesis se han planteado una serie de subobjetivos:

- Desarrollar métodos analíticos adecuados para el análisis de los disruptores endocrinos tanto en la fracción soluble del agua residual como en la suspendida.
- Estudiar el proceso de degradación de los disruptores endocrinos en un reactor convencional de fangos activados.
- Estudiar el proceso de degradación de los disruptores endocrinos en un biorreactor aerobio de membrana sumergida.
- Estudiar el proceso de degradación de los disruptores endocrinos en un biorreactor anaerobio de membrana sumergida.
- Estudiar el proceso de degradación de los disruptores endocrinos combinando un biorreactor anaerobio de membrana sumergida con un proceso de fangos activados diseñado para la eliminación de nutrientes (configuración UCT).
- Estudiar el proceso de degradación de los disruptores endocrinos combinando un biorreactor anaerobio de membrana sumergida con un proceso de cultivo de microalgas a escala laboratorio. El desarrollo de este subobjetivo implica, a su vez:

- Estudiar el efecto de la combinación de la luz, oxígeno disuelto y microalgas sobre la degradación de los citados disruptores endocrinos, determinando los rendimientos de eliminación y la cinética de degradación de los procesos implicados.
- Analizar globalmente los resultados obtenidos para poder discernir cuáles son los procesos más eficientes desde el punto de vista de la degradación de los citados disruptores endocrinos.

Materiales y metodología

3. Materiales y metodología

3.1. Tipos de tratamientos estudiados

Los estudios de degradación se monitorizaron tanto en tratamientos secundarios como en postratamientos. Para ello se trabajó con los siguientes tratamientos secundarios: tratamiento convencional de fangos activados con zona anóxica y aerobia, planta piloto con un biorreactor aerobio de membrana sumergida y planta piloto con un biorreactor anaerobio de membrana sumergida. Los postratamientos se estudiaron tanto a escala de laboratorio, empleando para ello un reactor de 2 L, como a escala de planta piloto en un sistema de fangos activados (configuración UCT). El postratamiento UCT se encuentra acoplado a la salida del biorreactor anaerobio de membrana sumergida, tratando el afluente de la misma, mientras que el cultivo de microalgas trató este mismo afluente pero en régimen discontinuo.

Tanto el reactor industrial como las diferentes plantas piloto indicadas, estuvieron ubicadas en la EDAR de la Cuenca del Carraixet, situada en Alboraiá (Valencia). Esta depuradora recoge principalmente las aguas residuales domésticas de las poblaciones situadas a lo largo de la Cuenca del Carraixet incluyendo también aguas residuales de tipo industrial.

En las figuras mostradas en el Anexo II se puede observar la vista general de cada una de las plantas estudiadas.

3.1.1. Tratamiento convencional de fangos activados

La etapa correspondiente al tratamiento convencional de fangos activados corresponde al reactor biológico de la EDAR de la Cuenca del Carraixet que cuenta con una capacidad de tratamiento de 178.000 hab/eq. La EDAR de la Cuenca del Carraixet consiste principalmente en una decantación primaria, seguida de un reactor biológico formado por una etapa anóxica y una aerobia. La configuración descrita se encuentra capacitada para la eliminación de materia orgánica con eliminación de nitrógeno y una decantación secundaria. Como sistema terciario

dicha EDAR se encuentra equipada con un tratamiento físico-químico y con un sistema de desinfección por radiación ultravioleta. El reactor biológico presenta un volumen total de 4.192 m³, trabajando a una concentración de sólidos suspendidos comprendida entre 2 y 3 g/L. Durante el periodo objeto de estudio el tiempo de retención celular (TRC) medio del sistema biológico fue de 5±1 d y el tiempo de retención hidráulico (TRH) medio de 4±1 h. En la Figura 15 se puede observar un esquema de la EDAR descrita en el presente apartado.

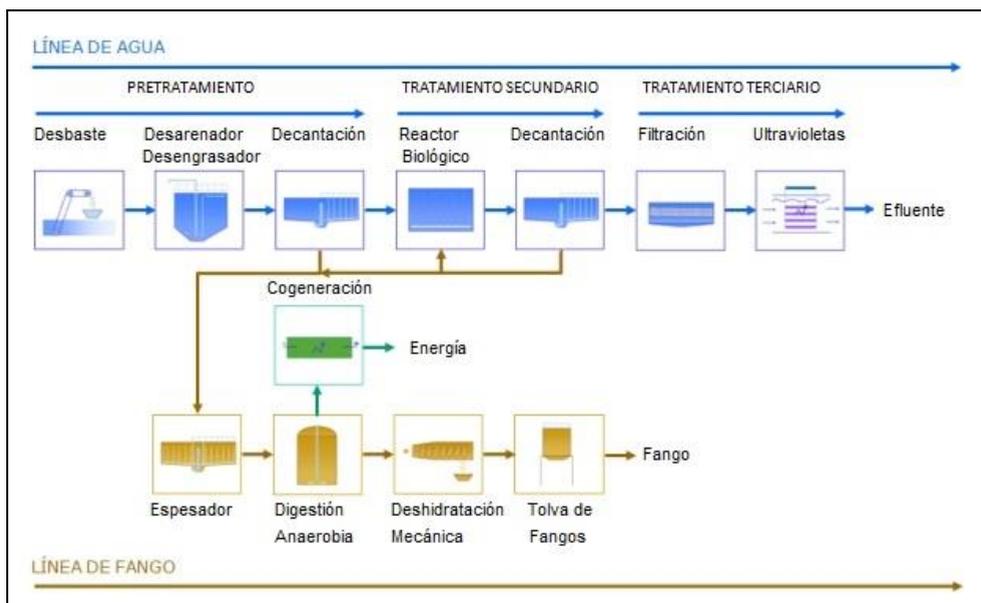


Figura 15. Esquema de la EDAR de la Cuenca del Carraixet situada en la comarca de L'Horta Nord, Alboraya. Imagen extraída de la página web de la Entitat de Sanejament d'Aigües (página web: <http://www.epsar.qva.es/sanejament/instalaciones/edar.aspx?id=8>).

El agua tratada por el Tratamiento Convencional de fangos activados (en adelante, TC) proviene del decantador primario de la estación depuradora de aguas residuales de la Cuenca del Carraixet. Las características del agua residual de entrada al TC durante el periodo de estudio fueron: 290 ± 30 mg DQO/L, 96 ± 13 mg DQO_{soluble}/L, 32 ± 4 mg N-NH₄⁺/L, 5 ± 2 mg P-PO₄³⁻/L, 112 ± 7 mg S-SO₄²⁻/L, 6 ± 3 mg DQO/L asociada a ácidos grasos volátiles (AGV) y 350 ± 30 mg CaCO₃/L de alcalinidad. El elevado valor de la desviación estándar indica que la elevada variabilidad en los parámetros del agua residual tratada.

3.1.2. Biorreactor anaerobio de membrana sumergida.

El biorreactor anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR) consiste en un rototamiz (0,5 mm tamaño de paso), un tanque de homogeneización con un volumen total de 300 L, un biorreactor anaerobio con un volumen total de 1300 L, 400 L de los cuales corresponden a espaciado de cabeza, y dos tanques de membranas (TM) de ultrafiltración de 800 L de volumen total por tanque, de los cuales 200 L por tanque corresponden a espaciado de cabeza. El reactor estuvo operando a una concentración de sólidos suspendidos comprendida entre 16 y 22 g/L). Cada uno de los tanques de membrana incluye un módulo de ultrafiltración de fibra hueca (PURON® Koch Membrane Systems (PUR-PSH31) de 0,05 μm de tamaño de poro. Cada módulo consiste en 9 haces de fibras huecas de 1,8 m de longitud, lo que da un total de 30 m^2 de superficie de membrana. El permeado obtenido se almacena en un tanque Clean-in-Place (CIP), el cual tiene una capacidad de almacenamiento de 200 L y se emplea para la etapa de contralavado del módulo de membranas. Durante el periodo estudiado, el TRC varió entre 100 y 25 d y el TRH entre 35 y 6 h. El valor máximo de la presión transmembrana registrado fue de 0,08 bar y el valor promedio del flujo transmembrana fue 11 $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para cada uno de los tanques. En la Figura 16 se muestra un esquema de la planta piloto SAnMBR-UCT.

El agua tratada por el SAnMBR se toma de la salida del proceso de desarenado de la EDAR de la Cuenca del Carraixet. La salida del sistema SAnMBR se envía a un postratamiento de configuración UCT, tal y como se muestra en la Figura 16.

Las características del agua residual de entrada a la planta piloto durante el periodo de tiempo estudiado fueron: 900 ± 400 mg DQO/L, 80 ± 30 mg DQO_{soluble}/L, 510 ± 70 mg DBO_{Total}/L, 57 ± 8 mg DBO_{soluble}/L, 34 ± 8 mg N-NH₄⁺/L, $4,2 \pm 1,0$ mg P-PO₄³⁻/L, 107 ± 13 mg S-SO₄²⁻/L, 9 ± 7 mg DQO/L asociada a AGV y 350 ± 30 mg CaCO₃/L de alcalinidad. Al igual que ocurre en el agua de entrada del TC, se observa una elevada variabilidad en los parámetros del agua residual tratada.

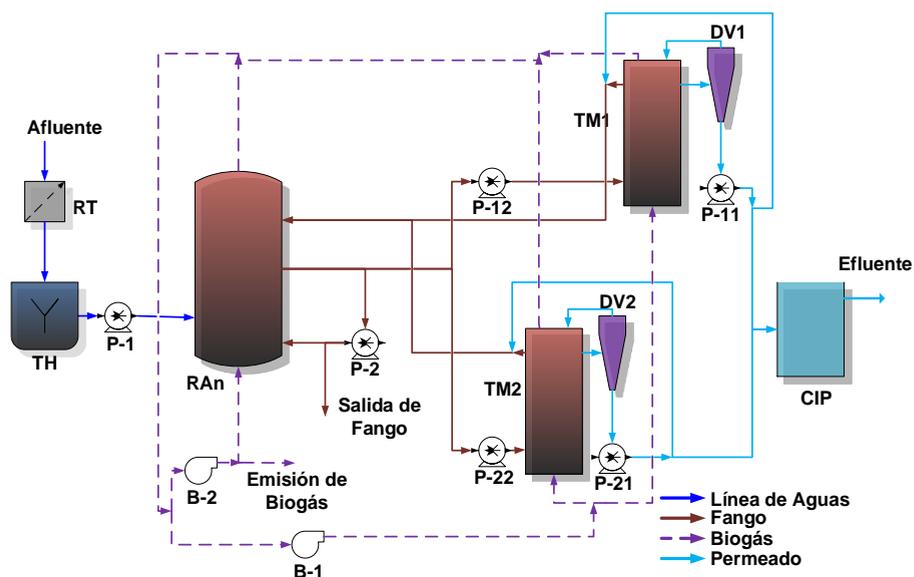


Figura 16. Diagrama de flujo de la planta piloto SAnMBR-UCT. Nomenclatura: RT: rototamiz; TH: tanque de homogeneización; RAn: reactor anaerobio; TM: tanques de membrana; RD: recipiente de desgasificación; CIP: clean-in-place; B: bomba; R: resistencia y S: soplante (Adaptado de Giménez et al., 2011).

3.1.3. Biorreactor aerobio de membrana sumergida.

El agua que alimenta al biorreactor aerobio de membranas sumergido (aMBR), corresponde al efluente de la decantación primaria de la EDAR de la Cuenca del Carraixet. La planta aMBR está compuesta por un reactor de 1 m³ de volumen de trabajo, el cual opera con una concentración de sólidos suspendidos comprendida entre 10 y 12 g/L. El reactor consta de un módulo de membrana de ultrafiltración de fibra hueca (Zenon, ZeeWeed® 500 module) con una superficie total de filtración de 46,5 m². Con el fin de minimizar el proceso de ensuciamiento, el módulo de membrana se encuentra constantemente aireado. Durante el periodo estudiado el TRC y TRH se mantuvieron en 100±5 d y 9±1 h respectivamente.

Las características promedio del agua residual de entrada al proceso aMBR durante el periodo de tiempo estudiado fueron: 310 ± 20 mg DQO/L,

135 ± 10 mg DQO_{soluble}/L, 30 ± 3 mg N-NH₄⁺/L, $4,2 \pm 1,3$ mg P-PO₄³⁻/L, 110 ± 10 mg S-SO₄²⁻/L, 12 ± 2 mg DQO/L asociada a AGV y 300 ± 40 mg CaCO₃/L de alcalinidad.

3.1.4. Planta piloto de fangos activados, esquema UCT.

El postratamiento UCT consiste en un reactor de 800 L de volumen total. El volumen de reacción se encuentra distribuido en tres etapas: 84 L en la etapa anaerobia, 332 L en la etapa anóxica y 384 L en la etapa aerobia. La etapa aerobia trabaja a una concentración de oxígeno disuelto (OD) entre 1 y 2 mg O₂/L. Las recirculaciones se realizaron desde la etapa aerobia hasta la anóxica, así como desde la anóxica hasta la anaerobia. Los parámetros de operación del sistema UCT fueron: relaciones entre el caudal de recirculación y el de entrada ($Q_{\text{Recirculación}}/Q_{\text{Entrada}}$) igual a 2 y TRC y TRH de 18 ± 2 d y 20 ± 9 h, respectivamente. Respecto a la concentración de sólidos suspendidos en el reactor, éstos se mantuvieron entre 1,0 y 1,2 g/L. La Figura 17 muestra un esquema del postratamiento UCT descrito.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el postratamiento de fangos activados UCT se encuentra acoplado al sistema secundario SAnMBR. De esta manera, el afluente tratado corresponde al permeado del sistema SAnMBR, el cual previamente se ha homogeneizado en el tanque CIP (ver Figura 16).

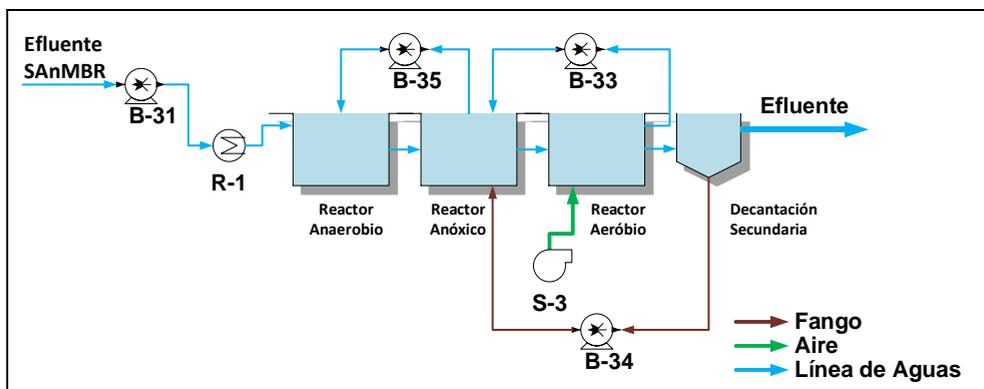


Figura 17. Diagrama de flujo de la planta piloto de fangos activados configuración UCT. Nomenclatura: B: bomba; R: Resistencia y S: soplante (Adaptado de Sánchez-Ramírez et al., 2015).

3.1.5. Microalgas.

Debido al creciente interés de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, se realizaron estudios a escala de laboratorio para comprender el efecto de las mismas sobre la degradación de los CDE estudiados.

Microalgas de la clase de las *chlorophyceae* y del filo de las *cyanobacteria* fueron identificadas como el principal grupo del inóculo estudiado.

En el momento de iniciar el estudio de la degradación de CDE mediante un cultivo de microalgas no se disponía de una planta piloto operativa, por lo que estos trabajos se realizaron a escala de laboratorio. La planta piloto de cultivo de microalgas (PPCM) estuvo operativa a partir del 31/05/2014. En el Anexo II se puede observar una vista general de la planta y en el apartado 7.3 se puede consultar un estudio preliminar de degradación de CDE en la PPCM. El proceso de depuración propuesto se planteó como un postratamiento complementario al proceso SAnMBR. El experimento intentó asemejarse lo máximo posible a una futura planta piloto que trabajase con un biorreactor inoculado con microalgas. Para ello, se trabajó con un reactor de 2 L al que se le inoculó un cultivo de microalgas, se alimentó con el efluente del proceso SAnMBR y finalmente se iluminó con luz artificial de tubos fluorescentes.

El estudio del proceso anterior se complementó con un estudio pormenorizado del efecto de cada uno de los parámetros implicados en el metabolismo de las microalgas, tales como la luz y el oxígeno disuelto. El objetivo de este segundo estudio con microalgas fue comprender cuál es el efecto de cada parámetro en el mecanismo de eliminación de microcontaminantes. Con el fin de estudiar el efecto de los citados parámetros (luz ("P"), oxígeno disuelto ("O") y microalgas ("M")), sobre la degradación de los CDE y las cinéticas de degradación, se llevaron a cabo varios experimentos a escala de laboratorio.

De esta forma se desarrolló un diseño factorial de experimentos para esclarecer la influencia de los citados parámetros sobre la degradación de los CDE (Box y Hunter, 1961). El diseño factorial completo 2^k requiere la combinación de todas los parámetros estudiados (f) a los niveles estudiados (n). El número total de experimentos llevados a cabo debería ser $8 (n^f)$, lo que corresponde a tres parámetros (luz, oxígeno disuelto y microalgas) a dos niveles por cada uno, nivel

alto (+) y nivel bajo (-). Los 8 experimentos resultantes, así como sus etiquetas, se muestran en la Tabla 2.

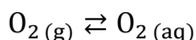
Tabla 2. Diseño factorial completo obtenidos para tres parámetros: luz ("P"), oxígeno disuelto ("O") y microalgas ("M").

Experimento número	Combinación	Código		
		O	P	M
1	POM	+	+	+
2	P	-	+	-
3	PO	+	+	-
4	O	+	-	-
5	PM	-	+	+
6	1	-	-	-
7	M	-	-	+
8	OM	+	-	+

De los 8 experimentos únicamente se llevaron a cabo del 1 al 6. Estos fueron las combinaciones: luz, oxígeno disuelto y microalgas ("POM"); luz y oxígeno disuelto ("PO"); luz ("P"); oxígeno disuelto ("O"); y luz y microalgas ("PM"). Los experimentos eliminados fueron las combinaciones microalgas ("M") y oxígeno disuelto y microalgas ("OM"). El criterio establecido para la eliminación de dichos experimentos se basa en la inhibición de la actividad metabólica de las microalgas en ausencia de luz. El experimento correspondiente con los tres parámetros a nivel bajo (Combinación 1) (experimento en el cual los tres parámetros adoptan el valor más reducido de los dos estudiados) fue etiquetado como degradación espontánea, el cual fue catalogado como experimento de control.

Los experimentos fueron ejecutados en discontinuo. Se empleó para ello un reactor de Pyrex® de 2,0 L de volumen total, siendo el volumen de trabajo de 1,6 L. Los reactores se ubicaron en una cámara termostatzada modelo Walk-in de la empresa Ineltec (Tona, Barcelona, España). La temperatura final de trabajo fue de 23,4±0,2 °C. La mezcla final de los reactores estuvo compuesta por 800 mL del permeado del tratamiento SAnMBR y 800 mL de cultivo crudo de microalgas para los experimentos "POM" y "PM" u 800 mL de agua pura para los experimentos "PO", "P" y "O".

El oxígeno, empleado en los experimentos con aireación forzada, se suministró mediante una conducción portadora de aire comprimido (3 bar de presión de trabajo) (Atlas Copco, ZT-37-FF, Stockholm, Suecia). Al final de la conducción se acopló un difusor para favorecer la formación de burbujas de reducido diámetro, aumentando así la eficacia de transferencia de materia y el desplazamiento del equilibrio de disolución hacia la formación de oxígeno disuelto.



En estos experimentos bajo condiciones de aireación forzada (“POM”, “PO” y “O”), la corriente de aire comprimido también se empleó para agitar el medio de reacción, mientras que para los experimentos sin aireación forzada (“P” y “PM”) la agitación se realizó mediante un agitador magnético a baja velocidad (100 rpm) para evitar la aireación superficial o pérdida de oxígeno disuelto por stripping. Con el fin de eliminar la presencia de oxígeno en el reactor del experimento “P”, se burbujeó nitrógeno durante 30 min antes de comenzar el experimento.

En el reactor con cultivo de microalgas, iluminación y aireación forzada (“POM”) se suministró de forma intermitente una corriente de CO₂ con el fin de mantener el valor de pH entre 7,2 y 7,5. Además esta corriente de CO₂ se empleó como fuente inorgánica de carbono necesaria para el metabolismo de las microalgas.

La concentración de oxígeno disuelto se midió mediante una sonda OxiCal-SL CelloX 325 (WTW, Weilheim, Alemania), conectada a un lector multiparamétrico portátil Multi 340i meter (WTW, Weilheim, Alemania). Asimismo, el pH del reactor se midió mediante una sonda WTW SenTix 41 conectada a un controlador portátil Multi 340i (WTW, Weilheim, Alemania). Ambos gases, aire comprimido y dióxido de carbono, se encuentran conectados al mismo sistema de difusión.

Respecto al experimento “PM”, y con el fin de evitar turbulencias que ocasionaran el stripping de O₂ en el reactor, se suprimió el aporte de CO₂, y al igual que en el experimento “P”, se mantuvo la velocidad de agitación en 100 rpm. Al suprimir el aporte de CO₂, no se controló la variable pH y al mismo tiempo se eliminó el aporte de una fuente inorgánica de carbono. El experimento se diseñó sin turbulencias (corrientes de O₂ y CO₂) con el fin de obtener un medio sobresaturado de oxígeno a partir del cual estudiar la eliminación de los CDE. En la

Figura 18 se muestra un esquema de la configuración empleada para la realización de los experimentos tanto cinéticos como de degradación.

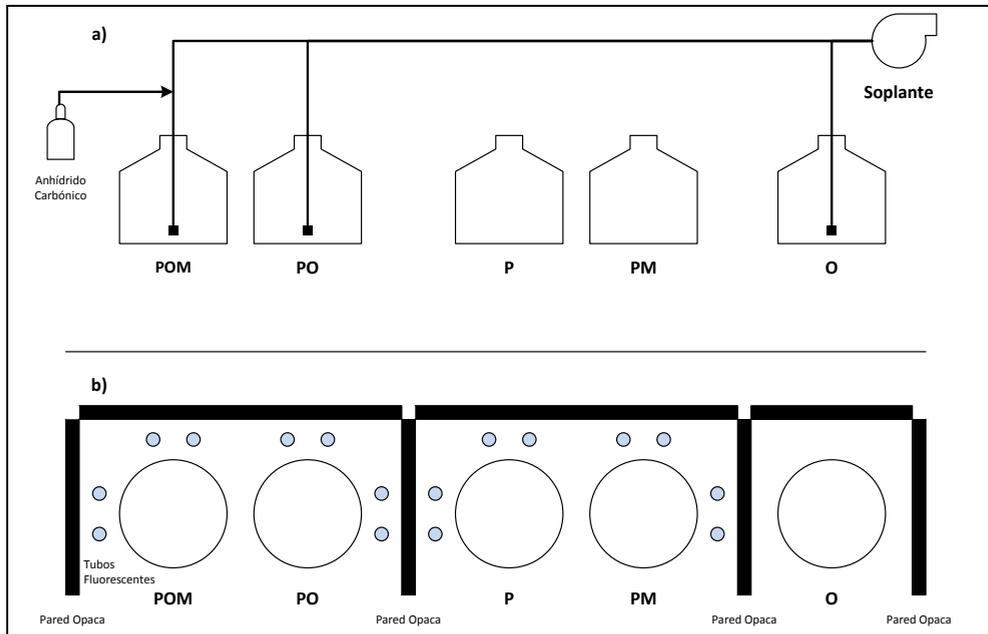


Figura 18. Diagrama del sistema de fotobiorreactores. a) sección longitudinal y b) sección transversal. Las combinaciones de parámetros fueron: luz, oxígeno y microalgas ("POM"), luz y oxígeno ("PO"), luz ("P"), luz y microalgas ("PM") y oxígeno ("O").

Finalmente, para los experimentos llevados a cabo con el parámetro luz se emplearon cuatro tubos fluorescentes de 18 W de potencia nominal (580 mm de longitud, 26 mm D.E.) para conseguir una irradiación constante. Se emplearon tubos fluorescentes GroLux (Sylvania, Londres, Reino Unido), los cuales presentan un espectro de emisión con una elevada Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA). La RFA mide la cantidad de radiación comprendida en el intervalo de longitudes de onda que es capaz de producir actividad fotosintética en organismos fotosintéticos. La RFA se midió en la superficie de los reactores mediante un sensor HOBO Photosynthetic Light Smart Sensor conectado a un sistema de adquisición de datos HOBO Micro Station Data Logger (MicroDAQ.com, Contocook, Nuevo Hampshire, EEUU). Los reactores fueron sometidos a una intensidad total comprendida entre 120 y 135 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Los experimentos bajo condiciones de oscuridad fueron llevados a cabo con los reactores envueltos en papel de aluminio y los tubos fluorescentes apagados.

El cultivo de microalgas empleado como inóculo fue aislado de las paredes del decantador secundario de la EDAR de la Cuenca del Carraixet. Este cultivo se mantuvo en laboratorio bajo condiciones semicontinuas de alimentación, empleando para ello el permeado de la planta piloto SAnMBR usado en el presente estudio y con condiciones de iluminación variables entre 114 y 198 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En el inóculo se identificaron microalgas del género *chlorococcum*, pertenecientes al filo de las *chlorophyta* junto con microalgas del filo de las *cyanobacteria*. El pH del medio, al igual que en los experimentos, se ajustó entre 7,2 y 7,5 mediante el empleo de una corriente de CO_2 .

Los reactores fueron fortificados con 3,5, 15,0, 10,0 y 10,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ de OP, t-NP, 4-NP y BPA respectivamente. La fortificación elegida se corresponde con la concentración media presente de forma natural para cada CDE en el efluente del módulo SAnMBR multiplicada por un factor 5.

3.2. Balance de masa

Para verificar la consistencia de los datos, así como para poder distinguir el tipo de degradación (biodegradación o adsorción) experimentada por los CDE en la planta piloto SAnMBR-UCT y la microalgas, se calculó el balance de masa correspondiente. Con este cálculo se determina la distribución de los CDE a lo largo de los sistemas estudiados, obteniéndose información sobre su distribución entre la fracción soluble y suspendida. Los posibles mecanismos de eliminación de CDE incluyen adsorción en sólidos así como degradación biológica o química. A pesar de que en la mayoría de los casos es difícil distinguir qué tipo de mecanismo de eliminación se produce, trabajos recientes han concluido que únicamente dos tipos de mecanismos (adsorción y degradación biológica) son relevantes en procesos desarrollados en EDAR (POSEIDON, 2005). La efectividad de dichos mecanismos, en

su mayor parte, depende de las características físico-químicas, tales como lipofilia o acidez, y de la estructura química de cada compuesto.

Actualmente existen en la bibliografía dos corrientes para calcular el balance de masa: a) aquellos que determinan experimentalmente las concentraciones de los CDE en fracción soluble y suspendida y b) aquellos que únicamente determinan de forma experimental las concentraciones de CDE en la fracción soluble y estiman las concentraciones en la fracción suspendida mediante el empleo de coeficientes que miden la afinidad del CDE por la fracción suspendida.

La efectividad de la afinidad de una sustancia por la materia orgánica se mide mediante dos tipos de coeficientes: el coeficiente octanol-agua ($\log K_{ow}$) y el coeficiente de partición del carbono orgánico (K_{oc}). Sin embargo, algunos trabajos bibliográficos, que explican el comportamiento de sorción de algunos CDE en EDAR, han encontrado limitaciones en la aplicación de estos coeficientes (Lai et al., 2000; Holbrook et al., 2004). El coeficiente de distribución agua-fango (K_d), definido como *“la relación entre las concentraciones de un determinado compuesto entre la fracción suspendida y soluble en condiciones de equilibrio”* se ha propuesto como el parámetro más adecuado para dicho cálculo (Ternes et al., 2004). Este coeficiente tiene en cuenta los dos principales mecanismos de sorción: la absorción y la adsorción. Los datos experimentales de concentraciones de CDE en el fango se encuentran limitados, debido a la dificultad intrínseca de analizar muestras sólidas. Para superar dicho problema, algunos autores emplean los parámetros K_d o K_{ow} , los cuales parecen ser herramientas útiles para predecir la distribución entre ambas fracciones (Ternes et al., 2004; Carballa et al., 2007).

Para realizar balances de masa en EDAR, tan solo unos pocos trabajos incluyen las medidas de las fracciones soluble y suspendida en los cálculos (Andersen et al., 2003; Bester, 2004; Carballa et al., 2007), mientras que la mayoría de trabajos tan solo incluyen las medidas experimentales de las concentraciones en la fracción soluble y estiman la concentración suspendida mediante K_d o K_{ow} (Johnson et al., 2000; Johnson y Sumpter, 2001; Clara et al., 2005a). Este hecho se puede explicar debido a la complejidad del análisis de muestras de fango, así como el reducido número de técnicas analíticas disponibles para este tipo de matriz. Las conclusiones ofrecidas por la bibliografía muestran que el método empleado para los cálculos del balance de masa pueden afectar significativamente a los resultados finales

concernientes a la efectividad de cada mecanismo en EDAR (Carballa et al., 2007). El cálculo del balance de masa mediante el empleo del coeficiente K_d reduce los costes, ya que evita el análisis de CDE en el fango (Estrada-Arriaga y Mijaylova 2011). Sin embargo, mientras que dicho método parece ser una buena opción para compuestos hidrofílicos que tienden a permanecer en la fracción soluble, la determinación de estos compuestos adsorbidos y absorbidos en la materia particulada presenta un elevado error (Carballa et al., 2007).

Métodos de análisis.

4. Métodos de análisis

4.1. Reactivos

Los patrones 4-n-nonilfenol (4-NP, Número CAS 104-40-5) y nonilfenol ramificado (t-NP, Número CAS 84852-15-3) fueron suministrados por la empresa Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). El octilfenol (OP, Número CAS 140-66-9), bisfenol-A (BPA, Número CAS 80-05-7), pentaclorofenol (PCP, Número CAS 87-86-5), estrona (E1, Número CAS 53-16-7) y 17 β -estradiol (E2, Número CAS 50-28-2) fueron suministrados por la empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Por último, 17 α -etinilestradiol (EE2, Número CAS 57-63-6) fue suministrado por la empresa Fluka Biochemika (Steinheim, Alemania).

El metanol se suministró por la empresa Merck (Darmstadt, Alemania). El agua pura (resistividad de 18,2 M Ω ·cm a 25 °C) se obtuvo mediante el sistema de purificación de agua Synergy UV de la empresa Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). El acetonitrilo fue suministrado por la empresa J.T. Baker (Deventer, Países Bajos), el Florisil (tamaño de partícula 149-250 μ m) se obtuvo de la empresa Aldrich (Steinheim, Alemania) y la fase de sílica enlazada a grupos octadecil (Bondesil C₁₈, 40 μ m) se obtuvo de la empresa Varian (Harbor City, California, Estados Unidos). El helio (>99,9992%), el anhídrido carbónico (>99,2%) y el nitrógeno (>99,2%) fueron suministrados por la empresa Carburos Metálicos (Barcelona, España).

Las disoluciones madre de patrones fueron preparadas en metanol, así como sus respectivas diluciones hasta una concentración mínima de 1 mg/L. Las diluciones inferiores a 1 mg/L fueron preparadas en agua pura. Las disoluciones se mantuvieron a 4 °C en oscuridad hasta su uso. Como protocolo de caducidad de los patrones se estableció que; la duración máxima de las disoluciones superiores a 1 mg/L fuese de 6 meses, las de concentración comprendida entre 100 μ g/L y 1 mg/L fuese de 2 semanas, mientras que las de concentración inferior a 100 μ g/L fueron preparadas diariamente.

4.2. Muestreo

Los tratamientos estudiados se clasifican en secundarios (SAnMBR, TC y aMBR) y postratamientos (UCT y microalgas). El TC fue estudiado a escala industrial, mientras que los tratamientos SAnMBR, aMBR y UCT se estudiaron a escala de planta piloto. Por último, las microalgas se estudiaron a escala de laboratorio.

Las muestras para las plantas piloto e industrial fueron recogidas y se distribuyeron aleatoriamente durante los cinco días laborables de la semana, evitando así los posibles errores sistemáticos derivados de la inercia semanal de los vertidos. Se establecieron tres puntos de muestreo para el estudio de ambos tipos de tratamientos (excepto microalgas), afluente, reactor y efluente. Para el proceso SAnMBR, los puntos de muestreo fueron: afluente (salida del pretratamiento de la EDAR tras pasar por un rototamiz), reactor anaerobio de membrana y efluente (correspondiente al permeado de la membrana). Los correspondientes al proceso TC fueron: afluente (salida de la decantación primaria de la EDAR), reactor de fangos activados y efluente. Finalmente, los puntos de muestreo del proceso aMBR fueron: afluente (salida de la decantación primaria de la EDAR), en el reactor aMBR y el efluente (correspondiente al permeado de la membrana).

Los puntos de muestreo para el postratamiento UCT fueron: afluente (ubicado a la salida del tanque CIP), reactor biológico (ubicado en la zona aerobia del reactor) y efluente (salida del decantador secundario).

Las muestras de afluente y efluente fueron recogidas como muestras integradas. Las correspondientes a los procesos SAnMBR, aMBR y UCT se recogieron con una bomba temporizada activada entre 130 y 300 s/h durante 24 h. En el caso del TC la integración de la muestra se realizó en tiempo real y en función del caudal tratado por la planta en cada instante. Las muestras de los reactores fueron tomadas como muestras puntuales. La totalidad de las muestras fueron recogidas en botellas de vidrio color topacio de 125 mL de capacidad. Las muestras que presentaban únicamente fracción soluble (efluente de SAnMBR y aMBR, afluente y efluente de UCT) fueron almacenadas a 4 °C al abrigo de la luz. Mientras que las muestras que presentaban fracción suspendida (afluentes de SAnMBR, aMBR y TC, reactores SAnMBR, UCT y TC y efluente TC) fueron centrifugadas a 3500 rcf durante 10 min. La centrífuga empleada fue una Eppendorf 5804 (Brinkman

Instruments, Westbury, Nueva York, EEUU). El sobrenadante fue posteriormente almacenado a 4 °C en la oscuridad. La fracción suspendida obtenida tras la centrifugación fue congelada a -80 °C y liofilizada (ilShin, Kryptonstraat, Países Bajos). Tras la liofilización se almacenaron en ambiente seco, controlado por la acción de gel de sílice anhidro y se analizaron en un plazo máximo de una semana.

El muestreo en el estudio de microalgas fue realizado recogiendo 20 mL de cada reactor. La frecuencia de muestreo estuvo comprendida entre una muestra cada diez minutos en los momentos iniciales de cada experimento, momento en el cual la concentración de CDE presenta una elevada variación, y una muestra cada 24 h en los momentos finales del experimento, cuando la variación de las concentraciones de CDE en los reactores fue muy reducida. Las muestras que presentaron únicamente fracción soluble fueron inmediatamente analizadas, mientras que las que presentaban fracciones tanto soluble como suspendida fueron centrifugadas a 3500 rcf durante 10 min. La fracción soluble fue analizada inmediatamente, mientras que la fracción suspendida fue liofilizada y almacenada en un ambiente seco. El plazo máximo para el análisis de las muestras liofilizadas fue de una semana.

4.3. Métodos de análisis de macrocontaminantes en agua residual

Para la caracterización del agua afluente al proceso SAnMBR y microalgas se emplearon diversas técnicas analíticas.

Para la determinación de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST), nutrientes, sulfato, alcalinidad, ácidos grasos volátiles (AGV) y demanda química de oxígeno (DQO) se siguió la metodología propuesta por el “Standard Methods for the Examination Water and Wastewater” (APHA, 2005).

Sólidos suspendidos totales

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se han determinado de acuerdo con el método 2540 D y E del Standard Methods (APHA, 2005). El método establece la eliminación de la humedad por aumento de la temperatura

(temperatura de trabajo 105 °C) de una muestra previamente filtrada a través de un filtro de 0,45 µm. Los SST se determinan por diferencia de peso.

Nutrientes

La determinación del nitrógeno amoniacal, nitrito, nitrato y fosfato se realizó mediante el analizador multiparamétrico de la casa comercial Alliance Instruments (Frepillon, Francia), modelo SmartChem200, empleando para ello, los métodos del Standard Methods (APHA, 2005).

La determinación del nitrógeno amoniacal, el cual se establece como la suma del ion amonio y amoniaco disuelto, se realizó mediante el método 4500-NH₃ D, basado en la determinación de la absorbancia a 660 nm del compuesto formado en la reacción del amonio con hipoclorito y fenol catalizada por nitroprusiato sódico.

El nitrito se determinó mediante el método 4500-NO₂⁻ B. En este método el nitrito se determina por la formación de un complejo formado por reacción con sulfanilamida y N-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro. La medida de la absorbancia se realiza a 543 nm.

El nitrato se determinó con el método 4500-NO₃⁻ H. En este método, el nitrato se determina por reducción de nitrato a nitrito con sulfato de hidracina y posterior medida del ion nitrito. El resultado final se obtiene por diferencia respecto al nitrito de la muestra.

La determinación del fosfato se realizó según el método 4500-P F. Este método consiste en la determinación de fosfato por reacción con molibdato amónico y tartrato de antimonio y potasio. El complejo formando es finalmente reducido con ácido ascórbico. La absorbancia se mide a 880 nm.

Sulfato.

El sulfato se determinó mediante el método 4500-SO₄⁻² E. En este método el ion sulfato precipita en presencia de ácido acético con cloruro de bario, formando

cristales de sulfato de bario, midiéndose la suspensión de la luz mediante un fotómetro a 420 nm.

Alcalinidad y ácidos grasos volátiles.

La determinación tanto de la alcalinidad como de los AGV se realizó mediante el método descrito por Moosbrugger et al., 1992. Dicho método se basa en la valoración de una muestra, previamente filtrada, con HCl 0,1 N hasta alcanzar valores de pH de 6,7, 5,9, 5,2 y 4,3. La determinación final de las concentraciones se realiza mediante cálculos de equilibrio químico.

DQO

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina de acuerdo con el método 5220B propuesto por el Standard Methods (APHA, 2005). En dicho método se analiza la DQO de forma indirecta, determinando el exceso de dicromato empleado. El método emplea el estándar de oxidación de la materia orgánica mediante digestión con reflujo abierto, cuyo intervalo de concentración se encuentra comprendido entre 50 y 800 mg DQO/L. En este método se determina el exceso de dicromato a través de una valoración redox con una sal de hierro ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$). Para la eliminación de la interferencia producida por los iones cloruro se emplea sulfato de mercurio.

4.4. Instrumentos y condiciones cromatográficas

La determinación de los CDE se llevó a cabo con el empleo de la técnica combinada de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (SPME-GC/MS).

La técnica SPME se emplea con el fin de preconcentrar los analitos. Las fibras usadas en dicha técnica fueron de poliacrilato (PA), cuyo espesor es de 85 μm y fueron adquiridas a la empresa Supelco (Bellefonte, Pensilvania, EEUU). En la Figura

19 se pueden observar las fibras y los soportes manuales empleados. Previo a su uso, dichas fibras fueron acondicionadas térmicamente, según la información proporcionada por el fabricante. Para ello se empleó el puerto de inyección del cromatógrafo, manteniendo este a 280 °C durante 1 hora.

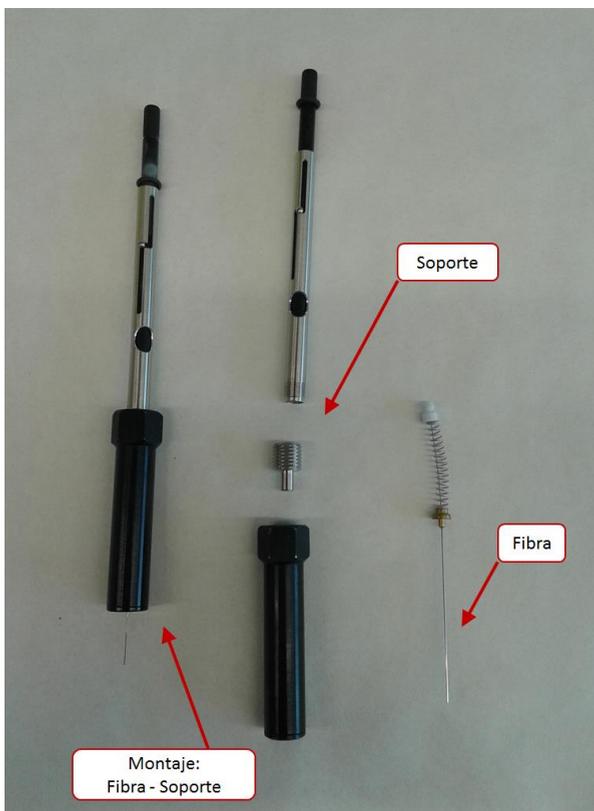


Figura 19. Fibras y soportes empleados en la técnica SPME.

La totalidad de los experimentos llevados a cabo, tanto en matriz acuosa como orgánica, se hicieron por inmersión directa, donde la fibra se sumergió completamente en la disolución. Los viales necesarios para contener la muestra en la etapa de SPME se solicitaron a la empresa Supelco (Bellefonte, Pensilvania, EEUU) y Labbox (Mataró, Barcelona, España). Estos viales fueron de tres dimensiones: vial de 4 mL (15 mm de diámetro externo (D.E.), 45 mm altura, 8 mm

de diámetro interno (D.I.)), vial de 22 mL (23 mm D.E., 85 mm altura, 13 mm D.I.) y vial de 50 mL (40 mm D.E., 70 mm altura, 35 mm D.I.). Los viales de 4 y 22 mL se presentaron con septum y tapón roscado, mientras que el de 50 mL con tapón de presión. La agitación de la muestra se realizó mediante barras de agitación magnética adquiridas en la empresa Labbox (Mataró, Barcelona, España). Las dimensiones de las barras de agitación fueron de 3 mm D.E. y 6 mm anchura, para el vial de 4 mL; y de 7 mm D.E. y 22 mm anchura, para los viales de 22 y 50 mL. El agitador magnético se adquirió en la empresa IKA®Werke GmbH & Co (Staufen, Alemania).

Una vez se preconcentran los analitos de la muestra en la fibra de PA, ésta se introduce en el inyector del cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS). El inyector desorbe térmicamente la muestra y ésta se transfiere a la columna cromatográfica, la cual mediante retención selectiva es capaz de separar los diferentes componentes que forman la matriz de la muestra. De esta forma, los componentes llegan de forma aislada al detector de masas (tiempos de retención diferentes), por lo que se lo que facilita su análisis. El detector de masas produce la ionización de la muestra mediante impacto electrónico (EI).

La totalidad de los análisis de CDE fueron determinados en un GC/MS system 6890 GC equipado con un detector 5973 inert MSD (Agilent Technologies, San José, EEUU). El equipo se controla mediante el software MSD Productivity ChemStation SW Revisión D.01.02 (Agilent Technologies, San José, EEUU). La columna capilar utilizada fue una HP-5ms Ultra Inert de sílice fundida (30,0 m de longitud, 250 μm de diámetro interno, 0,25 μm espesor), cuya fase estacionaria consta de fenilo al 5 % y dimetilpolisiloxano al 95 % (Agilent Technologies, San José, EEUU). La línea de transferencia se mantuvo a 280 $^{\circ}\text{C}$, que corresponde a la temperatura máxima del horno, y la fuente de ionización a 250 $^{\circ}\text{C}$. El detector trabajó en modo seguimiento de iones específicos (SIM). En este modo, el espectrómetro de masas únicamente mide la abundancia de los iones previamente seleccionados. La energía del multiplicador de electrones se estableció en 69,9 eV. Como gas portador se empleó helio, en modo caudal constante (1,0 mL/min).

El portal de inyección del cromatógrafo de gases operó en modo splitless y su temperatura se mantuvo en 280 $^{\circ}\text{C}$. El programa de temperaturas usado en el

horno fue el siguiente: temperatura inicial de 50 °C, se aumenta a razón de 30 °C/min hasta 140 °C, mantenida durante 1 min, se aumenta a razón de 20 °C/min hasta 280 °C, mantenida durante 4 min, se aumenta a razón de 30 °C/min hasta 310 °C, mantenida durante 2 min, siendo el tiempo total de funcionamiento de 19 min.

En la Figura 20 se puede observar el equipo cromatográfico empleado para la determinación de los CDE.

Las operaciones de mantenimiento llevadas a cabo para el correcto funcionamiento del equipo cromatográfico se resumen en el Anexo V.



Figura 20. Equipo cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas empleado para la detección de CDE.

La pesada de patrones y muestras se realizó en una microbalanza Mettler-Toledo XP105 Delta Range (Greifensee, Suiza), con una resolución de 0,01 mg.

Resultados

5. Resultados

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en el seguimiento de los compuestos disruptores endocrinos (CDE) objeto de estudio, a través de los siguientes procesos:

- Tratamiento secundario basado en un proceso de fangos activados (proceso TC).
- Tratamiento secundario basado en un proceso aerobio de membranas (proceso aMBR).
- Tratamiento secundario basado en un proceso anaerobio de membranas (proceso SAnMBR).
- Postratamiento del efluente de un proceso SAnMBR mediante un proceso UCT a escala planta piloto.
- Postratamiento del efluente de un proceso SAnMBR mediante un cultivo de microalgas a escala laboratorio.

Con el fin de profundizar más en los mecanismos de degradación de disruptores mediante un cultivo de microalgas, se estudió el efecto sobre la degradación de estos compuestos por los parámetros implicados en un cultivo de estas características; luz, oxígeno disuelto y microalgas. Además, para completar este estudio, se determinaron las cinéticas de degradación de estos CDE bajo la influencia de la luz, oxígeno y microalgas. Las cinéticas de degradación se determinaron a escala de laboratorio bajo condiciones controladas de luz, oxígeno disuelto y presencia/ausencia de microalgas.

Los resultados obtenidos son analizados con el fin de evaluar tanto las mejores condiciones de eliminación, como el proceso o combinación de procesos que mejor rendimiento de eliminación proporcionen bajo las condiciones previamente determinadas. De esta forma se pretende planificar una estrategia en el tratamiento de agua residual que ofrezca el rendimiento de eliminación más eficaz con la tecnología e infraestructura disponible en cada caso. Dicho trabajo se recoge en artículos científicos publicados en *Bioresource Technology* y *Water Science and Technology*, cuyas referencias son:

- M.R. Abargues, J. Ferrer, A. Bouzas, A. Seco (2013). Removal and fate of endocrine disruptors chemicals under lab-scale posttreatment stage. Removal assessment using light, oxygen and microalgae. *Bioresource Technology*, 149, 142-148.
- Abargues M.R., Robles A., Bouzas A., Seco A. (2012). Micropollutants removal in an anaerobic membrane bioreactor and in an aerobic conventional treatment plant. *Water Science and Technology*, 65.12, 2242-2250.

Para la correcta determinación de la concentración de los CDE, tanto en la fase soluble como suspendida, se hizo necesario la puesta a punto de métodos analíticos que presentasen límites de detección del orden de ng/L. En el presente capítulo se muestra una descripción de los métodos empleados, así como la optimización de estos. Parte de este trabajo se encuentra publicado en un artículo de la revista científica *Analytical Methods*, cuya referencia es:

- Moliner-Martinez Y., Pastor-Carbonell J.M., Bouzas A., Seco A., Abargues M.R., Campins-Falcó P. (2013). Guidelines for alkylphenols estimation as alkylphenol polyethoxylates pollution indicator in wastewater treatment plant effluents. *Analytical Methods*, 5, 2209-2217.

5.1. Optimización de los métodos de análisis

Tradicionalmente los CDE en aguas se han analizado mediante cromatografía de gases, empleando como detectores: detector de ionización de llama (Meinert et al., 2007), detector de captura de electrones (Kajiwara et al., 2006) o espectrometría de masas (Tabira et al., 1999; Gabriel et al., 2005).

Sin embargo, para la determinación de concentraciones a nivel de traza, inferiores a $\mu\text{g/L}$, es necesaria una etapa de preconcentración previa a la técnica cromatográfica. Con el fin de mejorar tanto la selectividad como la sensibilidad del método se ha empleado, como técnica de preconcentración, la microextracción en fase sólida (SPME) previa a la inyección de la muestra. Dicha etapa concentra los CDE en una fibra de reducido espesor sin necesidad de disolventes orgánicos y con una reducida manipulación de la muestra. Los inconvenientes de este

pretratamiento radican en el elevado coste de las fibras y que, debido a la limitada capacidad de las mismas (la cantidad de recubrimiento es reducida), en ocasiones no se obtienen unos límites de detección suficientemente bajos, sobre todo si se combina con detectores de reducida sensibilidad (Alpendurada, 2000).

Para la obtención de la máxima sensibilidad, se optimizaron una serie de parámetros que afectan al proceso de sorción (absorción y adsorción) sobre la fibra: tiempo de extracción, pH y volumen de extracción. Igualmente se optimizaron los parámetros correspondientes a la etapa de desorción. Debido a que la desorción se efectúa térmicamente, los parámetros sobre los que se trabajaron fueron la temperatura del inyector y el tiempo de residencia de la fibra en el mismo.

La optimización de los métodos de análisis para los citados disruptores se realizó progresivamente a lo largo de esta tesis, motivo por el cual en algunos estudios del capítulo 5 no figuran todos los disruptores.

5.1.1. Microextracción en fase sólida

Los espectros característicos de los CDE fueron determinados con el detector de masas en modo barrido completo o SCAN. El modo SCAN consiste en hacer barridos entre dos masas preestablecidas, de modo que el Detector de Espectrometría de Masas (MSD) proporciona los espectros de masas de todas y cada una de las relaciones m/z comprendidas en el intervalo previamente definido. Es el modo usado en análisis cualitativo, ya que es posible la identificación de compuestos por comparación de los espectros resultantes en las bases de datos existentes. En el presente trabajo se ha empleado la base de datos NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Versión 2.0 d. Sin embargo, los parámetros que pueden afectar al proceso de SPME fueron optimizados con el detector de masas en modo de control de iones específicos o SIM. El modo SIM consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. Es el modo a emplear para análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos, ya que se caracteriza por una mayor sensibilidad. Sin embargo, no da información acerca de compuestos inesperados que presente la matriz.

Los experimentos se realizaron analizando patrones a un nivel de concentración de 1, 5, 10, 10, 20, 20, 20,1 y 20 $\mu\text{g/L}$ de octilfenol (OP), nonilfenol ramificado (t-NP), 4-n-nonilfenol (4-NP), pentaclorofenol (PCP), bisfenol-A (BPA),

estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2), respectivamente. Se empleó la agitación continua, de modo que se asegura la homogeneidad del patrón y se reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio fibra-disolución.

El primer parámetro en ser optimizado fue el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre la fase acuosa y la fibra. Dicho parámetro fue estudiado representando la señal obtenida frente al tiempo de exposición. En este caso, el pH de los patrones, el cual no fue ajustado, se mantuvo en $6,5 \pm 0,3$. Tras la etapa de SPME, los CDE fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 280 °C durante 2 min. En la Figura 21 se observa como la eficacia del proceso de sorción aumenta al aumentar el tiempo de exposición de la fibra.

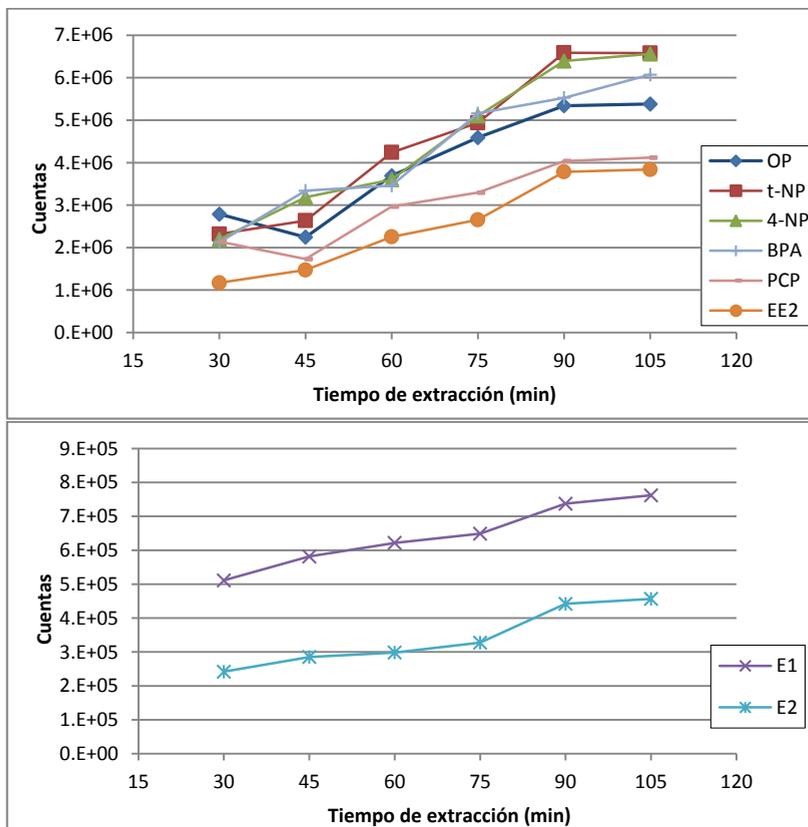


Figura 21. Eficacia de la extracción por SPME con el tiempo de exposición.

Se puede observar que el comportamiento de todos los CDE a tiempos elevados es similar. A partir de 90 min se observa la saturación de la señal, lo que indica que se ha alcanzado el equilibrio de extracción. Así como para OP, 4-NP, t-NP, BPA, PCP y EE2 se observa una ascensión rápida de la respuesta con el tiempo, para E1 y E2 este aumento es menos acusado y la saturación de la señal no se observa con la misma claridad. En la Figura 21 también se puede observar que, para tiempos de extracción bajos, existen comportamientos diferentes para cada analito. Así, para el OP y PCP se observa una reducción de la señal a los 45 min de exposición. El resto de los analitos siempre muestran un aumento de la misma con el tiempo.

Para ambos tipos de comportamiento, se elige un tiempo de extracción de 60 min para realizar los análisis, aunque el equilibrio no se haya alcanzado. Un tiempo de exposición de 60 min representa un compromiso razonable para la obtención de una respuesta correcta por parte de los analitos y un tiempo aceptable de análisis.

Una vez establecido el tiempo de extracción de SPME se procedió a estudiar el volumen de trabajo para el proceso de SPME. Los volúmenes de trabajo se estudiaron con tres tipos de viales: viales de 5, 22 y 50 mL. Para el experimento llevado a cabo con 4 mL de disolución patrón, se empleó un vial de 5 mL y una barra de agitación magnética (3 mm D.E., 6 mm longitud). Para los experimentos llevados a cabo con 15 y 20 mL de disolución patrón, se emplearon viales de 22 mL y una barra de agitación magnética (7 mm D.E., 20 mm longitud). Para los experimentos llevados a cabo con 50 mL de disolución patrón se empleó el vial de 50 mL y una barra de agitación magnética (7 mm D.E., 20 mm longitud). La Figura 22 muestra la dependencia existente entre el volumen empleado en la etapa de SPME y la eficacia del proceso de extracción.

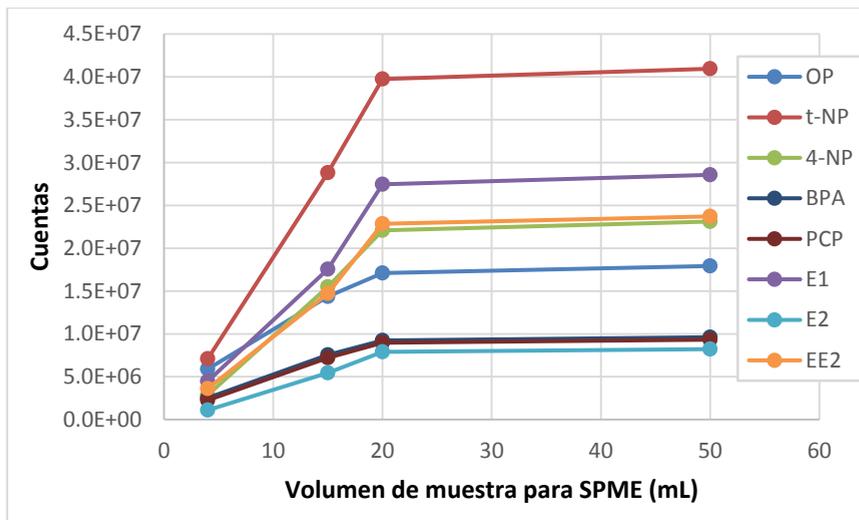


Figura 22. Eficacia del proceso de extracción con respecto al volumen de muestra empleado en la etapa de SPME.

En la Figura 22 se puede observar como un aumento del volumen de extracción va ligado a un aumento de la eficacia del proceso de sorción. Asimismo, se observa que el comportamiento de todos los CDE es similar, observándose la saturación de la señal a partir de los 20 mL de volumen de extracción. El aumento del volumen de extracción de 20 a 50 mL aporta un aumento de la señal inferior al 5 %, por lo que se fijó un valor de 20 mL como volumen de trabajo.

El efecto del pH sobre el proceso de extracción SPME también fue estudiado. Para ello se trabajó a tres niveles de pH: 2,0 (acidificando el medio con H₂SO₄ 0,1 M), 6,5 (medio sin modificar el pH) y 9,0 (basificando el medio con NaOH 0,1 M). Como se puede ver en la Figura 23, no se observaron diferencias significativas a diferentes valores de pH, por lo que los futuros experimentos se realizaron en medios sin alteración del pH.

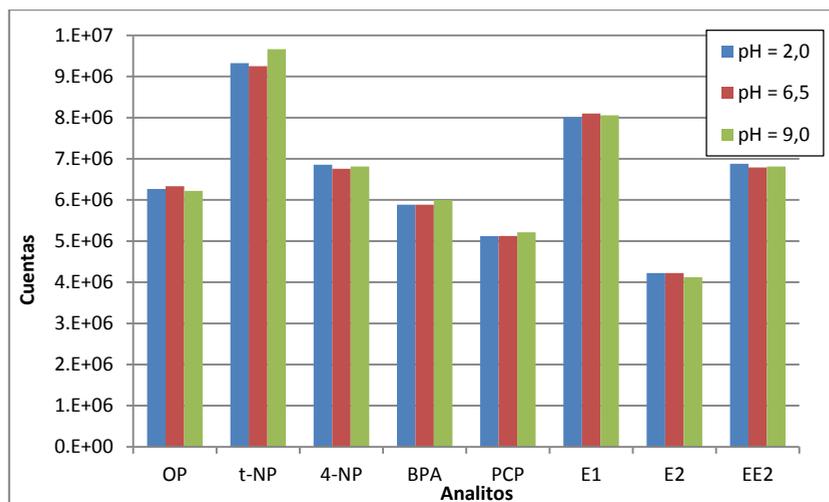


Figura 23. Dependencia de la sensibilidad del método en función del pH del medio en la etapa de extracción por SPME.

Una vez establecidos los parámetros del proceso de sorción bajo SPME se estudió la eficacia del proceso de desorción en el inyector, estudiando los parámetros temperatura del inyector y tiempo de desorción. La efectividad de la temperatura del inyector en el proceso de desorción se evaluó con dos temperaturas, 250 y 280 °C, observándose que la sensibilidad obtenida aumentaba con la temperatura, y que la respuesta a 280 °C era superior a la obtenida a 250 °C. Se puede observar esta tendencia en la Tabla 3.

Tabla 3. Variación de la sensibilidad del método con la variación de la temperatura del inyector.

Compuesto *	Temp. Inyector	
	T = 250 °C	T = 280 °C
OP	5,9·10 ⁶	6,5·10 ⁶
t-NP	8,6·10 ⁶	9,6·10 ⁶
4-NP	6,2·10 ⁶	6,8·10 ⁶
BPA	5,3·10 ⁶	6,0·10 ⁶
PCP	4,6·10 ⁶	5,0·10 ⁶
E1	7,4·10 ⁶	8,1·10 ⁶
E2	3,9·10 ⁶	4,3·10 ⁶
EE2	6,4·10 ⁶	7,0·10 ⁶

(*) Las unidades de los valores mostrados se expresan en cuentas.

Los resultados muestran como el empleo de una temperatura de inyección de 280 °C proporciona un aumento de la sensibilidad de $10,4 \pm 1,2$ % respecto a la sensibilidad obtenida a una temperatura de 250 °C.

Finalmente, se evaluó la dependencia del tiempo de desorción con la sensibilidad del método. Se estudiaron los siguientes tiempos de desorción: 15, 30, 45 y 60 segundos. Los resultados mostraron que la mayor sensibilidad, para todos los CDE estudiados, se obtuvo empleando 30 s de tiempo de desorción, por lo que este valor fue seleccionado para futuros análisis (ver Figura 24).

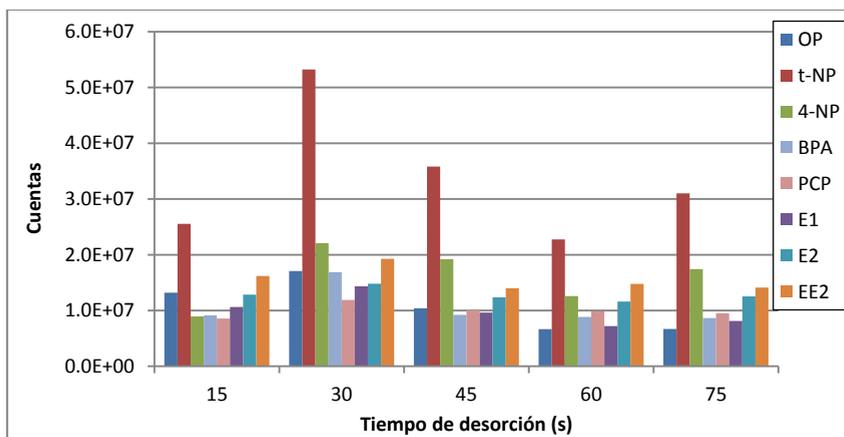


Figura 24. Dependencia de la sensibilidad del método en función de la efectividad del proceso de desorción.

Asimismo, con el fin de asegurar la completa desorción de cualquier interferente de lenta desorción retenido en la fibra que pudiera entorpecer futuros análisis, ésta se mantuvo en el inyector durante 2 minutos adicionales. De esta manera, cualquier compuesto desorbido durante estos dos minutos es eliminado del sistema de la fibra-inyector mediante el caudal de purga existente en el inyector del GC/MS, evitando de esta manera la aparición de problemas de contaminación cruzada.

Por tanto, el método de extracción optimizado para el tratamiento de las muestras solubles implica: sobre un vial de 22 mL se colocan 20 mL de la muestra y

una barra de agitación magnética sin ajustar el pH. La fibra se sumerge en la muestra y se agita a 1500 rpm durante 60 min. Una vez finalizado el tiempo de extracción, la fibra se retira de la disolución y se introduce en el inyector del GC/MS a 280 °C durante 30 s de desorción y 2 min adicionales.

Una vez determinados los valores de los parámetros del método se procede a la determinación de los factores de calidad del mismo. Los factores de calidad determinados son: límite de detección, límite de cuantificación, coeficiente de correlación y desviación estándar relativa.

Los límites de detección (LDD) y los límites de cuantificación (LDC) fueron determinados experimentalmente como la mínima concentración de analito que proporciona una señal cromatográfica tres veces la relación señal/ruido y diez veces dicha relación, respectivamente. La sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad de discernir o diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de un analito. La Tabla 4 muestra las características analíticas del método: los límites de detección y cuantificación, los parámetros de la recta de regresión por mínimos cuadrados (ordenada en el origen (a), pendiente (b) y coeficiente de regresión (r^2), $n=8$), intervalo dinámico lineal y la desviación estándar relativa intra-día (RSD, $n=5$).

Tabla 4. Factores de calidad del método de determinación de CDE en la fracción soluble.

Compuesto	LDD (ng/L)	LDC (ng/L)	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	r^2	Intervalo lineal (ng/L)	RSD (%)
OP	2	6,7	$(-18 \pm 4) \times 10^5$	$(11 \pm 5) \times 10^3$	0,990	2 - 6000	12
t-NP	25	83,3	$(-6 \pm 2) \times 10^6$	$(5 \pm 0.2) \times 10^3$	0,994	25 - 50000	14
4-NP	8	26,7	$(-8 \pm 3) \times 10^6$	$(12 \pm 0.5) \times 10^3$	0,995	5 - 10000	15
BPA	500	1666,7	$(-4 \pm 2) \times 10^5$	$(4.4 \pm 0.2) \times 10^2$	0,990	500 - 50000	16
PCP	600	2000,0	$(-1 \pm 3) \times 10^6$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^3$	0,991	500 - 50000	13
E1	200	666,7	$(-20 \pm 16) \times 10^4$	74 ± 9	0,990	200 - 100000	20
E2	300	1000,0	$(-14 \pm 8) \times 10^4$	44 ± 5	0,991	200 - 100000	19
EE2	300	1000,0	$(-15 \pm 4) \times 10^4$	68 ± 2	0,993	200 - 100000	14

Estos valores indican que el método proporcionó una linealidad adecuada dentro de los intervalos de concentración ensayados. Los LDD obtenidos son adecuados para el estudio del comportamiento de los CDE tanto en las muestras reales como en los experimentos de laboratorio, ya que dichos límites

proporcionan sensibilidad suficiente como para analizar estos compuestos a un nivel de concentración del orden del ng/L.

Los espectros de masas de cada CDE se muestran en el Anexo IV (ver Figura 50). Dichos espectros se han realizado en modo SCAN entre 100 y 300 m/z (la configuración SCAN del espectrómetro de masas mide la abundancia de todos los iones presentes en un intervalo previamente establecido). Para comprobar la correcta identificación de los analitos estudiados se compararon los espectros obtenidos con los presentes en la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST) (Stein et al., 2005), observándose correlación y, por lo tanto, la correcta identificación de los mismos.

5.1.2. Dispersión de matriz en fase sólida

El análisis de la fracción suspendida se realizó mediante la técnica dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), descrita en Campins et al. (2008). A pesar de que dicho trabajo se centraba en el análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de tellinas y mejillones, se aplicó con éxito a las muestras liofilizadas de fango digerido y microalgas. Tal y como se comentará más adelante, dicho método es capaz de extraer y cuantificar los CDE de la matriz sólida.

El método consiste en pesar con precisión $0,10 \pm 0,01$ g de muestra que se colocan en un mortero de vidrio. Inmediatamente se añaden 0,4 g de fase sólida octadecil (C_{18}) y se mezcla vigorosamente durante 5 min. La mezcla del sistema formado por muestra- C_{18} produce la dispersión de los analitos en la matriz sólida de la muestra. Posteriormente, dicha mezcla es transferida a un cartucho de vidrio de extracción en fase sólida de 6 mL (SPE, Supelco, Bellefonte, Pensilvania, EEUU), que contiene en el interior una frita de teflón de 20 μ m de tamaño de poro (Supelco, Bellefonte, Pensilvania, EEUU) y 0,1 g de fase Florisil, el cual se emplea para retener los lípidos presentes en la muestra. Las fases Florisil y C_{18} son previamente lavadas empleando 1 mL de acetonitrilo. Los CDE son eluidos mediante extracción en dos etapas con 1,2 mL de acetonitrilo (empleando 0,6 mL en cada etapa), siendo el volumen recogido aproximadamente de 0,8 mL. Entonces, el extracto es diluido con 2,6 mL de agua, obteniendo un porcentaje final de acetonitrilo en la disolución final de aproximadamente un 23 % (v/v). Los CDE de la

disolución final son preconcentrados mediante la técnica SPME y posteriormente analizados en el GC/MS. Para la extracción por SPME se sumerge la fibra en la disolución anterior, se agita a 1500 rpm durante 60 min, una vez finalizado el tiempo de extracción se retira de la disolución y se introduce en el inyector del GC/MS a 280 °C durante 30 s de desorción y 2 min adicionales. Debido a que los volúmenes obtenidos mediante este método son reducidos (3,4 mL) la preconcentración mediante SPME se ha de realizar en un vial de 4 mL.

Para comprobar la efectividad de la extracción con acetonitrilo, se realizaron estudios de recuperación sobre la etapa de DMFS. Para ello se fortificaron muestras de fango con 2, 10, 20, 20, 40, 40, 40,2 y 40 µg/kg de OP, 4-NP, t-NP, BPA, PCP, E1, E2 y EE2, respectivamente. Dicha muestra fortificada fue extraída según la técnica DMFS, el extracto de la muestra se eluyó con acetonitrilo y se recogió en un vial de 4 mL. Para comprobar el nivel de concentración de los analitos que se quedaban retenidos en el residuo sólido tras la primera extracción, se repitió la etapa de extracción con acetonitrilo dos veces más, obteniendo finalmente tres viales con las tres extracciones sucesivas descritas. A los viales se les adicionaron 2,6 mL de agua Milli-Q y se analizaron según las técnicas SPME y GC/MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25.

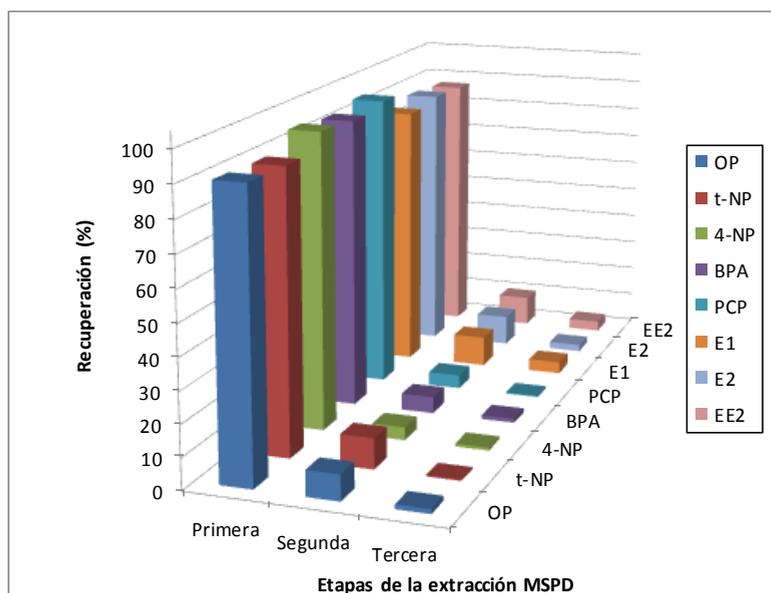


Figura 25. Recuperación obtenida para cada CDE en la etapa de extracción de DMFS.

Como puede observarse en la Figura 25, la primera etapa de extracción es capaz de recuperar entre el 86 y el 95 % de los CDE presentes en la muestra de fango, mientras que en las dos etapas siguientes la recuperación es inferior al 10 %. Por tanto, los resultados obtenidos indican que una etapa de extracción por DMFS es suficiente para el análisis de la fracción suspendida.

Una vez establecido el método de análisis para la fracción suspendida se calcularon los factores de calidad, que para este caso son: límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC), sensibilidad, coeficiente de correlación y desviación estándar relativa.

En la Tabla 5 se muestran los parámetros de calidad del método, los límites de detección y cuantificación, los parámetros de la recta de regresión por mínimos cuadrados (ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y el coeficiente de regresión (r^2 , $n=8$), intervalo dinámico lineal y la desviación estándar relativa intra-día (RSD, $n=5$)).

Tabla 5. Factores de calidad del método de determinación de CDE en la fracción suspendida.

CDE	LDD (ng/kg)	LDC (ng/kg)	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	r^2	Intervalo lineal (kg/L)	RSD(%)
OP	20	67	$(-20 \pm 8) \times 10^5$	$(14 \pm 1) \times 10^3$	0,997	20 - 6000	17
t-NP	110	367	$(-6 \pm 5) \times 10^6$	$(6.4 \pm 0.5) \times 10^3$	0,996	100 - 50000	15
4-NP	30	100	$(-11 \pm 4) \times 10^6$	$16.0 \pm 0.8) \times 10^3$	0,990	30 - 10000	18
BPA	1000	3333	$(2.6 \pm 0.9) \times 10^6$	$(7 \pm 1) \times 10^3$	0,990	1000 - 50000	19
PCP	1000	3333	$(-5 \pm 4) \times 10^6$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^3$	0,994	1000 - 50000	16
E1	400	1333	$(-5 \pm 3) \times 10^5$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^2$	0,995	400 - 100000	15
E2	600	2000	$(-2 \pm 1) \times 10^5$	96 ± 8	0,996	600 - 100000	18
EE2	600	2000	$(-4 \pm 4) \times 10^5$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^2$	0,992	600 - 100000	19

Al igual que para la fracción soluble, los factores de calidad obtenidos para el análisis de la fracción suspendida muestran que el método de trabajo es adecuado para el estudio de CDE en fango.

5.1.3. Control de calidad de la señal analítica

Para asegurar la calidad de la medida analítica, llevada a cabo mediante el equipo GC/MS, se realizan controles de calidad diarios. Estos controles de calidad

se basan en la correcta identificación y cuantificación de los analitos, estableciendo para ello los criterios definidos a continuación.

La correcta identificación de los analitos se lleva a cabo midiendo las intensidades relativas de los iones detectados correspondientes a cada patrón de calibración, y comparándolas con las obtenidas en las muestras. Se establece una tolerancia máxima del 20 %. Los iones característicos seleccionados no deberán, en la medida de lo posible, proceder exclusivamente de la misma parte de la molécula y la relación señal-ruido para cada ion de diagnóstico debe ser superior a 3:1.

La correcta cuantificación incluye tres controles diarios: a) análisis de un blanco de reactivos, donde el criterio de aceptación es la no existencia de pico cromatográfico; b) análisis de un patrón a nivel del límite de detección, cuyo criterio de aceptación se basa en la existencia de un pico cromatográfico cuya desviación máxima respecto al valor proporcionado por la recta de calibrado es del 20 %; y c) análisis de patrón a nivel del límite de cuantificación, cuyo criterio de aceptación se basa en la existencia de un pico cromatográfico cuya desviación máxima respecto al valor proporcionado por la recta de calibrado es del 20 %. Además, y solo en caso de obtener un positivo en alguna de las muestras, se analiza un patrón con una concentración, de los respectivos analitos, similar a la obtenida por la(s) muestra(s) que ha(n) proporcionado dicho positivo. Al igual que en los casos “b” y “c” el criterio de aceptación de análisis corresponde a una desviación máxima del 20 % respecto al valor proporcionado por la recta de calibrado.

5.2. Degradación de CDE en una planta industrial convencional de fangos activados (proceso TC)

En este apartado se evalúa el comportamiento de CDE en la EDAR de la Cuenca del Carraixet. El seguimiento de los CDE en la planta industrial convencional se llevó a cabo en el proceso de fangos activados desde octubre de 2010 hasta mayo de 2011. Los CDE estudiados en este período fueron: OP, 4-NP, t-NP, E1, E2 y EE2. Los parámetros operacionales de la planta fueron: TRC de 5 ± 1 d y TRH de 4 ± 1 h.

Las características del agua residual de entrada al TC durante el periodo de estudio fueron: 290 ± 30 mg DQO/L, 96 ± 13 mg DQO_{soluble}/L, 32 ± 4 mg N-NH₄⁺/L,

5 ± 2 mg P-PO₄³⁻/L, 112 ± 7 mg S-SO₄²⁻/L, 6 ± 3 mg DQO/L asociada a ácidos grasos volátiles (AGV) y 350 ± 30 mg CaCO₃/L de alcalinidad.

5.2.1. Fracción soluble

En el estudio de la fracción soluble de la EDAR del Carraixet se observó como las concentraciones de los alquilfenoles (OP, 4-NP, t-NP) en el afluente fueron superiores a las del efluente. Por otra parte, el nivel de concentración de las hormonas (E1, E2 y EE2) se mantuvo por debajo de LDD del método en todos los puntos de muestreo, por lo que no fue posible su estudio. El promedio de las concentraciones observadas durante el periodo estudiado se pueden ver en la Tabla 6.

Tabla 6. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en la fracción soluble del afluente y efluente del proceso TC.

	Conc. (µg/L)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
Afluente	OP	0,370	<LDD	0,096	0,124
	t-NP	6,700	<LDD	2,407	1,860
	4-NP	1,400	<LDD	0,314	0,496
Efluente	OP	0,084	<LDD	0,034	0,028
	t-NP	1,546	<LDD	0,965	0,648
	4-NP	0,300	<LDD	0,056	0,116

Los rendimientos de eliminación obtenidos para los alquilfenoles estuvieron comprendidos entre el 64 y el 78 %, observándose que valores de TRC (5 ± 1 d) y TRH (4 ± 1 h) reducidos son capaces de producir rendimientos de eliminación importantes bajo condiciones aerobias. Sin embargo, para las condiciones operacionales estudiadas no se alcanza una completa eliminación de la fracción soluble de estos alquilfenoles, indicando que se requiere un tratamiento posterior o un cambio en las condiciones operacionales que favorezcan dicho proceso de eliminación.

5.2.2. Fracción suspendida

En la Tabla 7 se muestran los promedios de las concentraciones observadas, durante el periodo de tiempo estudiado, correspondientes a la fracción suspendida tanto del afluente como del reactor del proceso TC de la EDAR del Carraixet.

Tabla 7. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en la fracción suspendida del afluente y reactor del proceso TC.

	Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
Afluente	OP	80	<LDD	13	24
	t-NP	1.896	<LDD	462	578
	4-NP	100	<LDD	12	31
Reactor	OP	67	<LDD	11	20
	t-NP	2.954	<LDD	479	840
	4-NP	115	<LDD	20	41

Los análisis sobre las fracciones suspendidas revelaron que las concentraciones del OP, t-NP y 4-NP presentaron elevados valores de la desviación estándar. Dado que la concentración de sólidos suspendidos en el reactor TC (entre 2 y 3 g SST/L) es aproximadamente 10 veces superior a la detectada en el afluente ($0,115\pm 0,030$ g SST/L) y la naturaleza de ambas fracciones suspendida son diferentes, las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en las fracciones suspendidas no son comparables. Sin embargo, es posible observar que en ambos casos la fracción suspendida es capaz de retener los alquilfenoles. Por otra parte, las concentraciones de EE2 detectadas estuvieron comprendidas entre el LDD y LDC, por lo que no se pudo observar la tendencia de estos microcontaminantes en la fracción suspendida. El resto de hormonas, E1 y E2 presentaron niveles de concentración inferiores al LDD.

5.3. Degradación de CDE en un biorreactor aerobio de membrana sumergida (proceso aMBR)

En este apartado se estudia el comportamiento de los CDE (OP, 4-NP, t-NP, E1, E2 y EE2) en una planta piloto basada en un biorreactor aerobio de membrana sumergida.

El comportamiento de los CDE en el biorreactor aerobio de membrana sumergida se llevó a cabo entre mayo y julio de 2009. Los parámetros operacionales de la planta fueron: TRC de 100 ± 5 d y TRH de 9 ± 1 h.

Las características promedio del agua residual de entrada al proceso aMBR durante el periodo de tiempo estudiado fueron: 310 ± 20 mg DQO/L, 135 ± 10 mg DQO_{soluble}/L, 30 ± 3 mg N-NH₄⁺/L, $4,2 \pm 1,3$ mg P-PO₄³⁻/L, 110 ± 10 mg S-SO₄²⁻/L, 12 ± 2 mg DQO/L asociada a AGV y 300 ± 40 mg CaCO₃/L de alcalinidad.

5.3.1. Fracción soluble

En la Tabla 8 se muestra el promedio de las concentraciones de la fracción soluble de OP, t-NP y 4-NP en el afluente y efluente de la planta piloto aMBR.

Tabla 8. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en la fracción soluble del afluente y efluente del proceso aMBR.

	Conc. (µg/L)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
Afluente	OP	0,034	0,020	0,027	0,010
	t-NP	0,870	0,700	0,785	0,120
	4-NP	0,080	0,047	0,064	0,023
Efluente	OP	<LDD	<LDD	n.a	n.a
	t-NP	<LDD	<LDD	n.a	n.a
	4-NP	<LDD	<LDD	n.a	n.a

En el estudio de la fracción soluble de la planta aMBR se observó como, con las condiciones operacionales descritas, ésta era capaz de eliminar completamente los CDE estudiados. Sin embargo, hay que destacar que las concentraciones observadas de cada CDE en el afluente del aMBR fueron significativamente inferiores a las determinadas en el afluente del proceso convencional (EDAR de Carraixet) y el proceso anaerobio SAnMBR, hecho que se comentará más extensamente en el siguiente apartado. Las concentraciones máximas tratadas por la planta aMBR fueron 34, 900 y 80 ng/L para OP, t-NP y 4-NP respectivamente. Por lo que las concentraciones de OP y 4-NP presentan un nivel de concentración muy cercano al límite de detección, siendo la del t-NP más elevada y, por lo tanto, presentando menor error en la medida. Respecto a las hormonas (E1, E2 y EE2), el nivel de concentración registrado en el afluente fue inferior al LDD, por lo que no fue posible estudiar el comportamiento de las mismas en este proceso.

5.3.2. Fracción suspendida

En lo referente a la fracción suspendida únicamente se detectó el t-NP en una de las muestras. En el resto de muestras estudiadas, la concentración de todos los CDE se mantuvo por debajo del LDD. Este resultado sugiere que los disruptores estudiados presentan una reducida capacidad de bioacumulación sobre el fango aerobio del sistema aMBR y bajo las condiciones operacionales descritas. Sin embargo, y debido al reducido número de muestras estudiadas, sería necesario el análisis de más muestras para comprobar la reproducibilidad del comportamiento descrito.

5.4. Degradación de CDE en un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (proceso SAnMBR)

En este apartado se estudia el comportamiento de los CDE (OP, 4-NP, t-NP, E1, E2 y EE2) en una planta piloto basada en un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR). Con el objetivo de observar el comportamiento en la fracción soluble de los disruptores bajo condiciones anaerobias, se llevó a cabo un estudio preliminar entre octubre de 2010 y mayo de 2011.

Los parámetros operacionales de la planta fueron TRC de 80 ± 15 d y TRH de 8 ± 1 h en el periodo que comprende de octubre de 2010 a enero de 2011, mientras que de febrero a mayo de 2011 el TRC se mantuvo en 80 ± 15 d, siendo el TRH de 25 ± 9 h.

Las características medias del agua residual de entrada a la planta piloto en promedio durante el periodo de tiempo estudiado fueron: 600 ± 200 mg DQO/L, 68 ± 13 mg DQO_{soluble}/L, 26 ± 6 mg N-NH₄⁺/L, $3,5 \pm 1,5$ mg P-PO₄³⁻/L, 102 ± 9 mg S-SO₄²⁻/L, 9 ± 5 mg DQO/L asociada a AGV y 310 ± 80 mg CaCO₃/L de alcalinidad.

En la Tabla 9 se muestra el promedio de las concentraciones OP, t-NP, 4-NP los disruptores en afluente y efluente en el proceso SAnMBR. Las hormonas (E1, E2 y EE2), las concentraciones determinadas en el afluente fueron inferiores al LDD, por lo que no se pudo estudiar su comportamiento.

Tabla 9. Promedio de las concentraciones en la fracción soluble del estudio preliminar del proceso SAnMBR.

	Conc. (µg/L)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
Afluente	OP	0,99	<LDD	0,213	0,312
	t-NP	4,90	<LDD	2,283	1,135
	4-NP	3,20	<LDD	0,859	1,211
Efluente	OP	1,24	<LDD	0,372	0,385
	t-NP	13,0	<LDD	6,285	4,149
	4-NP	0,50	<LDD	0,069	0,141

En los datos mostrados en la Tabla 9 de la fracción soluble se observa como la concentración de los alquilfenoles (OP y t-NP) en el efluente fue superior a la concentración en el afluente. En lo referente al 4-NP se observó el comportamiento contrario, es decir, el proceso anaerobio fue capaz de producir una eliminación parcial del 4-NP. Esto supone que el agua tratada mediante este tipo de proceso necesita un tratamiento posterior con el fin de obtener tanto una eliminación neta de OP y t-NP como una eliminación completa de 4-NP de la fracción soluble.

De forma general, un proceso anaerobio es insuficiente para obtener un efluente con concentraciones de nutrientes reducidas, por lo que es necesario un postratamiento acoplado que favorezca la eliminación de estos nutrientes. Estudios previos demostraron que la combinación de un SAnMBR y un postratamiento UCT permitía obtener un efluente con reducida concentración de materia orgánica y nutrientes (Sánchez-Ramírez et al., 2015). Estos resultados llevaron a plantear el estudio de la eliminación de los CDE en la fracción soluble y suspendida en este esquema de tratamiento. También se empleó como postratamiento un cultivo de microalgas. Estudios previos habían demostrado que un proceso basado en un cultivo de microalgas era capaz de eliminar nutrientes del efluente de un proceso anaerobio (Ruiz et al., 2012), además de permitir trabajar con elevadas concentraciones de oxígeno disuelto sin necesidad de aporte energético.

Como se ha indicado en el capítulo 1.4.1, la bibliografía indica que es posible la degradación de OP y t-NP tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias (Chang et al., 2007; Liu et al., 2008). Sin embargo, en el presente trabajo de tesis no se pudo evaluar la degradación de OP y t-NP bajo condiciones anaerobias, debido a que se trabajó con agua residual real y este agua presenta una concentración persistente de APEO que, tal y como se indica en el apartado 1.4.1 (página 60) de la introducción, se degradan bajo condiciones anaerobias a OP y t-NP.

5.4.1. Degradación de CDE en un proceso SAnMBR combinado con un postratamiento mediante sistema de fangos activados con configuración UCT

En este apartado se evalúa el comportamiento, de los disruptores OP, 4-NP, t-NP, E1, E2, EE2, Bisfenol-A (BPA) y Pentaclorofenol (PCP), en un sistema de tratamiento compuesto por un reactor de biomembranas bajo condiciones anaerobias como tratamiento secundario y un proceso de fangos activados (configuración UCT) como postratamiento (SAnMBR-UCT).

Los parámetros operacionales de ambos procesos (SAnMBR y UCT) fueron: TRC de 40 ± 5 d y TRH de 19 ± 6 h para el proceso SAnMBR y TRC de 18 ± 2 d y TRH de 13 ± 2 h, para el proceso UCT.

5.4.1.1. Fracción soluble

En la Tabla 10 se muestran las características promedio del afluente a la planta piloto SAnMBR-UCT durante el periodo objeto de estudio. Se puede observar la importante variabilidad de los SST, DBO, DQO y AGV en el afluente, lo que se puede deducir de los elevados valores de la desviación estándar asociada a cada parámetro.

Tabla 10. Características promedio del agua de entrada a la planta SAnMBR-UCT.

Parámetro		Promedio	±	s.d.
SST	mgSST/L	400	±	200
SSV	mgSSV/L	310	±	140
DQO total	mgDQO/L	900	±	400
DQO soluble	mgDQO/L	80	±	30
DBO total	mgDBO/L	510	±	70
DBO soluble	mgDBO/L	57	±	8
AGV	mgDQO/L	9	±	7
S-SO ₄	mgSO ₄ /L	107	±	13
N-NH ₄	mgN/L	34	±	8
P-PO ₄	mgP/L	4,2	±	1,0
Alcalinidad	mgCaCO ₃ /L	350	±	30

En la Tabla 11 se muestran los promedios de las concentraciones de los CDE cuantificados (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en la fracción soluble de la planta piloto SAnMBR-UCT. Las hormonas E1 y E2, así como el PCP no fueron detectados en este periodo. El EE2 fue detectado en la línea de aguas pero a nivel de LDD, por lo que no se muestra en la Tabla 11.

Las concentraciones de OP y t-NP bajo las condiciones anaerobias del proceso SAnMBR experimentaron un incremento, al igual que se observó en el apartado 5.4, dónde se estudió únicamente el módulo SAnMBR. En cambio, bajo las condiciones aerobias del proceso UCT se observó una eliminación efectiva de estos dos alquilfenoles.

Tabla 11. Promedio de las concentraciones de los disruptores detectados (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en la fracción soluble de la planta piloto SAnMBR-UCT.

	OP (µg/L)				t-NP (µg/L)			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A _{SAnMBR}	1,12	0,01	0,23	0,38	6,24	0,06	1,46	2,18
R _{SAnMBR}	3,33	0,02	0,53	1,24	9,75	0,12	3,11	3,60
A _{UCT}	3,22	0,03	0,59	1,04	10,76	0,43	3,47	3,58
R _{UCT}	0,54	<LDD	0,12	0,17	1,20	0,08	0,35	0,40
E _{UCT}	0,52	<LDD	0,07	0,17	1,10	<LDD	0,26	0,38

	4-NP (µg/L)				BPA (µg/L)			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A _{SAnMBR}	0,50	0,02	0,22	0,19	4,70	<LDD	2,14	1,54
R _{SAnMBR}	0,25	0,03	0,12	0,08	2,50	<LDD	1,17	0,84
A _{UCT}	0,04	<LDD	LDD	n.a.	1,63	<LDD	0,86	n.a.
R _{UCT}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	0,80	<LDD	LDD	n.a.
E _{UCT}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	0,65	<LDD	<LDD	n.a.

A_{SAnMBR}: Afluente del SAnMBR; R_{SAnMBR}: Reactor de SAnMBR; A_{UCT}: Afluente del UCT; R_{UCT}: Reactor de UCT y E_{UCT}: Efluente del UCT.

(n.a.). No aplicable.

Por una parte, la etapa anaerobia produce la degradación de los posibles precursores de OP y t-NP (APEO) de cadena corta presentes en el afluente, lo que ocasiona que la concentración de OP y t-NP, principales metabolitos de APEO, experimente un aumento. Por otra parte, la etapa aerobia produce la degradación de OP y t-NP, por lo que la alternancia de las etapas anaerobias y aerobias produce la eliminación conjunta de APEO y sus metabolitos (OP y t-NP). Las citadas afirmaciones se ven respaldadas por la bibliografía (Giger et al., 1984; Ying et al., 2002; Clara et al., 2005b). En la Figura 26 y la Figura 27 se observa la evolución de la concentración de OP y t-NP en la línea de aguas a lo largo de todo el proceso de la planta piloto SAnMBR-UCT. En estas figuras se observa el aumento de la concentración de OP y t-NP tras su tratamiento en un proceso anaerobio (SAnMBR) y una posterior eliminación neta tras ser tratada el agua en el proceso aerobio (UCT).

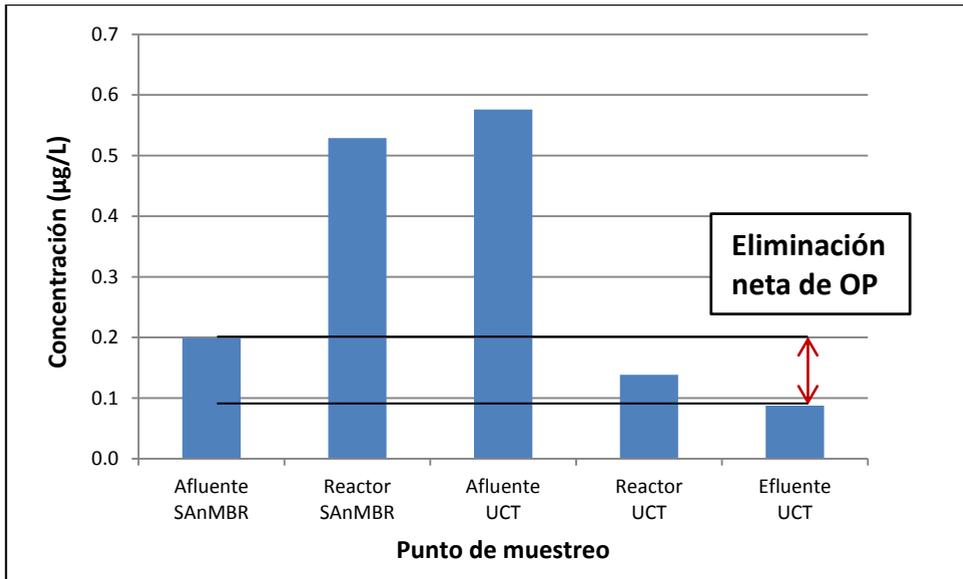


Figura 26. Evolución de la concentración de OP en la planta piloto SAnMBR-UCT.

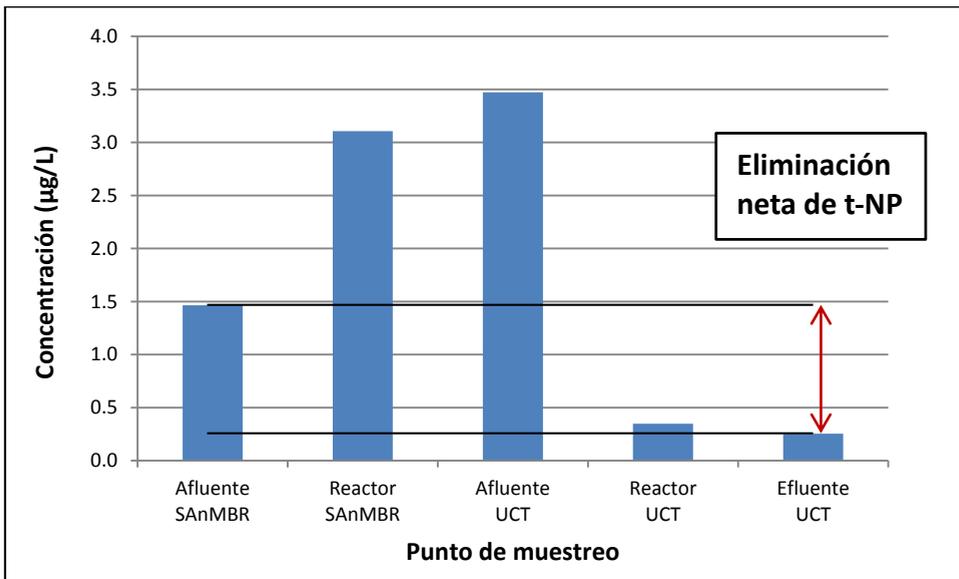


Figura 27. Evolución de la concentración de t-NP en la planta piloto SAnMBR-UCT.

Los datos de la Tabla 11 muestran que la degradación del 4-NP estuvo favorecida tanto bajo condiciones anaerobias como aerobias. En la etapa anaerobia

se produjeron importantes, aunque incompletos, rendimientos de eliminación (64 %), mientras que en la etapa aerobia se obtuvo la eliminación completa. El diferente patrón de eliminación del 4-NP respecto al OP y t-NP parece ser debido a dos motivos: por un lado, la estructura lineal del radical alifático del 4-NP le confiere un potencial de degradación más elevado (Corvini et al., 2006a; Porter et al., 2012); por otro lado, el 4-NP no forma parte de los metabolitos de degradación de los APEO (Tanghe et al., 1999; Corvini et al., 2006a; de Weert et al., 2010). Según esto, el tratamiento de agua residual bajo condiciones anaerobias produce una reducción de la concentración de 4-NP independientemente de la existencia de APEO en el medio, ya que el 4-NP no es un integrante de sus metabolitos.

Respecto al BPA, al igual que el 4-NP, los análisis revelaron elevados rendimientos de eliminación (60 %) bajo condiciones anaerobias; sin embargo, para conseguir una degradación completa es necesario un postratamiento aerobio. Esta observación se encuentra en concordancia con lo recogido en la bibliografía (Ying y Kookana 2003; Ying y Kookana 2005; Ike et al., 2006).

Las hormonas E1 y E2 mostraron concentraciones inferiores al LDD en la línea de aguas durante todo el periodo de estudio. En lo concerniente a las hormonas E1 y E2, dicho comportamiento parece ser debido a que su origen natural les confiere un elevado potencial de biodegradación.

En la Tabla 12 se puede observar la evolución de la concentración de EE2 y PCP en la planta piloto SAnMBR-UCT. La hormona sintética EE2 fue detectada a niveles de concentración comprendidos entre el LDD y LDC en el afluente del SAnMBR-UCT. El proceso anaerobio fue capaz de eliminar completamente el EE2 de la mayoría de las muestras, y en aquellas en las que no fueron eliminadas completamente presentaron una concentración próxima al LDD. El postratamiento aerobio UCT fue capaz de eliminar completamente el EE2 de los efluentes del SAnMBR en los que se detectó. Respecto al PCP, varios autores destacan el elevado rendimiento de eliminación tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Bhattacharya et al., 1995; Shen et al., 2005), lo que parece apuntar a que el PCP se degrada casi en su totalidad en las conducciones correspondientes al alcantarillado público. Dicho comportamiento produce que la concentración de PCP en el afluente de la planta piloto SAnMBR-UCT se encuentre comprendida entre LDD y LDC, siendo muy difícil

determinar su rendimiento de eliminación en la planta piloto SAnMBR-UCT. Tras el tratamiento anaerobio se produce una eliminación completa del PCP.

El caudal de entrada al proceso UCT fue del orden de 1 m³/d, por lo que una fortificación de 10 µg/L (similar a la empleada en experimentos posteriores) implicaría la adición diaria de 12 mg de cada disruptor, lo que podría alterar el proceso biológico, motivo por el cual se decidió no fortificar el afluente del UCT.

En la Tabla 12 se muestran los valores estadísticos (valor máximo, mínimo, promedio y desviación estándar) para los compuestos EE2 y PCP en los puntos de muestreo de la planta piloto SAnMBR-UCT.

Tabla 12. Promedio de las concentraciones de EE2 y PCP en la fracción soluble de la planta piloto SAnMBR-UCT.

	EE2 (µg/L)				PCP (µg/L)			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A_{SAnMBR}	0,89	<LDD	0,35	0,25	LDD	<LDD	LDD	n.a.
R_{SAnMBR}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.
A_{UCT}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.
R_{UCT}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.
E_{UCT}	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.	<LDD	<LDD	<LDD	n.a.

A_{SAnMBR}: afluente del SAnMBR, R_{SAnMBR}: reactor de SAnMBR, A_{UCT}: afluente del UCT, R_{UCT}: reactor de UCT y E_{UCT}: efluente del UCT

Los resultados obtenidos tras la observación tanto del afluente como del efluente de la línea de aguas del proceso anaerobio SAnMBR muestran la existencia de cuatro comportamientos típicos: a) bajo dichas condiciones la concentración de OP y t-NP aumenta debido a la transformación de APEO en OP y t-NP; b) el 4-NP muestra un elevado rendimiento de eliminación; c) el BPA presenta un rendimiento moderado de eliminación bajo condiciones anaerobias; d) tanto PCP como EE2 presentan eliminaciones completas tras el proceso anaerobio, aunque sus concentraciones en el afluente estuvieron muy cercanas a los LDD. Respecto a las hormonas naturales E1 y E2, éstas presentaron un nivel de concentración inferior a los LDD en todos los puntos de muestreo de la línea de aguas, por lo que no fue posible evaluar su comportamiento.

Tras la observación de los resultados obtenidos del afluente y efluente en la etapa de postratamiento UCT se observaron dos comportamientos: a) degradación parcial de OP y t-NP y b) degradación completa de 4-NP y BPA. El comportamiento del resto de CDE (PCP, E1, E2 y EE2) en el proceso UCT no se pudo analizar debido a que las concentraciones en el afluente fueron menores de los respectivos LDD.

5.4.1.2. Fracción suspendida

Las muestras que presentan fracción suspendida son el afluente al módulo SANMBR, fango del reactor SANMBR y fango del reactor UCT. El valor de los sólidos suspendidos del efluente del UCT fue muy reducido (25 mg/L), por lo que sería necesario filtrar aproximadamente 4 L de efluente para conseguir 0,1 g de muestra sólida, cantidad necesaria para su análisis (ver capítulo 5.1.2, página 124). Debido a que la naturaleza de los sólidos en el reactor y en el efluente del UCT es la misma, se considera que la concentración de CDE en la fracción suspendida del reactor y efluente también es la misma. Con el fin de determinar el comportamiento de los CDE se analizaron los fangos de ambos reactores (SANMBR y UCT), así como la fracción suspendida en el afluente.

En la Tabla 13 se muestra el promedio de las concentraciones en la fracción suspendida de los disruptores detectados a lo largo de la línea de fango de la planta piloto SANMBR-UCT.

Tabla 13. Promedio de las concentraciones de los disruptores detectados (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en la fracción suspendida de la planta piloto SANMBR-UCT.

	OP (µg/kg)				t-NP (µg/kg)			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A _{SANMBR}	31,6	22,3	27,7	4,8	500,1	297,5	428,1	113,3
R _{SANMBR}	36,5	28,6	33,4	4,2	698,4	393,9	563,1	155,0
R _{UCT}	10,2	4,7	6,9	2,9	98,2	34,7	61,6	32,9
	4-NP (µg/kg)				BPA (µg/kg)			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A _{SANMBR}	20,0	9,0	13,3	5,9	95,0	28,0	60,0	33,6
R _{SANMBR}	5,0	3,0	4,0	1,0	108,0	69,0	84,0	21,0
R _{UCT}	2,0	<LDD	1,7	0,6	98,2	25,0	44,0	16,8

A_{SANMBR}: afluente del SANMBR; R_{SANMBR}: reactor de SANMBR y R_{UCT}: reactor de UCT

Como se desprende de las concentraciones mostradas en la Tabla 13, para los fangos (R_{SANMBR} y R_{UCT}), los disruptores OP, t-NP 4-NP y BPA fueron capaces de acumularse tanto en tratamientos aerobios como anaerobios. Los resultados de la Tabla 13 muestran que el fango anaerobio presenta concentraciones de disruptores superiores a las del fango del reactor aerobio. Dicho comportamiento puede achacarse al mayor gradiente de concentración existente entre la fracción soluble y la suspendida bajo condiciones anaerobias. Bajo condiciones anaerobias, la concentración soluble de disruptor en los reactores es mayor que bajo condiciones aerobias (ver Tabla 11, página 135), lo que favorece el proceso de adsorción.

En lo que respecta a OP y t-NP, este comportamiento parece deberse a que el proceso de degradación de los APEO, bajo condiciones anaerobias, produce un aumento de la concentración de OP y t-NP en la fracción soluble, aumentando el gradiente de concentración entre la fracción soluble y suspendida y desplazando el equilibrio hacia la adsorción sobre el fango anaerobio. El elevado potencial de bioacumulación de los disruptores (los coeficientes de partición octanol-agua se encuentran comprendidos entre $10^{+4,9}$ y $10^{+5,8}$) favorece la adsorción sobre la fracción suspendida.

Respecto al 4-NP y BPA, los niveles de concentración detectados en el fango anaerobio mostraron un comportamiento similar al de OP y de t-NP, siendo la acumulación en fango anaerobio superior a la observada en fango aerobio. Los resultados de 4-NP y BPA sugieren que el proceso de degradación bajo condiciones anaerobias es menos efectivo y, al igual que lo ocurrido con OP y t-NP, el gradiente de concentración es mayor bajo condiciones anaerobias.

A la vista de los resultados se puede concluir que el gradiente de concentración de los disruptores endocrinos (OP, t-NP 4-NP y BPA) entre la fracción soluble y suspendida es un parámetro fundamental para explicar el comportamiento observado. De esta forma el gradiente de concentración entre la fracción soluble y suspendida es más elevado en un tratamiento anaerobio y el proceso de adsorción sobre el fango se muestra favorecido. En cambio, bajo condiciones aerobias esta diferencia de concentraciones es menor, disminuyendo la tendencia de estos compuestos a la adsorción.

El resto de los compuestos estudiados (E1, E2, EE2 y PCP) presentaron niveles de concentración inferiores a los LDD. Dicho comportamiento parece ser debido a la elevada biodegradabilidad de estos compuestos.

Los comportamientos observados en la fracción suspendida fueron dos: a) los disruptores OP, t-NP 4-NP y BPA tienen tendencia a la adsorción sobre fango aerobio y anaerobio, y es bajo condiciones anaerobias donde este proceso de adsorción se ve favorecido, y b) la adsorción de los disruptores que presentan elevada biodegradabilidad en la fracción soluble no es significativa.

5.4.1.3. Balance de masa a la planta piloto SAnMBR-UCT

Una vez obtenidos los datos de los CDE en la planta piloto SAnMBR-UCT se procedió al cálculo del balance de masa, cálculo necesario para verificar la consistencia de los datos. De esta manera es posible distinguir el tipo de eliminación (degradación o adsorción) experimentada por los CDE. El balance de masa empleado estuvo basado en la determinación experimental de las concentraciones de los CDE tanto en la fracción soluble como suspendida (Andersen et al., 2003; Bester, 2004; Carballa et al., 2007).

En la Figura 28 se muestran los tres subsistemas sobre los que se aplica el balance de masa. Este balance se divide entre el proceso SAnMBR, el proceso UCT y la planta completa SAnMBR-UCT.

Los CDE estudiados en este apartado son OP, t-NP, 4-NP y BPA, que son los que se han detectado a lo largo de la línea de aguas y de fango. El resto de CDE estudiados (E1, E2, EE2 y PCP) no se incluye en el balance de masa debido a las bajas concentraciones de estos a lo largo de todos los puntos de muestreo estudiados. Las concentraciones de E1, E2 y PCP en la línea de aguas y de fangos en la planta piloto SAnMBR-UCT fueron inferiores al LDD de cada compuesto, mientras que el EE2 únicamente fue detectado en el 20 % de las muestras analizadas, por lo que los resultados del EE2 no fueron representativos.

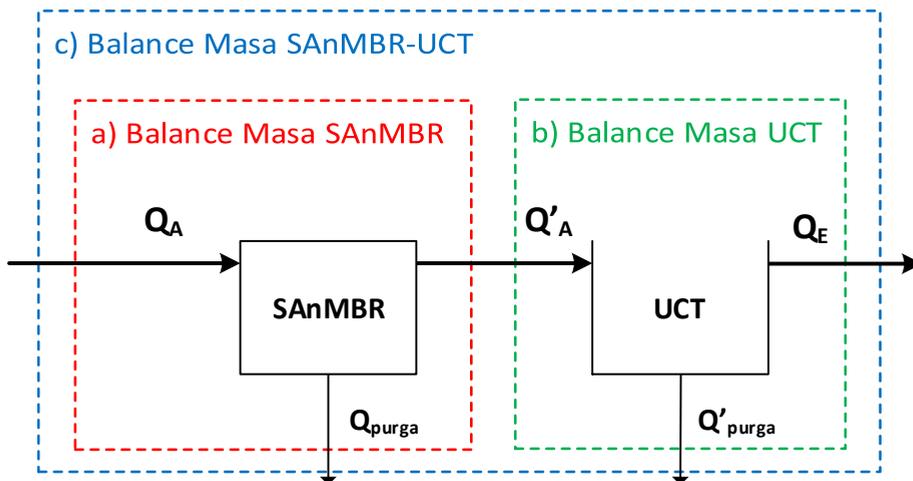


Figura 28. Esquemas sobre los que se aplican los balances de masa. Los sistemas estudiados son: a) SAnMBR, b) UCT y c) SAnMBR-UCT.

Para los cálculos correspondientes al balance de materia se ha considerado que los reactores operan en régimen estacionario. La concentración en el afluente se considera como la concentración total, y que la concentración en las fracciones suspendidas del reactor y del efluente del UCT es la misma. El caudal afluente del proceso UCT se determina como la diferencia entre el caudal afluente y la purga al proceso SAnMBR ($Q_{A(UCT)} = Q_{A(SAnMBR)} - Q_{P(SAnMBR)}$).

Los balances de masa se determinaron mediante el cálculo de los caudales másicos (F) aplicados a cada punto de muestreo. Los caudales másicos ($\mu\text{g/d}$) correspondientes al afluente (F_A), efluente (F_E) y purga (F_P) de cada proceso fueron determinados según la Ecuación 6, la Ecuación 7 y la Ecuación 8 respectivamente, que engloban los términos correspondientes a la parte soluble y suspendida. El efluente del proceso SAnMBR es un permeado por lo que no presenta fracción suspendida, y el caudal másico únicamente se aplica a la fracción soluble. Asimismo, la generación (G) de cada proceso fue determinada mediante la Ecuación 9, definida como los caudales másicos de entrada menos los de salida. La determinación del rendimiento de eliminación por el proceso de adsorción (R_{Ads}) se calcula mediante la Ecuación 10 y el rendimiento de eliminación por el proceso de degradación (R_{Deg}) mediante en la Ecuación 11. Para el caso del proceso SAnMBR, el rendimiento del proceso de adsorción se calcula como el caudal másico de

disruptor presente en la fracción suspendida de la purga, dividido entre el caudal másico de la entrada (F_A). Respecto el proceso UCT, el rendimiento del proceso de adsorción se calcula como la suma de los caudales másicos de disruptor de las fracciones suspendidas de la purga y efluente, dividido entre el caudal másico de la entrada (F_A). Por último, el rendimiento del proceso de degradación se calcula en todos los casos como la generación de cada proceso dividido entre el caudal másico de entrada al mismo (F_A).

$$F_A = Q_A \cdot (S_A + SST_A \cdot X_A) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$F_E = (Q_A - Q_P) \cdot (S_E + SST_E \cdot X_E) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$F_P = Q_P \cdot (S_R + SST_R \cdot X_R) \quad \text{Ecuación 8}$$

$$G = F_A - F_E - F_P \quad \text{Ecuación 9}$$

$$R_{Ads} = 100 \cdot \frac{\sum_{i=SA nMBR,UCT} (Q_P \cdot SST_R \cdot X_R)_i + \sum_{i=SA nMBR,UCT} (Q_E \cdot SST_E \cdot X_E)_i}{F_A} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$R_{Deg} = 100 \cdot \frac{(G)}{F_A} \quad \text{Ecuación 11}$$

donde:

- F: caudal másico de cada disruptor ($\mu\text{g/d}$)
- Q: caudal de trabajo (L/d)
- S: concentración de disruptor en la fase soluble ($\mu\text{g/L}$)
- X: concentración de disruptor en la fracción suspendida ($\mu\text{g/kg}$)
- SST: concentración de sólidos suspendidos totales (kg/L)
- G: generación ($\mu\text{g/d}$)

Subíndices:

- A: afluente
- E: efluente
- P: purga
- R: reactor
- Ads: proceso de adsorción
- Deg: proceso de degradación

La Tabla 14 muestra los resultados del balance de materia para los disruptores detectados (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en los procesos SAnMBR y UCT de forma individual y acoplados (SAnMBR-UCT). El comportamiento observado se puede evaluar mediante la generación (G) y los rendimientos de eliminación (R_{Ads} y R_{Deg}).

Tabla 14. Balance de masa correspondiente a OP, t-NP, 4-NP y BPA para la planta piloto SAnMBR-UCT

Configuración		Caudal másico ($\mu\text{g/d}$)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
SAnMBR	F_A	609,5	4.790,0	648,0	6.211,3
	F_E	1.616,2	9.744,2	47,3	2.422,5
	F_p	60,3	688,4	4,3	120,3
	G	-1.067,1	-5.642,6	596,4	3.668,5
	R_{Ads} (%)	4,8	10,4	0,5	1,2
	R_{Deg} (%)	-175,1	-117,8	92,0	59,1
	<hr/>				
Configuración		Caudal másico ($\mu\text{g/d}$)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
UCT	F_A	1.616,2	9.744,2	47,3	2.422,5
	F_E	245,8	720,1	0,1	3,1
	F_p	8,8	25,2	0,1	16,9
	G	1.361,6	8.998,9	47,1	2.402,6
	R_{Ads} (%)	0,1	0,1	0,5	0,3
	R_{Deg} (%)	84,2	92,4	99,5	99,2
	<hr/>				
Configuración		Caudal másico ($\mu\text{g/d}$)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
SAnMBR-UCT	F_A	609,5	4.790,0	648,0	6.211,3
	F_E	245,8	720,1	0,1	3,1
	F_p	69,1	713,6	4,5	137,2
	G	294,5	3.356,3	643,5	6.071,1
	R_{Ads} (%)	4,8	10,5	0,5	1,2
	R_{Deg} (%)	48,3	70,1	99,3	97,7

En el balance de masa (Tabla 14) correspondiente al proceso SAnMBR (esquema “a”, Figura 28), se observa que el valor de la generación calculado para el OP y t-NP presenta un valor negativo en el proceso SAnMBR. Dicho valor negativo indica que tras el proceso anaerobio SAnMBR se produce un incremento de ambos contaminantes. Por el contrario, la generación calculada para 4-NP y BPA fue

positiva tras el proceso SAnMBR, indicando que este proceso es capaz de provocar su eliminación. Respecto a los rendimientos de eliminación se observa como para el OP y t-NP, el rendimiento de degradación (R_{Deg}) fue negativo, indicando que el proceso SAnMBR provoca un aumento de la concentración de estos CDE en la fracción soluble. Mientras que para el 4-NP y BPA el rendimiento de degradación fue positivo, indicando que el proceso SAnMBR favorece la degradación de 4-NP y BPA. El valor de R_{Deg} para 4-NP fue superior al 90 % revelando una elevada degradabilidad para este compuesto bajo condiciones anaerobias, mientras que para el BPA el valor de R_{Deg} estuvo próximo al 60 %. Los valores de R_{Deg} para OP, t-NP, BPA y, en menor medida, 4-NP indicaron la necesidad de un postratamiento para la obtención de un efluente sin la presencia de estos disruptores.

Respecto a la eliminación por adsorción, se observa que bajo condiciones anaerobias el valor del R_{Ads} se encontró comprendido entre el 0,5 y el 10 % para los cuatro disruptores. Los valores de R_{Ads} muestran dos tipos de comportamientos: un valor moderado de R_{Ads} del 4,2 y 10,0 % para OP y t-NP, respectivamente; y valores inferiores a 1 % para 4-NP y BPA. Tal y como se ha indicado anteriormente, los resultados sugieren que bajo condiciones anaerobias el mayor gradiente de concentración potencia la adsorción sobre el fango digerido.

Respecto al 4-NP, el balance de masa confirma que este compuesto no forma parte de los metabolitos de los APEO, ya que un aumento de OP y t-NP no lleva asociado un aumento de 4-NP.

En el balance de masa (Tabla 14) correspondiente al proceso UCT (esquema "b", Figura 28), se pueden observar rendimientos de degradación elevados para los cuatro CDE detectados (OP, t-NP, 4-NP y BPA), y rendimientos de adsorción reducidos. Respecto al parámetro generación, se observa como los cuatro compuestos presentan valores positivos y próximos al caudal másico de entrada al proceso UCT (F_A), lo que indica que el postratamiento UCT estudiado produce una eliminación elevada. El 4-NP es el único compuesto que experimenta una eliminación completa del sistema UCT, bien sea por eliminación por adsorción sobre el fango o eliminación de la fracción soluble, ya que el resultado de la suma de R_{Deg} y R_{Ads} es 100 %. Respecto a los rendimientos de adsorción se observa que estos son inferiores al 1 %, indicando que tras una etapa aerobia no se ve favorecida la adsorción en el fango aerobio. Es decir, bajo condiciones aerobias, los

rendimientos de degradación ($R_{Deg} > 84 \%$) son superiores a los rendimientos de adsorción ($R_{Ads} < 0,5 \%$), lo cual muestra que bajo estas condiciones los CDE tienden a ser eliminados de la fracción soluble en lugar de quedar retenidos en el fango aerobio. Respecto al 4-NP, este es el único que presenta una eliminación completa en el proceso UCT, bien mediante el mecanismo de degradación (99,5 %) o bien mediante el mecanismo de adsorción (0,5 %).

El balance de masa correspondiente a la planta piloto SAnMBR-UCT (esquema "c", Figura 28) se llevó a cabo asumiendo que el afluente corresponde al caudal másico F_A del proceso SAnMBR, el efluente corresponde al caudal másico F_E del proceso UCT y la purga corresponde a la suma de los caudales másicos F_P tanto del proceso SAnMBR como del UCT. El balance de masa para el proceso SAnMBR-UCT muestra que esta configuración fue capaz de producir la eliminación de los CDE detectados, bien mediante un mecanismo de degradación o mediante un mecanismo de adsorción. Esta afirmación se confirmó con los valores de R_{Deg} y R_{Ads} . Para el OP y t-NP los valores de R_{Deg} fueron moderados, encontrándose comprendidos entre el 48 y el 70 %, debido principalmente al aumento de la concentración en la fracción soluble tras el proceso anaerobio SAnMBR. Para el 4-NP y BPA, los valores de R_{Deg} fueron superiores al 99 %, debido a que el 4-NP y el BPA experimentaron un mecanismo de degradación tanto en condiciones anaerobias como aerobias, haciendo que sus rendimientos de eliminación fueran más elevados que para OP y t-NP. Respecto a los rendimientos de eliminación por adsorción, estos presentaron valores más bajos comparados con la eliminación por degradación, estando comprendidos entre un 5 y un 11 % para OP y t-NP, respectivamente, mientras que para 4-NP y BPA fueron inferiores al 1 %. Estos dos comportamientos se deben fundamentalmente a la mayor retención sobre el fango anaerobio que experimentan OP y t-NP respecto a 4-NP y BPA.

En el proceso SAnMBR se puede observar como los disruptores que obtuvieron rendimientos de degradación más elevados (4-NP y BPA) presentaron rendimientos de adsorción más reducidos, mientras que para OP y t-NP se observó el comportamiento inverso. Esta observación se puede explicar con el elevado gradiente de concentración existente para OP y t-NP, y por lo tanto elevada tendencia a la retención sobre el fango anaerobio, y reducido para 4-NP y BPA en el proceso SAnMBR. En el proceso UCT se observaron elevados rendimientos de

degradación para los cuatro disruptores, por lo que el gradiente de concentración no favoreció la eliminación por adsorción.

El objetivo de un proceso de depuración es conseguir un efluente final con calidad de vertido, el cual en el proceso SAnMBR-UCT corresponde con el efluente del UCT. Para ello se calculan los rendimientos de eliminación de cada disruptor en la fracción soluble de ambos procesos, por separado (SAnMBR y UCT) y combinados (SAnMBR-UCT), según el esquema de la Figura 28. Para el cálculo del rendimiento de eliminación (R_{Elim}) se tienen en cuenta únicamente las fracciones solubles de la entrada (F_A) (Ecuación 12) y salida (F_E) (Ecuación 13). A continuación se muestran las ecuaciones empleadas para su cálculo.

$$F_A = Q_A \cdot S_A \quad \text{Ecuación 12}$$

$$F_E = (Q_A - Q_P) \cdot S_E \quad \text{Ecuación 13}$$

$$R_{Elim} = 100 \cdot \frac{(F_A - F_E)}{F_A} \quad \text{Ecuación 14}$$

En la Tabla 15 se muestran los caudales máxicos correspondientes a la fracción soluble de la planta piloto SAnMBR-UCT.

Tabla 15. Balance de masa de la fracción soluble correspondiente a OP, t-NP, 4-NP y BPA para la fracción soluble del sistema SAnMBR-UCT.

Configuración		Caudal máxico ($\mu\text{g/d}$)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
SAnMBR	F_A	570,2	4190,3	628,5	6126,7
	F_E	1616,2	9744,2	47,3	2422,5
	$R_{Elim}(\%)$	-183,4	-132,5	92,5	60,5
UCT	F_A	1616,2	9744,2	47,3	2422,5
	F_E	240,1	700,3	0,0	0,0
	$R_{Elim}(\%)$	85,1	92,8	100,0	100,0
SAnMBR-UCT	F_A	570,2	4190,3	628,5	6126,7
	F_E	240,1	700,3	0,0	0,0
	$R_{Elim}(\%)$	57,9	83,3	100,0	100,0

Los rendimientos de eliminación observados para OP y t-NP en el proceso SAnMBR indican un aumento de la concentración tras un proceso anaerobio. Respecto a BPA, se obtiene un R_{Elim} próximo al 60 %, mientras que para el 4-NP es superior al 90 %. En el proceso UCT se observan eliminaciones elevadas para los cuatro compuestos, siendo completa para el 4-NP y BPA. En el proceso global (SAnMBR-UCT) se obtienen eliminaciones en la fracción soluble para todos los compuestos. Los rendimientos de eliminación más bajos se obtienen para OP y t-NP, observándose que el proceso UCT es capaz de compensar el aumento de la concentración de estos disruptores experimentada tras el proceso SAnMBR.

5.4.2. Degradación de CDE en un proceso SAnMBR combinado con un postratamiento mediante cultivo de microalgas

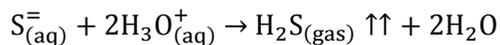
La capacidad que presentan las microalgas para la eliminación de nutrientes se encuentra demostrada por numerosos estudios, tal y como se ha indicado en capítulos anteriores. En este trabajo se ha considerado interesante estudiar la capacidad de eliminar CDE mediante un cultivo de microalgas utilizado como postratamiento de un proceso SAnMBR. Además, las microalgas estudiadas al ser organismos autótrofos fotosintéticos pueden introducir oxígeno en el proceso sin consumo energético. En consecuencia, las microalgas son capaces de generar condiciones aerobias sin necesidad del aporte de oxígeno forzado mediante un sistema mecánico como el utilizado en el sistema UCT.

El sistema propuesto para estudiar la eliminación de disruptores del agua residual consta de un fotobiorreactor a escala de laboratorio, alimentado en régimen discontinuo con el efluente del proceso SAnMBR e iluminado de forma controlada, al que se le ha inoculado un cultivo de microalgas. Tal y como se indicó en el capítulo 3.1.5 (página 100), el cultivo de microalgas se mantuvo en condiciones semicontinuas de alimentación y condiciones variables de iluminación (114 y $198 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Se ha intentado que el sistema propuesto se asemeje lo máximo posible al funcionamiento típico de un futuro reactor industrial de cultivo de microalgas. El fotobiorreactor con microalgas se plantea como un postratamiento que complementa al proceso secundario SAnMBR. Además, este postratamiento tiene lugar, tal y como se ha comentado en el párrafo anterior, sin necesidad de aporte de oxígeno, por lo que se elimina el coste económico debido

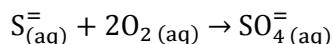
a la aireación natural producida por las microalgas. Este experimento, basado en un cultivo de microalgas iluminado artificialmente, se catalogará en apartados posteriores como "PM".

Las características químicas del afluente empleado para alimentar al fotobiorreactor de laboratorio fueron: 144 ± 5 mg DQO/L, 42 ± 6 mg DBO/L, $56,8 \pm 0,3$ mg N-NH₄⁺/L, $6,9 \pm 0,2$ mg P-PO₄³⁻/L, $12,3 \pm 0,3$ mg S-SO₄²⁻/L, 80 ± 12 mg S²⁻/L, 36 ± 4 mg CH₃COOH/L de AGV y 684 ± 110 mg CaCO₃/L de alcalinidad. Con el fin de reducir la elevada concentración de sulfuro detectada, antes de adicionar el alimento al fotobiorreactor, éste se airea durante 20 min. Es necesario eliminar el sulfuro, ya que este es una especie química corrosiva que además inhibe el crecimiento de algunas especies de microalgas (Castenholz, 1977). El sulfuro bajo una aireación constante y enérgica sufre dos procesos de eliminación:

- La agitación produce la volatilización parcial del sulfuro en forma de ácido sulfhídrico según la reacción siguiente.



- El oxígeno es capaz de oxidar el ion sulfuro a ion sulfato.



Debido al primer efecto se consigue tanto eliminar los iones hidronio y aumentar el pH del medio desde aproximadamente 6,5 hasta 8,0, como eliminar el ion sulfuro. Con el segundo proceso se elimina el ion sulfuro, transformándolo en un anión estable y poco reactivo químicamente.

En los experimentos de degradación de CDE, se estudiaron los compuestos OP, t-NP, 4-NP y BPA, detectados en el efluente del SANMBR. Estos experimentos se realizaron en un fotobiorreactor de 2 L, empleando como volumen de reacción 1,6 L, e irradiado con luz artificial. Se observó que bajo estas condiciones, las microalgas fueron capaces de generar el suficiente oxígeno como para obtener un valor de oxígeno disuelto superior al valor de saturación, establecido en 7,52 mg O₂/L, a las condiciones de trabajo (23,4±0,2 °C y 101,325 kPa). Dicha

sobresaturación pareció estar presente en todos los puntos del fotobiorreactor, ya que el crecimiento de microalgas estuvo repartido uniformemente.

Cuando se observó una concentración estable de oxígeno disuelto en el medio ($14,7 \pm 0,3$ mg O_2/L) se inició el experimento de degradación. En ese momento, y con el fin de asegurar la presencia de CDE en el fotobiorreactor al inicio del experimento, se fortificó el medio con 3,5, 15, 10 y 10 $\mu g/L$ de OP, t-NP, 4-NP y BPA, respectivamente. El nivel de fortificación elegido corresponde al observado a la salida del proceso SANMBR multiplicado por un factor de 5. Esta concentración proporciona un nivel de sensibilidad adecuado para su seguimiento mediante SPME/GC/MS y se aproxima lo suficiente a lo observado en estudios anteriores. En la Figura 29 se observa la evolución de la concentración relativa (relación entre la concentración puntual en un instante (C_t) y la concentración inicial (C_0)) de los CDE OP, t-NP, 4-NP y BPA.

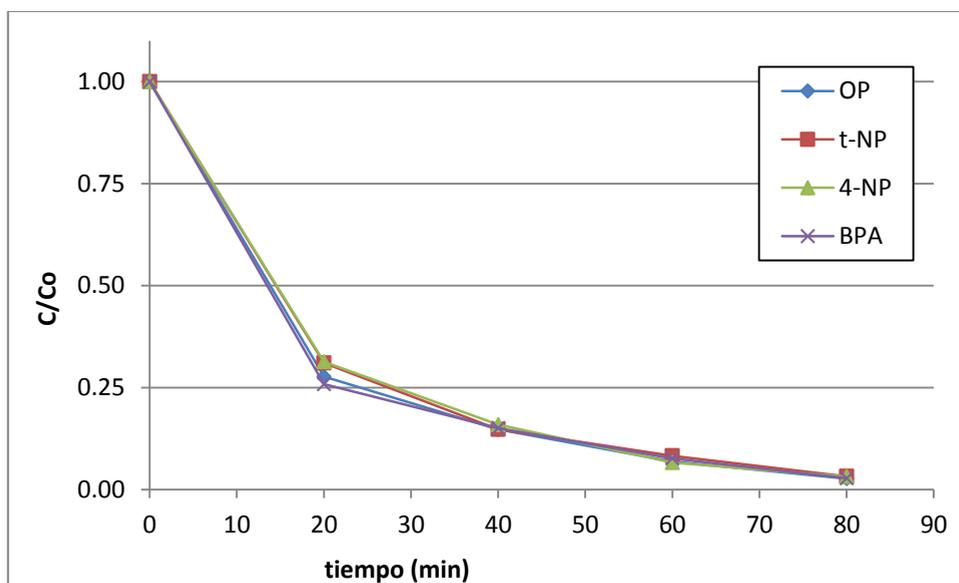


Figura 29. Evolución de la concentración de OP, t-NP, 4-NP y BPA en la fracción soluble del fotobiorreactor con cultivo de microalgas e iluminado artificialmente (experimento "PM").

Como se puede observar en la Figura 29, la degradación de OP, t-NP, 4-NP y BPA presenta un comportamiento muy similar en todos los casos. Se obtiene una

reducción superior al 50 % tras 10 minutos de tratamiento, y una degradación superior al 96 % tras los 80 minutos de tratamiento que se emplearon para realizar el experimento.

En el reactor de microalgas se observan tres posibles parámetros o elementos capaces de influir en la degradación de los CDE. Estos parámetros son la luz, el oxígeno disuelto y las microalgas. Con el fin de dilucidar la importancia de cada uno de estos parámetros sobre la degradación de los CDE, se diseñó una serie de experimentos basados en la combinación de estos parámetros.

5.4.2.1. Evaluación de la eliminación de CDE por luz, oxígeno y microalgas

Los experimentos necesarios para estudiar el efecto de la combinación de la luz (P), oxígeno (O) y microalgas (M) en la eliminación de CDE fueron diseñados según un diseño factorial. El número total de experimentos que deben llevarse a cabo empleando tres parámetros (f) a dos niveles de concentración (n) es de ocho (n^f). Sin embargo, los ocho experimentos fueron reducidos a cuatro experimentos (ver Tabla 16). Los experimentos eliminados fueron aquellos en los que, trabajando con el parámetro concentración de microalgas, estaba ausente el parámetro luz, ya que bajo estas condiciones el crecimiento de las microalgas se encuentra inhibido ("OM" y "M"). También se realizó un experimento blanco (experimento 1), el cual se corresponde con todos los parámetros mantenidos a un nivel bajo o nulo, para poder evaluar la posible degradación espontánea de los CDE.

Tabla 16. Diseño factorial empleado para estudiar los parámetros; luz (P), oxígeno disuelto (O) y microalgas (M), y el promedio de sus valores durante el experimento.

Combinación	Valor de la variables			Código		
	O (mg O ₂ /L)	P (μE/m ² ·s)	M (cells/L)	O	P	M
POM	7,9±0,4	120	(2,3±0,5)·10 ⁺¹⁰	+	+	+
PO	7,9±0,5	120	0	+	+	-
P	2,9±1,1	120	0	-	+	-
O	8,0±0,4	0	0	+	-	-
1	2,5±0,8	0	0	-	-	-

Para llevar a cabo el experimento “1”, se preparó un reactor, sin inóculo de microalgas, con 800 mL de agua pura, alimentado con 800 mL de efluente de SAnMBR. El reactor fue burbujeado con nitrógeno durante 30 min con el fin de desplazar el oxígeno disuelto de forma natural. Posteriormente dicho reactor fue fortificado con 3,5, 15, 10 y 10 $\mu\text{g/L}$ de OP, t-NP, 4-NP y BPA, respectivamente. Tal y como se ha indicado anteriormente, la fortificación elegida corresponde con 5 veces la concentración típica en el efluente de la planta piloto SAnMBR. Dicha fortificación se mantuvo a lo largo de todos los experimentos realizados con cultivos de microalgas. El reactor fue envuelto con papel de aluminio y mantenido en cámara termostatazada al abrigo de la luz. Para observar la evolución de las concentraciones de disruptores en el experimento “1” se ha representado la concentración relativa (relación entre la concentración a un tiempo determinado (C_t) y la concentración inicial (C_0)) frente al tiempo (ver Figura 30).

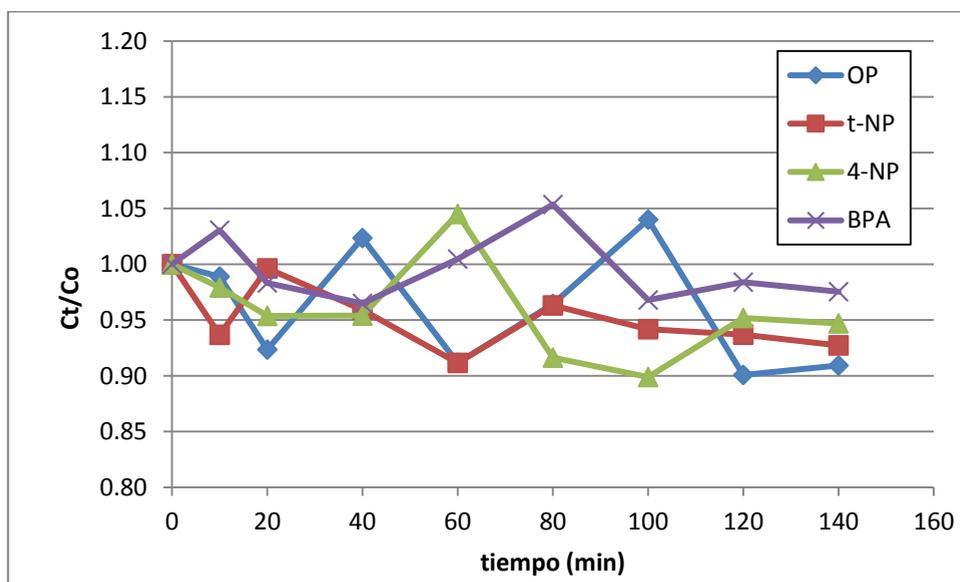


Figura 30. Evolución de la concentración relativa de disruptor (OP, t-NP, 4-NP y BPA) durante el experimento “1”.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la degradación de OP, t-NP, 4-NP y BPA en ausencia de luz, oxígeno disuelto y microalgas no es significativa. Así se observa que las concentraciones relativas de dichos CDE varían entre 0,90 y 1,05 veces la concentración inicial. Dicha variación se encuentra dentro

de la variación definida por el parámetro desviación estándar relativa del método, el cual para la fracción soluble puede variar entre el 12 y el 20 %. No obstante, se puede observar que la concentración de estos cuatro CDE muestra una tendencia descendente, lo que puede estar relacionado con la concentración de oxígeno disuelto residual (2,5 mg O₂/L).

Una vez se determinó que OP, t-NP, 4-NP y BPA no se degradaban de forma espontánea, se pusieron en marcha los experimentos descritos en el apartado 3.1.5 (ver Figura 18, página 99) para ver el efecto de los parámetros luz, oxígeno disuelto y presencia de microalgas. Los reactores se colocaron en una cámara termostatazada, manteniéndose la temperatura de trabajo controlada (23,4±0,2 °C). La mezcla final de los reactores estuvo compuesta por 800 mL del permeado del tratamiento SAnMBR, y 800 mL de un cultivo de microalgas para el experimento "POM", y 800 mL de agua pura para los experimentos "PO", "P" y "O". En la Tabla 17 se muestra las características químicas del medio para el experimento con microalgas ("POM").

Tabla 17. Características químicas del reactor "POM".

Experimento	tiempo (h)	0	24	48	72	96
	(mg SST/L)	124	233	356	562	860
POM	N-NH ₄ ⁻ (mg/L)	35,74	34,92	23,33	13,94	12,97
	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,48	0,22	0,28	0,24	0,40
	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	1,09	1,01	1,60	1,19	1,37
	P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	3,33	2,68	0,94	0,03	0,03
	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	146,07	n.d.	344,50	247,03	279,63

En la Tabla 18 se muestra la concentración de oxígeno disuelto presente en los cuatro experimentos.

Tabla 18. Concentraciones de oxígeno disuelto.

	tiempo (h)	0	24	48	72	96
	POM		7,6	8,5	7,9	7,5
P	OD (mg O ₂ /L)	1,8	1,8	3,1	3,5	4,2
PO		7,5	8,4	7,8	7,5	8,4
O		8,1	7,8	7,5	8,0	8,6

Considerando que la concentración de saturación de oxígeno disuelto a $23,4 \pm 0,2$ °C y 101,325 kPa (temperatura y presión de trabajo) es de $7,52$ mg O_2/L (Lide, 2012), se puede observar que el medio de reacción a tiempo cero, para los experimentos con aireación forzada, se encuentra bajo condiciones ligeramente sobresaturadas de oxígeno disuelto.

Con el fin de eliminar la presencia de oxígeno en el reactor del experimento "P", se burbujeó nitrógeno durante 30 min antes de comenzar el experimento. El promedio de la concentración de oxígeno disuelto residual se mantuvo en $2,9 \pm 1,8$ mg O_2/L (Tabla 16). En la Figura 31, la Figura 32, la Figura 33 y la Figura 34 se muestran la evolución de las concentraciones relativas de OP, t-NP, 4-NP y BPA respectivamente, bajo las condiciones experimentales especificadas.

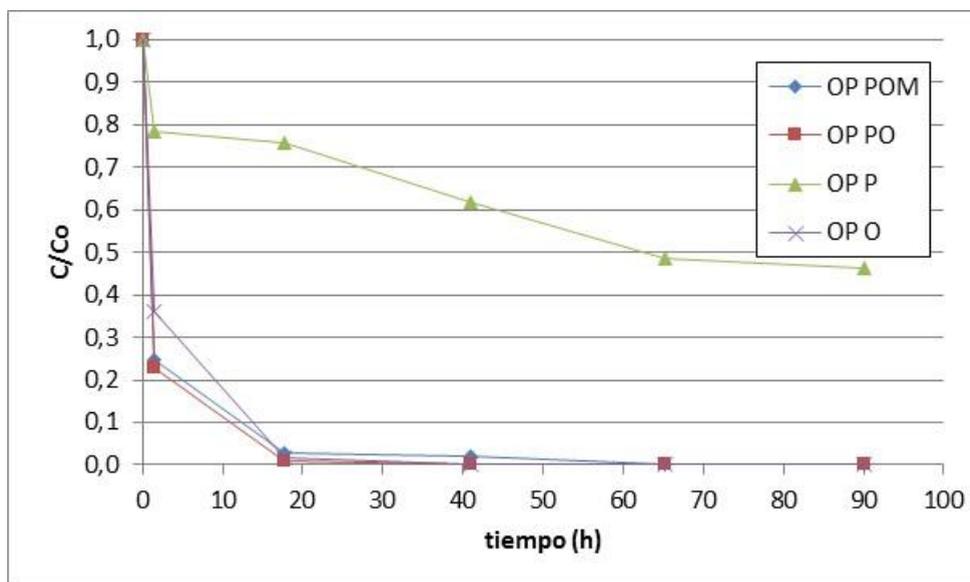


Figura 31. Efecto sobre la degradación de OP en la fracción soluble de los experimentos "POM", "PO", "P" y "O".

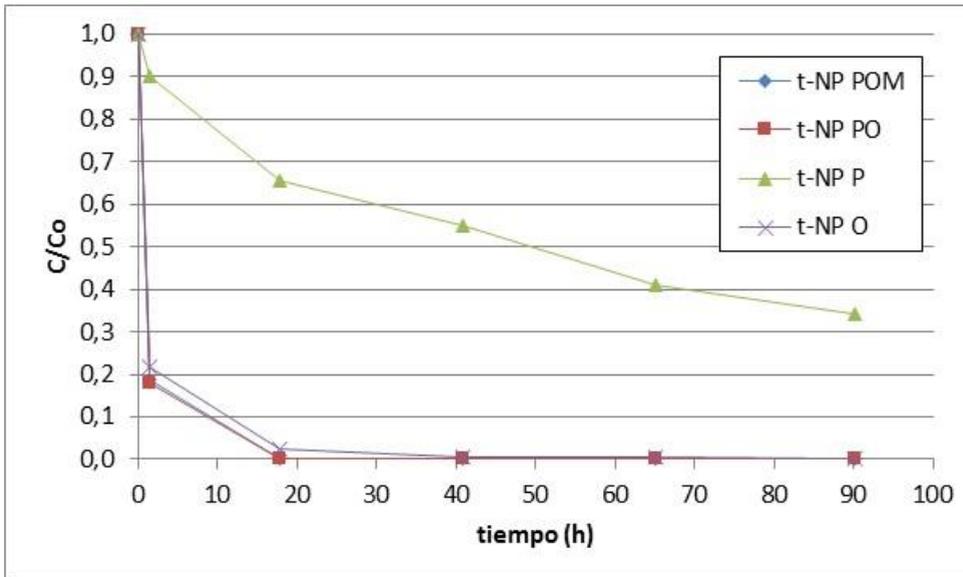


Figura 32. Efecto sobre la degradación de t-NP en la fracción soluble de los experimentos "POM", "PO", "P" y "O".

Para los disruptores OP y t-NP, la comparación de la Figura 31 y la Figura 32 sugiere que en presencia de aireación forzada, experimentos "POM", "PO" y "O", se obtienen rendimientos de eliminación más elevados que en su ausencia, experimento "P". Bajo aireación forzada los rendimientos de eliminación fueron, tras 90 h de exposición, superiores al 99 % para ambos disruptores, mientras que sin aireación los rendimientos se redujeron hasta un 54 % y un 66 % para OP y t-NP, respectivamente. Estos resultados sugieren que el OP es ligeramente más resistente a la degradación que el t-NP.

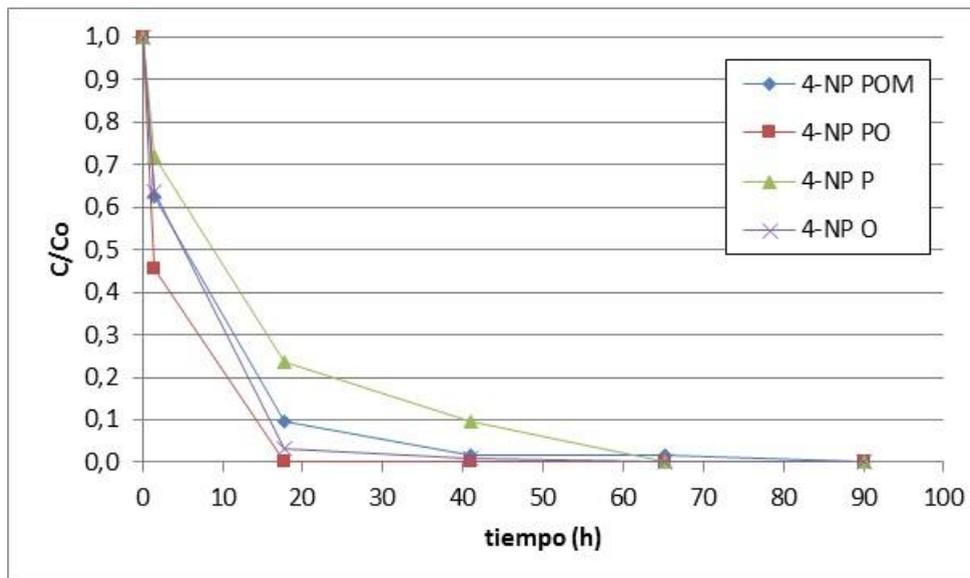


Figura 33. Efecto sobre la degradación de 4-NP en la fracción soluble de los experimentos “POM”, “PO”, “P” y “O”.

En la Figura 33 se observa el comportamiento del 4-NP bajo las cuatro configuraciones estudiadas. Los datos presentan la misma tendencia descrita para OP y t-NP, donde el experimento sin aireación forzada muestra una degradación menor que los experimentos con aireación forzada. Sin embargo, esta configuración (“P”) presenta una degradación más elevada en comparación con el resto de disruptores, siendo el único disruptor que se degrada completamente tras 90 h de exposición sin aireación forzada. Dicho comportamiento puede explicarse en base a que el 4-NP puede experimentar mecanismos de degradación tales como la ω - y β - oxidación o ipso- sustitución, mientras que el resto de alquilfenoles, al tener la cadena alifática compuesta por carbonos protegidos, secundarios y terciarios fundamentalmente, son menos reactivos (Corvini et al., 2006a; Porter et al., 2012).

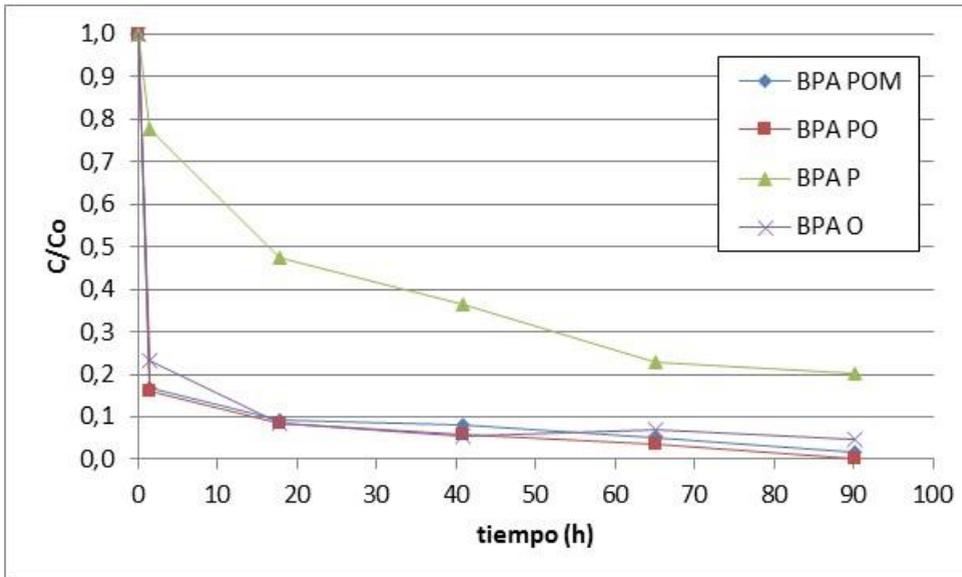


Figura 34. Efecto de sobre la degradación de BPA, en la fracción soluble de los experimentos "POM", "PO", "P" y "O".

En la Figura 34 se muestran los resultados para el BPA bajo las cuatro configuraciones estudiadas. Al igual que con los disruptores anteriormente citados, se observa como los experimentos con aireación forzada presentan una eliminación superior al experimento sin aireación. Tras 90 h, el experimento "O" presenta un rendimiento de eliminación del 95 %, el cual es inferior al resto de disruptores (superior al 99 %). Respecto al experimento sin aireación forzada ("P"), el BPA presenta una degradación superior al observado para el OP y t-NP. La degradación para BPA sin aireación forzada es del 80 %, sin embargo para el OP y t-NP la degradación es inferior al 66 %. Los resultados sugieren que el BPA es más sensible a la degradación mediante luz, pero menos frente al oxígeno. Sin embargo, para los experimentos con luz y aireación ("POM" y "PO"), los cuatro disruptores presentan un comportamiento similar.

Los resultados mostrados en la Figura 31, la Figura 32, la Figura 33 y la Figura 34 indican que la degradación observada con el experimento "P" es menos efectiva que las observadas en los experimentos "POM", "PO" y "O", a excepción del 4-NP, para el cual no se observa una disminución muy significativa en el rendimiento de eliminación bajo estas condiciones. Los rendimientos de eliminación para el 4-NP

son ligeramente más reducidos para el experimento “P” que para los experimentos “POM”, “PO” y “O”, aunque la degradación, observada tras 90 h de exposición, es próxima al 100 % en los cuatro casos. Dicha observación está de acuerdo con la bibliografía, la cual sugiere que el oxígeno es necesario para atacar tanto el anillo aromático como la cadena alquílica (Cerniglia, 1992; Semple y Cain, 1996; Corvini et al., 2006a; Lika y Papadakis, 2009; Porter et al., 2012), mientras que la luz produce una pobre eliminación. El resto de disruptores, bajo condiciones de aireación forzada, alcanzan rendimientos de eliminación próximos al 100 %, mientras que sin aireación los rendimientos de eliminación para OP, t-NP y BPA se encuentran comprendidos entre el 55 y 80 %, y el 100 % para 4-NP.

5.4.2.2. Balance de masa al cultivo de microalgas

Al igual que en el apartado anterior (5.4.1.3), el cálculo del balance de masa se lleva a cabo mediante la determinación de forma experimental de las concentraciones en las fracciones soluble y suspendida.

Tras la finalización de los experimentos (90 h), las fracciones suspendidas de los experimentos “POM” y “PM” fueron recogidas y separadas por centrifugación de la fracción soluble para el análisis. Los experimentos “PO”, “O” y “P” carecen de fracción suspendida, por lo que únicamente se analiza la fracción soluble.

Los balances de masa, adecuados a un proceso en discontinuo, se determinaron mediante el cálculo de la masa de cada CDE en cada corriente a partir de los resultados analíticos. La masa en el afluente (M_A) se aproximó al valor de fortificación, en masa (μg), de cada disruptor (5,6, 24, 16 y 16 μg de OP, t-NP, 4-NP y BPA respectivamente) (ver Ecuación 15). La masa en el efluente (M_E) se calculó como la suma de la masa de cada CDE en la fracción soluble y suspendida (ver Ecuación 16). La generación (G) de cada proceso fue determinada mediante la Ecuación 17, definida como la masa de la entrada menos la de salida. La determinación del rendimiento de eliminación por un proceso de adsorción (R_{Ads}) se define según la Ecuación 18 y el rendimiento de eliminación por degradación (R_{Deg}) queda definido según la Ecuación 19.

$$M_A = V \cdot S_A \quad \text{Ecuación 15}$$

$$M_E = V \cdot (S_E + SST \cdot X) \quad \text{Ecuación 16}$$

$$G = M_A - M_E \quad \text{Ecuación 17}$$

$$R_{\text{Ads}} = \frac{(V \cdot SST \cdot X)}{M_A} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 18}$$

$$R_{\text{Deg}} = \frac{(M_A - (V \cdot S_E - V \cdot SST \cdot X))}{M_A} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 19}$$

donde:

- M: masa de CDE (μg)
- V: volumen de reacción (L)
- S: concentración de CDE en la fase soluble ($\mu\text{g/L}$)
- X: concentración de CDE en la fase suspendida ($\mu\text{g/kg}$)
- SST: concentración de sólidos suspendidos totales en los experimentos "POM" y "PM" (kg/L)

Subíndices:

- A: afluyente
- E: efluente
- Ads: proceso de adsorción
- Deg: proceso de degradación.

En la Tabla 19 se muestra el balance de masa de cada disruptor, así como los resultados de los rendimientos de eliminación mediante el proceso de adsorción y de degradación obtenido para los experimentos de degradación de CDE en discontinuo.

Tabla 19. Balance de masa para las configuraciones de luz, oxígeno disuelto y microalgas estudiadas.

Configuración	muestra	Masa determinada de CDE (µg)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
POM	M _A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M _E	0,07	0,54	0,01	0,91
	G	5,53	23,46	15,99	15,09
	R _{Ads} (%)	1,05	2,23	0,06	4,17
	R _{Deg} (%)	98,80	97,76	99,94	94,31
PM	M _A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M _E	0,14	0,81	0,02	0,94
	G	5,46	23,19	15,98	15,06
	R _{Ads} (%)	0,38	0,69	0,03	1,32
	R _{Deg} (%)	98,46	98,33	99,97	97,36
PO	M _A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M _E	0,001	0,004	0,000	0,029
	G	5,6	24,0	16,0	16,0
	R _{Deg} (%)	99,98	99,98	100,00	99,82
P	M _A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M _E	2,6	8,2	0,0	3,2
	G	3,0	15,8	16,0	12,8
	R _{Deg} (%)	53,8	66,0	100,0	79,8
O	M _A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M _E	0,0005	0,0074	0,0000	0,1013
	G	5,6	24,0	16,0	15,9
	R _{Deg} (%)	99,99	99,97	100,00	99,37

Como se puede observar en los datos referentes a los experimentos “POM” y “PM”, la eliminación de cada disruptor por el proceso de adsorción es muy reducida con respecto al proceso de eliminación por degradación (menor al 3 %). Asimismo, se puede observar como el rendimiento del proceso de adsorción sigue el orden 4-NP < OP < t-NP < BPA, mientras que el proceso de degradación sigue el patrón inverso, BPA < t-NP \cong OP < 4-NP. La explicación a dicha observación radica en el

gradiente de concentración generado entre la fracción soluble y la suspendida y en el elevado valor de K_{ow} . Los resultados sugieren que una menor eliminación en el proceso de degradación produce que el equilibrio de adsorción/desorción se desplace hacia la retención del disruptor en la fase suspendida, ya que el valor del gradiente de concentración es mayor. Además, el elevado valor de K_{ow} (comprendido entre $10^{+3,6}$ y $10^{+5,8}$) favorece la retención sobre la fracción suspendida. Por tanto, una menor eliminación por degradación en la fase soluble produce una mayor eliminación por adsorción en la fase suspendida.

El resto de experimentos en condiciones de aireación forzada (“PO” y “O”) produjeron rendimientos de eliminación por degradación superiores al 94 % para todos los CDE estudiados. En ausencia de aireación (“P”), por su parte, los rendimientos obtenidos estuvieron comprendidos entre 54 y 100 %, tras 90 h de exposición.

Comparando los valores de los experimentos aerobios (“POM”, “PM”, “PO” y “O”), se observa en la Tabla 19 que los rendimientos de degradación son ligeramente inferiores en presencia de microalgas (“POM” y “PM”). Dicha afirmación parece deberse a que las microalgas impiden parcialmente la penetración de la luz en el reactor, así como la existencia del proceso de adsorción como vía alternativa de eliminación de disruptores, esta vía no está presente en los experimentos “P” y “PO”. Aunque los reactores con microalgas (“POM” y “PM”) presentan eliminación por adsorción, sus valores son inferiores a los proporcionados por el parámetro luz obtenido del experimento “P”.

A la vista de los resultados obtenidos se puede observar que los disruptores estudiados (OP, t-NP, 4-NP y BPA) pueden ser degradados bajo la influencia de los parámetros luz, oxígeno disuelto y microalgas. Se observó como la degradación de los disruptores fue superior al 94 % bajo condiciones de aireación forzada (“POM”, “PO” y “O”), empleando 90 h de exposición. Sin aireación (“P”), los rendimientos de eliminación estuvieron comprendidos entre un 53 y un 80 %, excepto para el 4-NP, el cual fue degradado completamente.

Se ha evaluado la eliminación de disruptor en la fracción soluble en cada uno de los experimentos “POM” y “PM”, determinando el rendimiento de eliminación

(R_{Elim}). Para su cálculo se tienen en cuenta únicamente las fracciones solubles de las entradas (M_A) y salidas (M_E) según la Ecuación 20 y la Ecuación 21, respectivamente.

$$M_A = V \cdot S_A \quad \text{Ecuación 20}$$

$$M_E = V \cdot S_E \quad \text{Ecuación 21}$$

$$R_{Elim} = \frac{(M_A - M_E)}{M_A} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 22}$$

En el caso de los experimentos sin fracción suspendida (“PO”, “P” y “O”), R_{Deg} corresponde a R_{Elim} . En la Tabla 20 se muestra los rendimientos de eliminación (R_{Elim}) en los experimentos “POM” y “PM”.

Tabla 20. Balance de masa de la fracción soluble correspondiente a OP, t-NP, 4-NP y BPA en los experimentos “POM” y “PM”.

		Masa determinada de CDE (μg)			
		OP	t-NP	4-NP	BPA
POM	M_A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M_E	0,01	0,00	0,00	0,24
	R_{Elim} (%)	99,8	100,0	100,0	98,5
PM	M_A	5,6	24,0	16,0	16,0
	M_E	0,06	0,23	0,00	0,21
	R_{Elim} (%)	98,8	99,0	100,0	98,7

En la Tabla 20 se observa como los rendimientos de eliminación son muy similares en ambos experimentos, llegándose a eliminaciones completas para el t-NP en el experimento “POM” y para el 4-NP en ambos experimentos.

5.4.2.3. Cinética de degradación de CDE

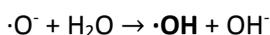
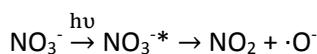
Los resultados mostrados en los apartados 5.4.2.1 y 5.4.2.2, así como la revisión bibliográfica, indican que la degradación de los disruptores, se debe fundamentalmente a tres mecanismos: oxidación química, biodegradación y adsorción (Stasinakis et al., 2005; Writer et al., 2012). Sin embargo, bajo las condiciones de trabajo de un cultivo de microalgas, el mecanismo de degradación

oxidativa se ve potenciado respecto a los otros dos. Este mecanismo de oxidación se puede dividir en dos sub-mecanismos: por oxígeno disuelto y por radicales libres (Lam et al., 2003; Jacobs et al., 2008). En el presente apartado se desarrollarán las cinéticas de oxidación por oxígeno disuelto y por radicales libres.

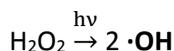
En el caso del oxígeno, éste es un agente oxidante aportado al medio de reacción bien por aireación forzada, por reaireación con la atmósfera o bien por oxigenación con microalgas.

En el caso de la oxidación por luz es una especie radicalaria el agente que produce la oxidación de los disruptores tras la irradiación. Las vías más comunes para la formación de radicales libres son las reacciones fotoquímicas. En estas reacciones, la energía lumínica es capaz de excitar especies químicas tales como ion nitrato, peróxido de hidrógeno o los grupos cromóforos de materia orgánica disuelta, generando radicales libres como productos de reacción. Los radicales libres más comunes son: el **radical hidroxilo** ($\cdot\text{OH}$), el **radical carbonato** ($\cdot\text{CO}_3^-$) y el **radical peróxido** ($\cdot\text{OOH}$).

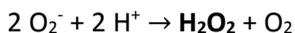
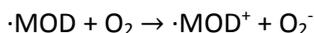
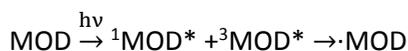
- La formación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se produce a través de tres mecanismos: por irradiación del ion nitrato, del peróxido de hidrógeno y de la materia orgánica.
 - La vía de formación del radical hidroxilo, a través de la irradiación del ion nitrato, se encuentra explicada en la bibliografía (Zepp et al., 1987). En ella se describe como el ion nitrato es capaz de excitarse mediante irradiación de energía lumínica (longitud máxima absorción de 302 nm) y éste a su vez se degrada en dióxido de nitrógeno y en el radical del oxígeno atómico ($\cdot\text{O}^-$). Rápidamente, el radical $\cdot\text{O}^-$ se protona a su ácido conjugado ($\cdot\text{OH}$) mediante la reacción con una molécula de agua. A continuación se muestran las reacciones comentadas:



- Respecto a la reacción de formación de este radical mediante la molécula de peróxido de hidrógeno, éste requiere irradiación con una longitud de onda inferior a 360 nm. La reacción química de escisión se muestra a continuación (Zuo, 2003):



- La tercera vía de formación del **radical hidroxilo** es mediante la excitación de materia orgánica disuelta (MOD) por irradiación en presencia de oxígeno. La reacción química general se muestra a continuación (Dalrymple et al., 2010):

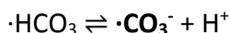
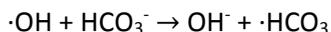
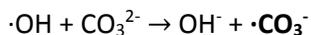


La última de estas reacciones presenta como producto el peróxido de hidrógeno, el cual, tal y como se ha indicado en párrafos anteriores, en presencia de luz es capaz de producir radical hidroxilo.

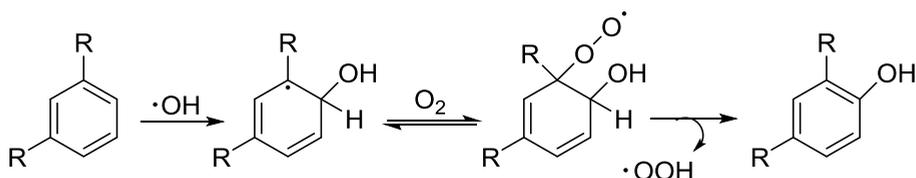
La contribución a la concentración de radical hidroxilo por reacción de peróxido de hidrógeno o materia orgánica es reducida respecto a la reacción del ion nitrato, ya que el peróxido de hidrógeno presenta más tendencia a experimentar reacciones redox frente a las radicalarias descritas.

- El **radical carbonato** ($\cdot\text{CO}_3^-$) es un radical secundario, ya que se forma a partir de una especie radicalaria existente en el medio. Su formación se produce por reacción de los aniones carbonato y bicarbonato con el radical hidroxilo, sin ser necesaria la participación de la luz. Este comportamiento se debe a que el radical hidroxilo es muy reactivo y poco selectivo, por lo que es capaz de producir tanto la oxidación de especies presentes en el

medio como la formación de otros radicales. La reacción química se muestra a continuación (Neta et al., 1988):



- Respecto a la formación del **radical de peróxido** ($\cdot\text{OOH}$), el cual también es un radical secundario, se lleva a cabo en tres etapas: la reacción entre el radical hidroxilo y la materia orgánica disuelta con enlaces carbono-carbono insaturados, la reacción del oxígeno con el intermedio radicalario formado y, por último, la escisión de un grupo peróxido radicalario ($\cdot\text{OOH}$). A continuación se muestra un ejemplo de este tipo de reacción (Pocostales et al., 2010).



En las reacciones explicadas anteriormente intervienen tanto moléculas excitadas (NO_3^{*-} , $^1\text{MOD}^*$, $^3\text{MOD}^*$) como radicales libres ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}^-$, $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{CO}_3^-$). Mientras que las primeras son moléculas que presentan al menos un electrón con uno o más números cuánticos mayores que el mínimo posible, los radicales libres son átomos o moléculas con electrones desapareados. La reactividad de los radicales libres es químicamente mayor a la de las moléculas excitadas.

Estudios bibliográficos indican que tanto el radical peróxido como el radical carbonato presentan un potencial de oxidación menor al del radical hidroxilo, debido a que reaccionan de forma selectiva con compuestos orgánicos sulfurados (Lam et al., 2003).

Asimismo, los trabajos de Li et al. (2008) indican que las microalgas son capaces de secretar peróxido de hidrógeno que, tal y como se ha indicado en párrafos anteriores, en presencia de luz es una fuente de radical hidroxilo.

El agua residual empleada en los experimentos descritos en este apartado procede del efluente de un proceso anaerobio de membranas (SAnMBR), el cual presenta una elevada concentración de amonio que bajo las condiciones aerobias de un cultivo de microalgas sufre un proceso de nitrificación. Tal y como se indica en la Tabla 22 y Tabla 26 (páginas 170 y 178), el intervalo de concentración de ion nitrato en los reactores con cultivo de microalgas (“POM y “PM”) se encuentra entre 0,5 y 3,5 mg N-NO₃⁻/L.

Respecto a la materia orgánica disuelta, el análisis de DQO indica que el intervalo de concentración se encuentra comprendida entre 60 y 140 mg O₂/L. Experimentos previos muestran que este valor de DQO corresponde principalmente a materia orgánica soluble no biodegradable, la cual no es metabolizada por el cultivo de microalgas, por lo que la concentración de materia orgánica disuelta se mantiene prácticamente constante durante los experimentos (Ruiz et al., 2012).

Estos valores, junto con todo lo expuesto anteriormente, sugieren que la formación de radical hidroxilo a partir de ion nitrato y materia orgánica disuelta puede ser la vía mayoritaria en la formación de especies radicalarias en el estudio realizado en esta tesis. Existen trabajos que emplean la formación de radical hidroxilo a partir de nitrato como técnica de eliminación de fármacos en efluentes de tratamientos secundarios aerobios (Ryan et al., 2011, Bahn Müller et al., 2014). Las concentraciones de nitrato estudiadas por estos autores oscilan entre 0,4 y 16,5 mg N-NO₃⁻/L.

Una vez definidos los agentes oxidantes que pueden intervenir en las reacciones de degradación de CDE, cabe especificar la cinética de degradación de estas reacciones. Se han publicado muchos estudios que asumen una cinética química de primer orden respecto a la concentración de CDE (Stasinakis et al., 2008; Writer et al., 2012). En el presente trabajo se ha considerado una cinética de degradación de segundo orden, la cual está basada en órdenes parciales igual a uno con respecto al agente oxidante y al CDE. Los oxidantes estudiados (O₂ y ·OH) tienen mecanismos de degradación independientes, por lo que las cinéticas de degradación estudiadas pueden ser descritas como la suma de cada cinética individual. La cinética global del proceso puede expresarse según la Ecuación 23.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_{O_2} \cdot [O_2] \cdot [A] + k_{\cdot OH} \cdot [\cdot OH] \cdot [A] \quad \text{Ecuación 23}$$

donde:

- [A]: concentración de disruptor (mol/L)
- [O₂]: concentración de oxígeno disuelto (mol/L)
- [·OH]: concentración de radical hidroxilo (mol/L)
- k_{O₂}: constante de cinética de segundo orden correspondiente al oxígeno (L·mol⁻¹·min⁻¹)
- k_{·OH}: constante cinética de segundo orden correspondiente al radical hidroxilo (L·mol⁻¹·min⁻¹).

La Ecuación 23 sugiere que la degradación transcurre mediante dos mecanismos paralelos. Con el fin de simplificar los experimentos y el cálculo matemático, la Ecuación 23 puede ser transformada de una cinética de segundo orden a una cinética de pseudo-primer orden, para ambos agentes oxidantes. La cinética de pseudo-primer orden se puede aplicar manteniendo una concentración constante de agente oxidante en ambos casos. De esta forma, las constantes cinéticas se pueden describir según la Ecuación 24.

$$k'_i = k_i \cdot [\text{Oxidante}]_{EE} \quad \text{Ecuación 24}$$

donde;

- [Oxidante]_{EE}: concentración en estado estacionario del agente oxidante (mol/L)
- k_i: constante cinética de segundo orden para cada mecanismo de degradación (L·mol⁻¹·min⁻¹)
- k'_i: constante cinética de pseudo-primer orden para cada mecanismo de degradación (min⁻¹)

Por lo tanto, la constante observada experimentalmente se puede expresar como la suma de cada constante de pseudo-primer orden (Ecuación 25).

$$k_{obs} = k'_{O_2} + k'_{\cdot OH} = k_{O_2} \cdot [O_2] + k_{\cdot OH} \cdot [\cdot OH] \quad \text{Ecuación 25}$$

donde:

- k_{obs}: constante de velocidad observada (suma de ambas pseudo-constantes) (min⁻¹)

Por lo tanto, empleando la Ecuación 24 y la Ecuación 25, la Ecuación 23 se puede simplificar en la Ecuación 26.

$$r = -\frac{d[A]}{dt} = (k'_{O_2} + k'_{OH}) \cdot [A] \quad \text{Ecuación 26}$$

De este modo, la ecuación de velocidad integrada se puede expresar como:

$$\text{Ln} \frac{[A]_t}{[A]_0} = k_{obs} \cdot t \quad \text{Ecuación 27}$$

Asimismo, el tiempo requerido para que la concentración de disruptor se reduzca a la mitad de su valor inicial se denomina tiempo de vida media de la reacción ($t_{1/2}$), y puede ser empleado como parámetro de calidad en la determinación de la ley de velocidad.

Sustituyendo en la Ecuación 27 $[A]_t$ por $\frac{1}{2}[A]_0$ y t por $t_{1/2}$ se obtiene que el producto de la constante cinética por el tiempo de vida media equivale a un valor constante ($\ln 2$). Los tiempos de vida media (min) para cada CDE se pueden expresar según la Ecuación 28.

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{(k'_{O_2} + k'_{OH})} \quad \text{Ecuación 28}$$

5.4.2.3.1. Cinética de degradación en los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “P”

Como se ha indicado en el apartado anterior, las cinéticas de degradación de los distintos disruptores se pueden explicar como cinéticas de oxidación. En el presente apartado se detallan los pasos seguidos para la determinación de las leyes cinéticas de degradación de disruptores por oxígeno y luz. Al igual que en el apartado 5.4.2.1, se plantearon nuevos experimentos basados en el mismo diseño factorial mostrado en la Tabla 21.

En estos experimentos, las características químicas del afluyente empleado para alimentar los fotobiorreactores fueron: $63,6 \pm 0,2$ mg DQO/L, 39 ± 4 mg DBO/L, $46,3 \pm 0,6$ mg $N-NH_4^+$ /L, $6,2 \pm 0,2$ mg $P-PO_4^{3-}$ /L, $14,3 \pm 0,3$ mg $S-SO_4^{2-}$ /L,

$109 \pm 8 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$, $665 \pm 10 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ de alcalinidad. En el afluente empleado en estos experimentos no se detectaron AGV.

Tabla 21. Diseño factorial empleado para estudiar cinética de degradación de OP, t-NP, 4-NP y BPA.

Combinación	Valor de las Variables			Código		
	O (mg O ₂ /L)	P (μE/m ² ·s)	M (cel/L)	O	P	M
POM	8,65±0,15	135	$(2,1 \pm 1,6) \cdot 10^{+09}$	+	+	+
P	1,7±0,2	135	0	-	+	-
PO	8,15±0,11	135	0	+	+	-
O	8,11±0,12	0	0	+	-	-

En los experimentos “POM”, “PO” y “O” la concentración de OD se mantuvo constante en torno a $8 \text{ mg O}_2/\text{L}$, aireando mediante difusores ubicados en el fondo de los reactores. El reactor “P” se burbujeó con nitrógeno durante 30 minutos con el fin de eliminar el oxígeno disuelto. Al igual que en los experimentos “POM”, “PO” y “O”, la concentración de OD también se mantuvo constante en el experimento “P”. Respecto al radical hidroxilo, éste se controló indirectamente mediante la medida de su precursor, el ion nitrato que se midió diariamente. En el reactor etiquetado como “POM”, el ion nitrato presentó una concentración promedio de $2,8 \pm 0,6 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$, mientras que la concentración observada de este ion en los experimentos “PO”, “O” y “P” fue de $0,88 \pm 0,19$, $0,81 \pm 0,19$ y $1,0 \pm 0,2 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$, respectivamente.

Las reducidas desviaciones estándar en los valores de concentración de oxígeno disuelto (ver Tabla 21), y las variaciones del nitrato expuestas anteriormente, indican que puede considerarse constante en el medio de reacción, por lo que la cinética se puede simplificar a pseudo-primer orden.

La evolución de las características químicas del reactor con microalgas (“POM”) se muestra en la Tabla 22, observándose cómo durante las 72 h de duración del experimento la biomasa existente es capaz de producir una eliminación de nutrientes. Se observa una eliminación efectiva de amonio y fosfato, sin embargo la eliminación de nitrito y nitrato no es significativa. La evolución de los sólidos

suspendidos totales se empleó como indicador del crecimiento de las microalgas, viéndose incrementado este parámetro desde 71 hasta 180 mg SST/L.

Tabla 22. Evolución de los parámetros químicos del reactor “POM”.

tiempo (h)	0	24	48	72
mg SST/L	71	117	123	180
mg N-NH ₄ ⁺ /L	41,21	39,75	32,93	23,09
mg N-NO ₂ ⁻ /L	2,25	2,18	1,96	1,74
mg N-NO ₃ ⁻ /L	3,26	3,33	2,43	2,10
mg P-PO ₄ ³⁻ /L	6,32	5,90	4,29	0,00

En la Tabla 23 se puede observar el seguimiento microbiológico realizado sobre el reactor “POM” a partir de los recuentos de diatomeas, *chlorophyceae* y *cyanobacteria*. Tal y como indicó la evolución de los sólidos suspendidos, se observó un crecimiento de las microalgas durante las 72 h de duración del experimento.

Tabla 23. Recuento microbiológico de del reactor “POM”.

tiempo (h)	0	24	48	72
Diatomeas (células/L)	5,0·10 ⁵	7,6·10 ⁶	1,7·10 ⁷	-
<i>Chlorophyceae</i> (células/L)	1,7·10 ⁸	6,5·10 ⁸	2,5·10 ⁹	3,4·10 ⁹
<i>Cyanobacteria</i> (células/L)	2,7·10 ⁸	3,7·10 ⁸	4,1·10 ⁸	4,9·10 ⁸
Total Eucariotas (células/L)	1,7·10 ⁸	6,6·10 ⁸	2,5·10 ⁹	3,4·10 ⁹
Diatomeas (%)	0,3	1,2	0,7	-
<i>Chlorophyceae</i> (%)	99,7	98,8	99,3	-

Con el fin de controlar las concentraciones de los CDE durante las 72 h de experimentación, se estableció la siguiente frecuencia de muestreo: durante las primeras dos horas se muestrearon los reactores cada 20 minutos; la frecuencia

disminuyó a una muestra cada 30 minutos durante las siguientes dos horas; y a partir de las tres horas la frecuencia de muestreo disminuyó hasta una muestra cada 24 horas durante dos días. A pesar de que el estudio duró aproximadamente 72 horas, se observó que la información obtenida más allá de los 165 minutos era irrelevante para el desarrollo del modelo cinético, ya que las concentraciones obtenidas fueron prácticamente constantes.

El seguimiento de las concentraciones de CDE a lo largo de los experimentos se ha realizado mediante concentraciones relativas de CDE. Éstas se han calculado como la relación entre la concentración de cada CDE a un tiempo determinado (C_t) y la concentración inicial (C_0). La representación de la evolución de las concentraciones relativas frente al tiempo para los experimentos "P", "POM", "PO" y "O" se puede observar en la Figura 35, la Figura 36, la Figura 37 y la Figura 38, respectivamente.

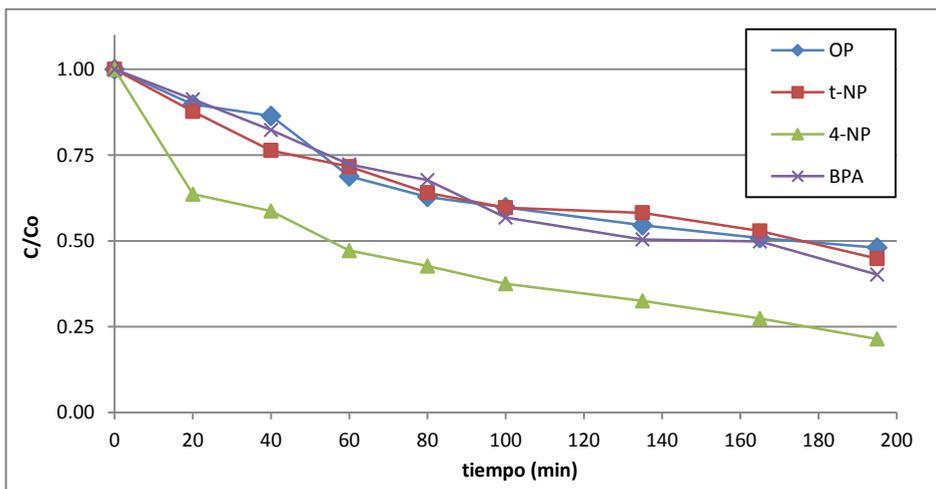


Figura 35. Evolución de la concentración relativa de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en el experimento "P" (reactor no aireado).

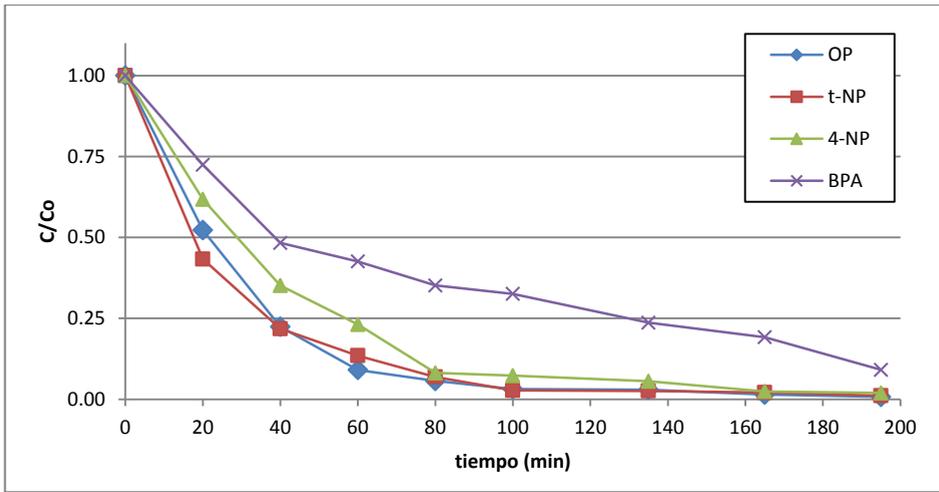


Figura 36. Evolución de la concentración relativa de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en el experimento "POM".

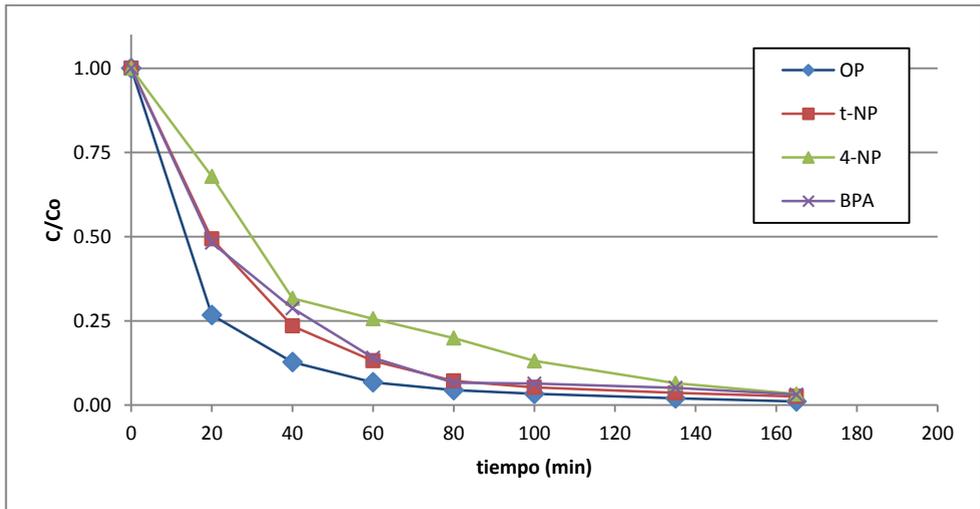


Figura 37. Evolución de la concentración relativa de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en el experimento "PO".

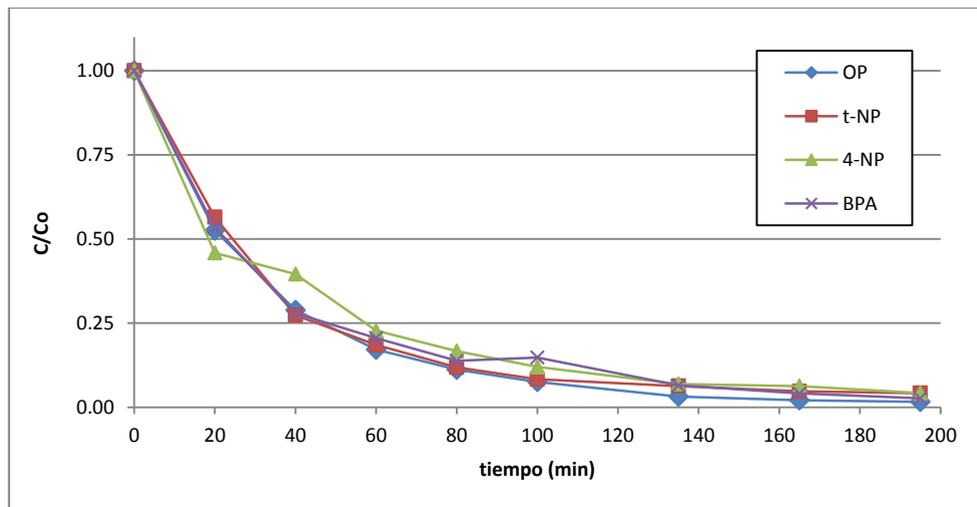


Figura 38. Evolución de la concentración relativa de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en el experimento "O".

Para la obtención tanto del orden de la cinética como de la constante cinética, es necesario la representación de los datos obtenidos. Tras comprobar que existe una relación lineal entre $\ln ([A]_t/[A]_0)$ y el tiempo, se procedió al ajuste por el método de mínimos cuadrados, donde $[A]_t$ es la concentración de CDE existente a un tiempo t (mol/L) y $[A]_0$ es la concentración inicial de CDE (mol/L). Debido a que a tiempo 0 tanto la concentración inicial ($[A]_0$) como la concentración a tiempo t ($[A]_t$) coinciden, la función $\ln ([A]_t/[A]_0)$ es cero para todos los CDE a $t=0$ min, por lo que para el ajuste se empleó la regresión a través del origen. Por lo tanto, el modelo de regresión lineal utilizado viene dado por la Ecuación 29.

$$y = bx$$

Ecuación 29

donde:

- y: variable dependiente
- x: variable independiente
- b: pendiente

Del ajuste se obtiene la pendiente (b), la cual corresponde al valor de la constante cinética observada (k_{obs}), y el coeficiente de regresión, que indica la bondad del ajuste y, por lo tanto, si los resultados se ajustan correctamente al orden de reacción estudiado. En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos de las constantes cinéticas y coeficiente de regresión, así como los tiempos de vida media para los CDE estudiados. Los límites de confianza (LC) de la k_{obs} se calcularon mediante la desviación estándar de la pendiente (s_b) y el valor de la t de student para un nivel de confianza del 95 % y n-2 grados de libertad ($t_{(n-2)}$). Así pues, los LC de la pendiente vienen dados por ($t_{(n-2)} \cdot s_b$) (Miller y Miller, 2002).

Tabla 24. Constantes cinéticas observadas (k_{obs}) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para los disruptores OP, t-NP, 4-NP y BPA.

Experimento	CDE	k_{obs}	\pm	LC (min^{-1})	r^2	$t_{(1/2)}$ (min)
POM	OP	0,036	\pm	0,003	0,997	19,3
	t-NP	0,035	\pm	0,002	0,998	19,8
	4-NP	0,027	\pm	0,004	0,991	25,4
	BPA	0,014	\pm	0,004	0,98	48,8
PO	OP	0,043	\pm	0,013	0,98	16,0
	t-NP	0,034	\pm	0,002	0,998	20,5
	4-NP	0,021	\pm	0,002	0,996	33,4
	BPA	0,033	\pm	0,002	0,998	20,8
O	OP	0,025	\pm	0,002	0,994	27,4
	t-NP	0,028	\pm	0,004	0,995	24,8
	4-NP	0,021	\pm	0,003	0,98	32,5
	BPA	0,021	\pm	0,003	0,98	33,3
P	OP	0,0054	\pm	0,0009	0,98	128,0
	t-NP	0,0058	\pm	0,0009	0,994	120,2
	4-NP	0,011	\pm	0,003	0,96	63,1
	BPA	0,0048	\pm	0,0005	0,98	144,2

En el experimento carente de aireación forzada (“P”), la concentración de oxígeno es 5 veces inferior a los experimentos aireados. En la Figura 35 se puede

observar como el experimento sin aireación ("P") presenta un comportamiento diferente al descrito para los experimentos aireados, observándose que la velocidad de degradación a lo largo del experimento se mantiene relativamente constante. Además, se observa que el 4-NP muestra un comportamiento más reactivo frente al radical hidroxilo que el resto de CDE.

En los tres experimentos aireados ("POM", "PO" y "O") se observa que tras una etapa inicial comprendida entre 20 y 60 minutos aproximadamente, la velocidad de degradación se reduce drásticamente. Dicha reducción de la velocidad se debe a la rápida desaparición de los CDE en las etapas tempranas del experimento, reduciendo su concentración y en consecuencia la velocidad de la reacción (ver Ecuación 26, página 168).

Como se puede observar en la Tabla 24, los coeficientes de correlación presentan un valor superior a 0,91, por lo que se asume que los valores experimentales se ajustan correctamente al modelo cinético seleccionado (pseudoprimer orden).

En la Tabla 24 se observa que las constantes cinéticas son más elevadas en los experimentos con presencia de luz y aireación forzada ("POM" y "PO"), observándose valores superiores o iguales a $0,02 \text{ min}^{-1}$, mientras que el experimento que emplea únicamente oxígeno como agente oxidante ("O") presenta constantes cinéticas comprendidas entre $0,021$ y $0,028 \text{ min}^{-1}$. Respecto al experimento sin aireación forzada ("P") se observa que las constantes cinéticas se han reducido aproximadamente un orden de magnitud, encontrándose estas comprendidas entre $0,0048$ y $0,011 \text{ min}^{-1}$. Se observa que, tal y como se sugería en la Figura 35, la constante del 4-NP en el experimento "P" es superior a la del resto de CDE, sugiriendo una degradabilidad superior a la de OP, t-NP y BPA, tal y como se había observado ya en los experimentos descritos en el capítulo 5.4.2.1.

Tras la determinación de las constantes cinéticas observadas, se calcularon las constantes cinéticas de segundo orden a partir de la Ecuación 24 y la Ecuación 25. Para el experimento "O", la Ecuación 25 se simplificó en la Ecuación 30, ya que dicho experimento se llevó a cabo sin luz, y a partir de la k_{obs} (Tabla 24, página 174) y de la concentración de oxígeno disuelto (Tabla 21, página 169) se determina la k_{O_2} .

$$k_{\text{obs}} = k'_{\text{O}_2} = k_{\text{O}_2} \cdot [\text{O}_2]$$

Ecuación 30

Una vez obtenida la constante k_{O_2} , se procede a la determinación de la constante k_{OH} mediante la k_{obs} determinada en el experimento “P”. Para ello se emplea la Ecuación 25 completa, donde se sustituye el valor de k_{O_2} obtenido en el paso anterior (experimento “O”). La concentración del radical hidroxilo, necesaria para la resolución de la Ecuación 25, se estima a partir de la bibliografía, ya que dicho radical no se puede medir con el instrumental disponible en el laboratorio. Los trabajos de Lam et al. (2003) y Jacobs et al. (2008) indican que la concentración típica de dicho radical en aguas continentales se encuentra comprendida entre 10^{-18} y 10^{-14} mol/L. Mientras que el trabajo de Ryan et al. (2011) determina que la concentración de este radical en el efluente de un proceso aerobio se encuentra comprendido entre 10^{-15} y 10^{-14} mol/L. Asimismo, la concentración del precursor (ion nitrato) determinada por este autor se encuentra comprendida entre 0,007 y 0,3 mmol/L. Como el intervalo de concentración en el medio de reacción del presente trabajo es similar (entre 0,06 y 0,2 mmol/L), se considera adecuado el empleo de estos valores (10^{-15} mol/L) para el radical hidroxilo.

Una vez se ha determinado la constante k_{OH} se calcula la constante k_{O_2} para los experimentos “POM” y “PO” según la Ecuación 25 sin simplificar. En la Tabla 25 se muestran los valores de las constantes cinéticas de degradación de segundo orden correspondientes a ambos agentes oxidantes.

Tabla 25. Promedio de las constantes cinéticas de segundo orden para los disruptores estudiados. Los valores de k_{O_2} y k_{OH} se expresan en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

	k_{O_2}	s.d.	$k_{\text{OH}}^{(*)}$	s.d.
OP	125	31	$2,6\cdot 10^{+11}$	n.a.
t-NP	121	16	$7,0\cdot 10^{+10}$	n.a.
4-NP	77	12	$6,6\cdot 10^{+12}$	n.a.
BPA	87	28	$5,7\cdot 10^{+11}$	n.a.

(n.a.). No aplicable.

(*) Valores de k_{OH} determinados con una concentración estimada de radical hidroxilo de 10^{-15} mol/L.

Mientras que la constante k_{O_2} se determina para los cuatro experimentos (“POM”, “PO”, “P” y “O”), la constante k_{OH} sólo se determina para el experimento con menor concentración de oxígeno (“P”), donde el producto $k_{O_2} \cdot [O_2]$ tiene menos peso en la Ecuación 25, y por lo tanto menos error en su determinación.

Como se puede observar en la Tabla 25, los valores correspondientes a k_{O_2} están comprendidos entre 77 y 125 $L \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$, y los valores de k_{OH} están comprendidos entre $7,0 \cdot 10^{+10}$ y $6,6 \cdot 10^{+12}$ $L \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$. Las constantes de degradación calculadas muestran como los valores para el mecanismo seguido por el radical hidroxilo son aproximadamente 9 órdenes de magnitud superiores a los obtenidos mediante el mecanismo seguido por el oxígeno. Por lo tanto, los resultados indican que el radical hidroxilo es mejor oxidante que el oxígeno disuelto. Sin embargo se observa que los experimentos que se realizaron bajo aireación forzada presentan cinéticas de degradación superiores a las producidas sin dicha aireación. Dicha observación se debe a la reducida concentración de radical hidroxilo disuelto en aguas residuales (entre 10^{-15} y 10^{-14} mol/L) (Ryan et al., 2011), por lo que la degradación de los CDE se encuentra controlada por el mecanismo del oxígeno.

5.4.2.3.2. Cinética de degradación en los experimentos “PM”

En el experimento “PM” es la actividad metabólica de las microalgas en presencia de luz la que produce oxígeno disuelto en el medio de reacción. Esta forma de introducir oxígeno en el medio de reacción destaca porque es posible conseguir concentraciones de oxígeno disuelto elevadas (superiores a la concentración de saturación) sin coste energético. Según la Ecuación 24 y la Ecuación 25 (página 167), la constante de degradación observada (k_{obs}) depende de la constante cinética de pseudo-primer orden (k'_{O_2}) y esta a su vez de la concentración de oxígeno disuelto, por lo que en el experimento “PM” la constante observada debería ser mayor a la obtenida con el resto de experimentos.

Las características químicas del afluente empleado para alimentar el fotobiorreactor fueron: 144 ± 5 mg DQO/L, 38 ± 2 mg DBO/L, $52,7 \pm 0,5$ mg $N-NH_4^+$ /L, $7,8 \pm 0,2$ mg $P-PO_4^{3-}$ /L, $36,8 \pm 1,0$ mg $S-SO_4^{2-}$ /L,

80 ± 13 mg S₂⁻/L, 37 ± 5 mg CH₃COOH/L de AGV, y 685 ± 12 mg CaCO₃/L de alcalinidad.

En la Tabla 26 se muestra la caracterización química del reactor durante los 6 días que duró el experimento y en la Tabla 27 se muestra el análisis microbiológico del reactor “PM”.

Tabla 26. Evolución de los parámetros químicos del reactor “PM”.

tiempo (h)	0	24	96	120	144
(mg SST/L)	40	52	82	n.d.	250
N-NH ₄ (mg/L)	28,86	28,33	21,82	21,44	18,11
N-NO ₂ (mg/L)	0	0	0	0	0
N-NO ₃ (mg/L)	1,04	0,48	0,73	0,86	0,53
P-PO ₄ (mg/L)	3,73	3,74	0,54	0,60	0,34

(n.d.): no disponible.

Tabla 27. Recuento microbiológico del reactor “PM”.

tiempo (h)	0	24	96	120	144
Diatomeas (células/L)	4,9·10 ⁶	4,5·10 ⁶	9,0·10 ⁶	1,2·10 ⁷	1,8·10 ⁸
<i>Chlorophyceae</i> (células/L)	1,6·10 ⁷	6,8·10 ⁷	3,0·10 ⁸	1,4·10 ⁹	9,6·10 ⁹
<i>Cyanobacteria</i> (células/L)	6,5·10 ⁷	6,6·10 ⁶	2,5·10 ⁷	1,5·10 ⁸	5,6·10 ⁸
Total Eucariotas (células/L)	2,4·10 ⁷	7,4·10 ⁷	3,1·10 ⁸	1,4·10 ⁹	9,8·10 ⁹
Diatomeas (%)	20,3	6,1	2,9	0,8	1,9
<i>Chlorophyceae</i> (%)	67,1	92,6	95,5	99,2	98,1

Como se ha indicado anteriormente, la sobresaturación de oxígeno disuelto se produce homogéneamente en todo el medio de reacción, ya que las microalgas se encuentran repartidas uniformemente en todo el reactor. Dicha situación de sobresaturación se mantiene siempre que el sistema no se someta a perturbaciones mecánicas.

En el experimento “PM” se controló la degradación de los distintos disruptores endocrinos con luz y en presencia de un cultivo de microalgas sin aireación forzada. Tal y como se describe en el apartado 3.1.5, el experimento se preparó inoculando 800 mL de un cultivo de microalgas en un reactor de 2,0 L, y posteriormente se alimentó con 800 mL del efluente del proceso SAnMBR, previamente aireado durante 20 min para eliminar sulfuros. El sistema se sometió a una irradiación constante (135 μE·m⁻²·s⁻¹). Con el fin de conseguir una mezcla final homogénea, y

debido a que no se empleó la agitación por burbujeo, ésta se agitó mediante el uso de un agitador magnético a baja velocidad de rotación (100 rpm). Al igual que el resto de experimentos, el reactor "PM" se mantuvo en cámara termostata a $23,4 \pm 0,2$ °C. La concentración de oxígeno disuelto se controló a razón de 1 medida por minuto.

En la Figura 39 se puede observar la evolución del oxígeno disuelto en el medio de reacción ("PM"). El valor del OD inicial fue de $8,2$ mg O₂/L. Tras 2 h, la concentración de OD descendió hasta $0,04 \pm 0,05$ mg O₂/L y se mantuvo durante las 50 primeras horas de experimento, momento en el cual la concentración de OD comenzó a aumentar de manera irregular (entre 50 y 140 h). Se observó que en la hora 141 empezó una etapa estable de OD. Tras 0,5 h se procedió a la fortificación del medio de reacción (141,5 h). El nivel de fortificación fue 3,5, 15, 10 y 10 µg/L de OP, t-NP, 4-NP y BPA, respectivamente. El intervalo de duración del experimento estuvo comprendido entre 141,5 y 146,0 h. En el detalle de la Figura 39 se muestra la monitorización que se realizó de la concentración de OD durante el intervalo comprendido entre 140,5 y 147 h, observándose que durante este intervalo la concentración de OD se mantuvo en $14,7 \pm 0,3$ mg O₂/L. De este valor se desprende que la concentración de OD duplica el valor de saturación; además, el reducido valor de la desviación estándar refleja la reducida variabilidad de este valor. El muestreo se realizó con una frecuencia de 10 min. La primera muestra se tomó en el instante siguiente a fortificar el reactor.

La reducida concentración de oxígeno disuelto observada en las 50 primeras horas del experimento pareció deberse a la transformación de ion sulfuro en ion sulfato. Las concentraciones iniciales de sulfuro y sulfato en el efluente adicionado al reactor fueron 53 ± 5 mg S²⁻/L y 42 ± 4 mg S-SO₄²⁻/L, respectivamente. Mientras que la concentración de sulfato en el instante inicial del experimento (141,5 h) fue 81 ± 6 mg S-SO₄²⁻/L. La suma de las concentraciones de ion sulfuro e ion sulfato en el efluente proporciona un valor estadísticamente similar al medido al iniciar el experimento. Los reducidos valores de oxígeno disuelto al inicio del experimento sugieren que el ion sulfuro, presente en el efluente del SANMBR, consumió tanto el oxígeno presente en el medio de reacción como el aportado por la reaireación superficial para su oxidación a ion sulfato (ver reacción química en el apartado 5.4.2, página 116).

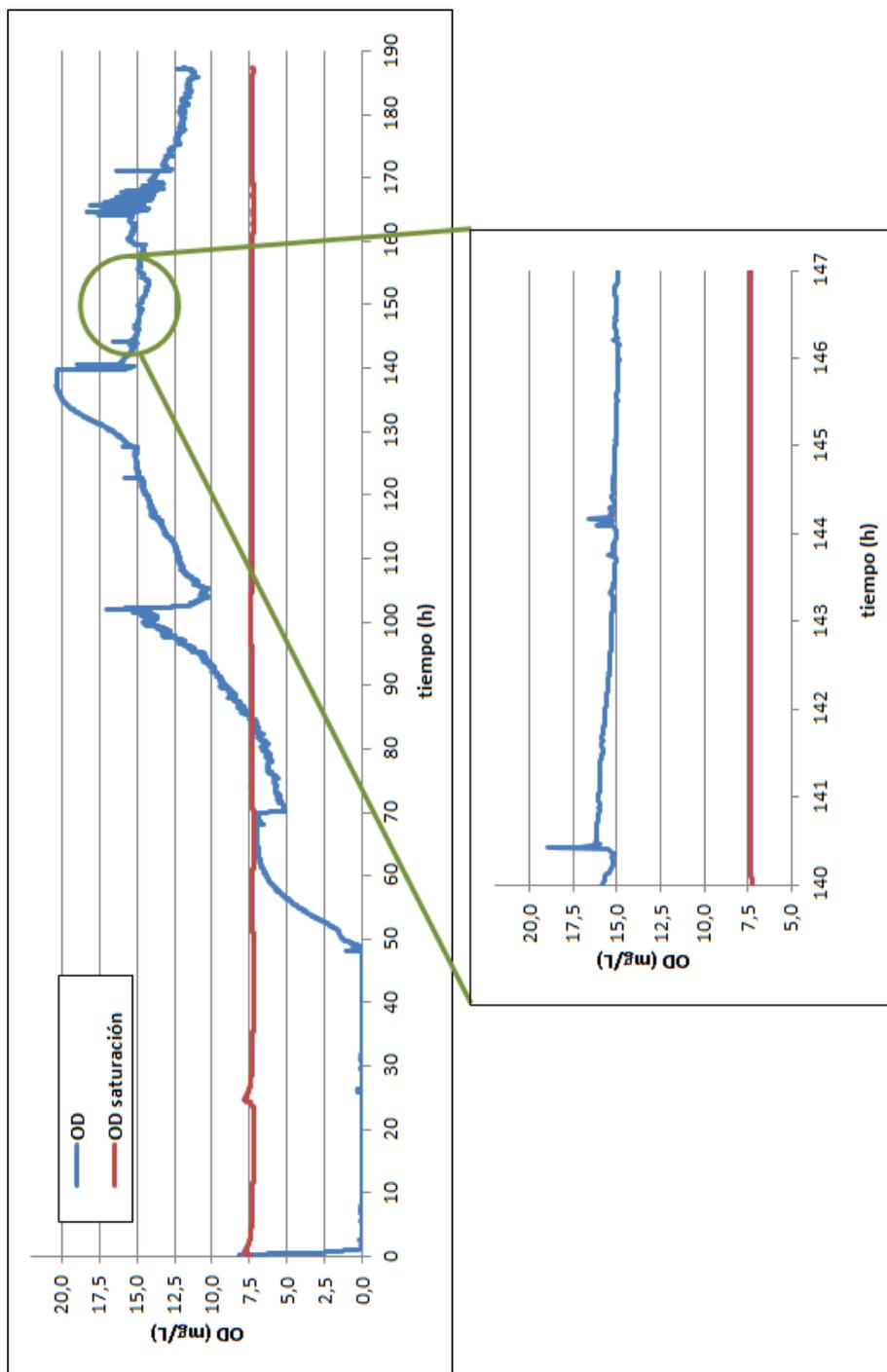


Figura 39. Evolución del oxígeno disuelto en el medio de reacción del experimento "PM".

En la Figura 40 se observa la eficiencia de degradación de los distintos disruptores en el experimento “PM” en el que se tenía un medio de reacción sobresaturado de oxígeno. Si se comparan los resultados de la Figura 40 con los resultados obtenidos de la Figura 35, la Figura 36, la Figura 37 y la Figura 38 se observa que la velocidad de degradación es superior para un medio de reacción con una concentración de OD superior al valor de saturación.

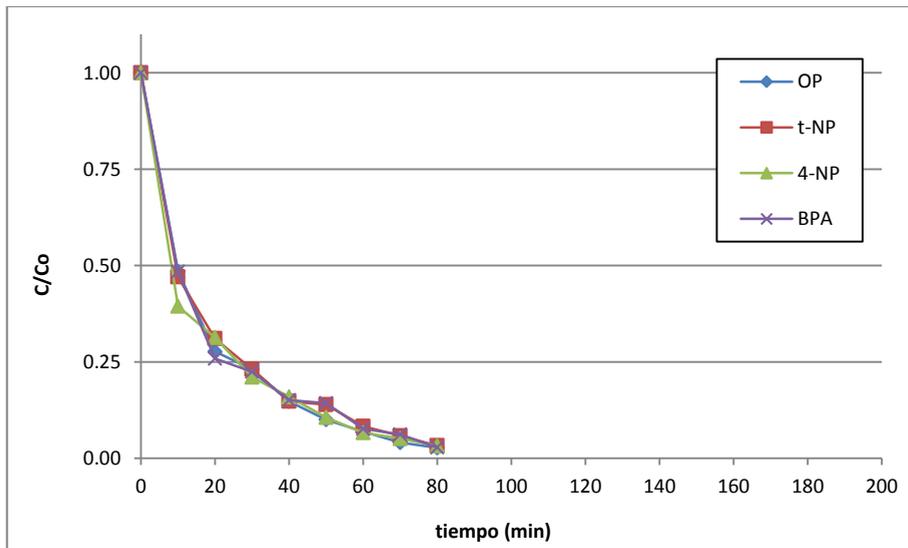


Figura 40. Evolución de la concentración relativa de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en el experimento “PM”.

El experimento “PM” duró 5 h, sin embargo el estudio cinético se centró en los 80 primeros minutos (inicio del experimento a las 141,5 h desde el montaje inicial), ya que trascurrido este tiempo los nuevos datos no aportaban información al modelo.

Tras un ajuste por mínimos cuadrados de la función $\ln([A]/[A]_0)$ frente al tiempo, se obtiene la constante cinética observada que engloba ambos mecanismos (ver Ecuación 25, página 167). En la Tabla 28 se muestran las constantes de degradación observadas para OP, t-NP, 4-NP y BPA bajo condiciones de sobresaturación de OD. Tras comparar los resultados con los mostrados en la Tabla 24, se observa cómo las constantes cinéticas (k_{obs}) obtenidas bajo condiciones

de sobresaturación de OD son superiores a las obtenidas con una concentración de OD inferior al valor de saturación (ver Tabla 24, página 174).

Tabla 28. Constantes cinéticas observadas (k_{obs}) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para los disruptores OP, t-NP, 4-NP y BPA.

Experimento	CDE	k_{obs}	\pm s.d. (min^{-1})	r^2	$t_{(1/2)}$ (min)
PM	OP	0,051	\pm 0,009	0,98	13,5
	t-NP	0,050	\pm 0,008	0,990	13,7
	4-NP	0,045	\pm 0,004	0,990	15,5
	BPA	0,043	\pm 0,004	0,990	15,9

Una vez obtenidas las constantes observadas (k_{obs}) se procede a la determinación de las constantes de pseudo-primero (k_{O_2}') y segundo orden (k_{O_2}), las cuales se calculan mediante la Ecuación 25 (ver página 167). Se asume que la constante k_{OH} es la misma que la determinada en el capítulo 5.4.2.3.1. En la Tabla 29 se muestran estas constantes cinéticas correspondientes al mecanismo del oxígeno.

Tabla 29. Constantes cinéticas de pseudo-primero (k_{O_2}') y segundo orden (k_{O_2}).

	OP	t-NP	4-NP	BPA
k_{O_2} ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	111	110	83	93
k_{O_2}' (min^{-1})	0,051	0,050	0,038	0,043

Comparando las constantes de segundo orden de la Tabla 29 con las obtenidas sin sobresaturación de oxígeno (ver Tabla 25, página 176) se observan que son estadísticamente iguales. Las constantes cinéticas reales dependen únicamente de la temperatura (temperatura de trabajo $23,4\pm 0,2$ °C), por lo que el resultado es coherente.

Asimismo, en la Tabla 30 se muestra la relación de constantes cinéticas de pseudo-primero orden y OD entre el experimento "PM" y el resto de experimentos estudiados ("POM", "P", "PO" y "O"). Los datos sugieren que el aumento de las k_{obs} en el experimento "PM" se debe al aumento de la concentración de OD, ya que el aumento tanto de la relación de constantes como la de concentración de oxígeno disuelto son similares.

Tabla 30. Relación de las constantes cinéticas de pseudo-primer orden y la concentración de OD entre el experimento “PM” y el resto (“POM”, “P”, “PO” y “O”).

	OP	t-NP	4-NP	BPA	OD _{PM} /OD _{POM,P,PO,O}
PM/POM	1,79	1,75	1,92	1,76	1,70
PM/P	11,05	10,40	5,74	8,51	8,64
PM/PO	1,71	1,74	1,98	1,90	1,80
PM/O	2,42	2,41	2,25	2,23	1,81

El término “ $k_{OH} \cdot [OH]$ ” en los experimentos “PM” y “POM” de la Ecuación 25 (página 167) se puede considerar constante en ambos experimentos. Al trabajar con una concentración de oxígeno superior, las constantes cinéticas de pseudo-primer orden para los cuatro disruptores experimentan un aumento, el cual se corresponde con el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción. Igualmente, el tiempo de vida media se reduce aproximadamente a la mitad para OP, t-NP y 4-NP, mientras que para el caso del BPA la reducción experimentada es mayor, reduciéndose desde 65,6 min para el experimento “POM” hasta 17,8 min para el experimento “PM”.

Como se puede observar, el empleo de condiciones sobresaturadas de oxígeno disuelto aumenta la velocidad de degradación de los CDE. La constante cinética de pseudo-primer orden correspondiente al mecanismo del oxígeno es directamente proporcional a la concentración de oxígeno disuelto (ver Ecuación 24, página 167), por lo tanto el aumento de dicha concentración en el medio produce una modificación proporcional tanto en la constante de pseudo-primer orden como la constante observada (Ecuación 25, ver página 167) y finalmente en la velocidad de degradación.

Como se ha observado, el empleo de microalgas permite obtener un medio de reacción con una concentración de OD superior al valor de saturación sin necesidad de aporte energético. La dependencia de la cinética degradación de los distintos disruptores con la concentración de oxígeno disuelto hace que la sobresaturación de OD natural descrita sea importante, ya que es posible tanto la reducción de costes como el aumento de la velocidad del proceso de degradación. Los resultados sugieren que un aumento en la cinética de degradación permitiría obtener elevados rendimientos de eliminación con reducidos tiempos de retención, tanto TRH como

TRC. Sin embargo, un medio sobresaturado de oxígeno es difícil de mantener en una planta industrial, ya que es necesario mantener el cultivo de microalgas libre de perturbaciones mecánicas, las cuales provocarían la reducción del OD hasta valores de $OD_{\text{saturación}}$. En el capítulo 7.3 se expone un estudio preliminar realizado en una planta piloto con cultivo de microalgas. En esta planta se obtuvieron concentraciones de oxígeno disuelto de $8,9 \pm 1,1$ mg O_2/L (a 25 °C), siendo la concentración $OD_{\text{saturación}}$ a 25 °C de 7,3 mg O_2/L .

5.4.2.3.3. Validación de las constantes cinéticas

La validación del modelo cinético propuesto se realizó mediante el ajuste de las constantes cinéticas de degradación k_{O_2} y $k_{\cdot OH}$, obtenidas en la etapa de calibración con los datos de los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “P” (ver Tabla 25, página 176), bajo las diferentes condiciones experimentales. Posteriormente se comprobó la idoneidad entre el ajuste obtenido con estas constantes y los datos experimentales del experimento “PM”, el cual no se empleó en la etapa de calibración. Para el estudio el modelo cinético se empleó la Ecuación 31:

$$\frac{[A]_t}{[A]_0} = e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} \quad \text{Ecuación 31}$$

donde:

- $[A]_t$: concentración de disruptor a un tiempo t (mol/L)
- $[A]_0$: concentración de disruptor en el instante inicial (mol/L)
- k_{obs} : constante de degradación observada (min^{-1})
- t : tiempo (min)

El cálculo de la k_{obs} para las condiciones experimentales del experimento “PM” se realizó a partir de las constantes individuales k_{O_2} y $k_{\cdot OH}$ (Tabla 25, página 176), así como de la concentración de oxígeno de este experimento “PM” (14,7 mg O_2/L). En las gráficas de validación se emplearon los siguientes valores de k_{obs} :

$$k_{\text{obs},1} = (k_{O_2} + \text{s. d.}) \cdot [O_2] + k_{\cdot OH} \cdot [\cdot OH]$$

$$k_{\text{obs},2} = k_{O_2} \cdot [O_2] + k_{\cdot OH} \cdot [\cdot OH]$$

$$k_{\text{obs},3} = (k_{O_2} - \text{s. d.}) \cdot [O_2] + k_{\cdot OH} \cdot [\cdot OH]$$

En la Figura 41, la Figura 42, la Figura 43 y Figura 44 se muestran los datos experimentales obtenidos para el experimento “PM” y los ajustes realizados con los citados valores de k_{obs} para OP, t-NP, 4-NP y BPA respectivamente.

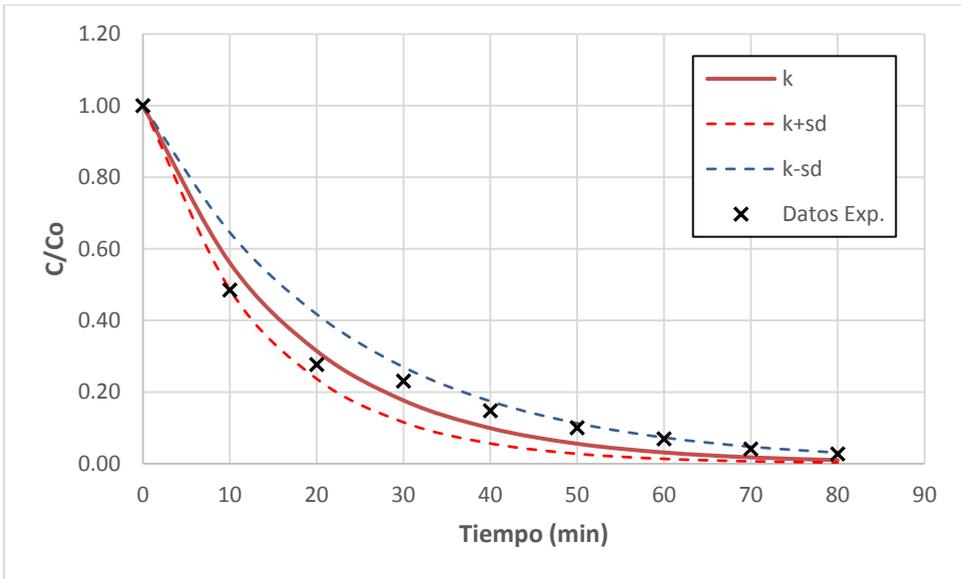


Figura 41. Representación de los datos experimentales del experimento "PM" y el ajuste del modelo cinético para el disruptor OP.

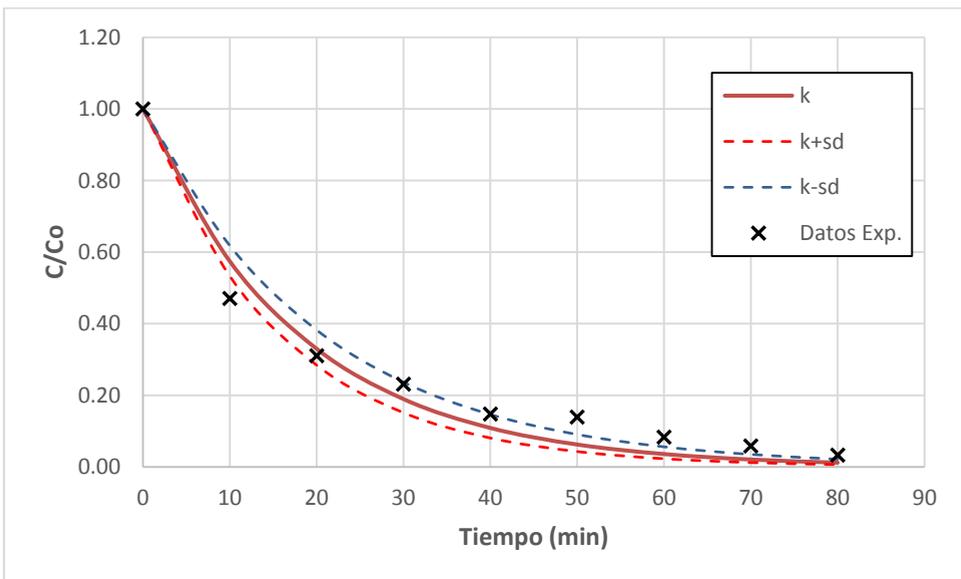


Figura 42. Representación de los datos experimentales del experimento "PM" y el ajuste del modelo cinético para el disruptor t-NP.

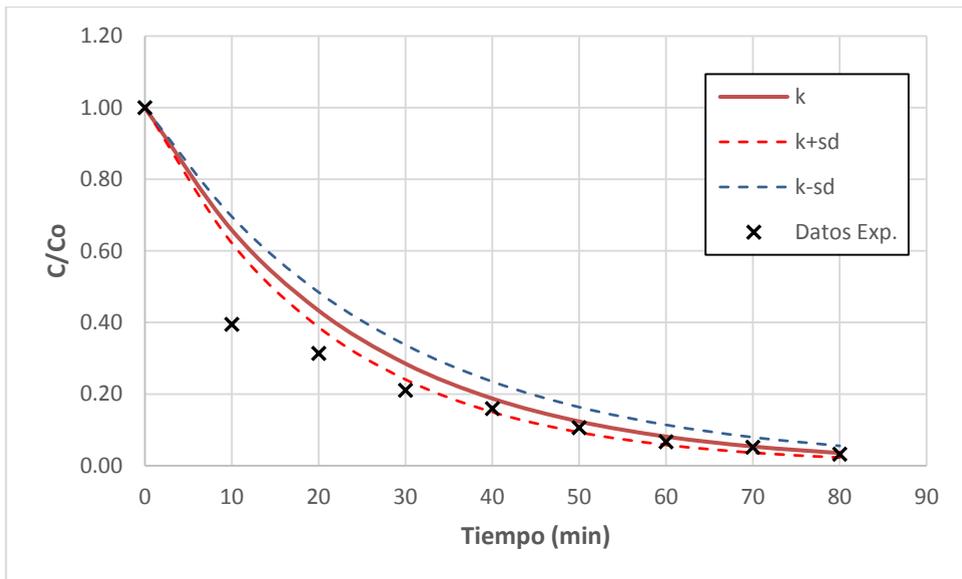


Figura 43. Representación de los datos experimentales del experimento “PM” y el ajuste del modelo cinético para el disruptor 4-NP.

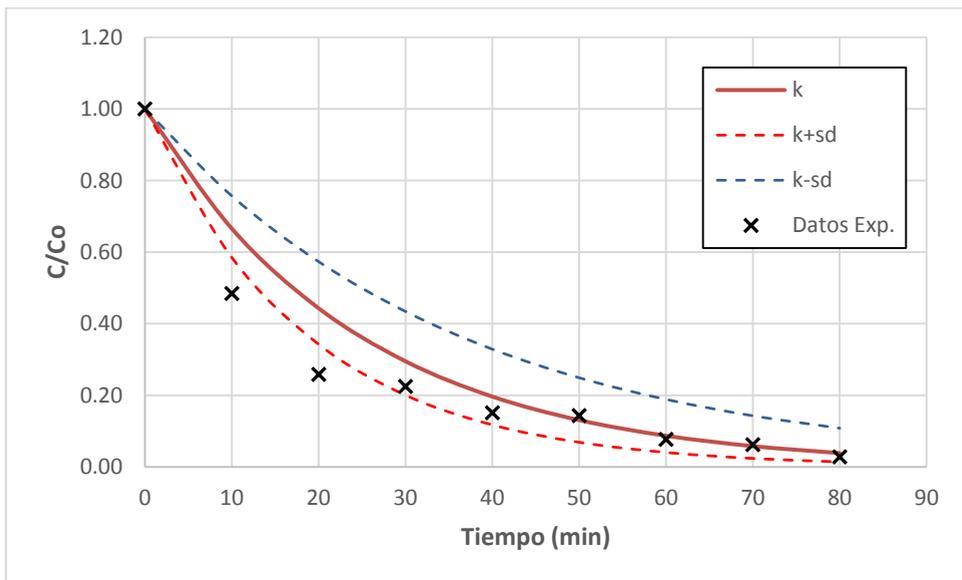


Figura 44. Representación de los datos experimentales del experimento “PM” y el ajuste del modelo cinético para el disruptor BPA.

Para el OP se observa como los puntos experimentales se encuentran dentro del intervalo de confianza establecido por el ajuste. El t-NP presenta un buen ajuste en las etapas tempranas del experimento (<20 min), pero a tiempos superiores a 30 min la degradación predicha por el modelo es superior a la determinada por los puntos experimentales. Respecto al 4-NP y BPA, se observa como para tiempos inferiores a 30 min el modelo presenta una degradación menor que la observada por los puntos experimentales, sin embargo a tiempos superiores tanto el modelo como los puntos experimentales convergen.

Con el fin de comprobar que los datos experimentales obtenidos en la etapa de calibración (“POM”, “PO”, “O” y “P”) ajustan al modelo propuesto (Ecuación 31, página 184) con las constantes determinadas (Tabla 25, página 176), se representa gráficamente estas dos series de datos. Los resultados se muestran en el Anexo VI.

5.5. Estudio comparativo

En el presente apartado se realizará una comparación de los diferentes tratamientos empleados para la degradación de disruptores. El objetivo es dilucidar qué proceso es más efectivo desde el punto de vista de la degradación de los CDE estudiados. En este capítulo se compararán las fracciones solubles y suspendidas de ambos tipos de tratamientos; secundarios (SAnMBR, TC y aMBR), y postratamientos (UCT y microalgas).

Para los tratamientos secundarios el estudio se centró en el comportamiento de los disruptores; OP, t-NP, 4-NP, E1, E2 y EE2, debido a que los métodos para PCP y BPA no estaban a punto. Mientras que para los postratamientos el estudio se centró en los disruptores OP, t-NP, 4-NP y BPA, ya que éstos fueron los únicos disruptores detectados en el efluente del SAnMBR.

5.5.1. Comparación de los tratamientos secundarios.

La planta piloto SAnMBR y la planta industrial TC fueron estudiadas de forma paralela durante el mismo periodo (desde Octubre de 2010 hasta Mayo de 2011), tomando muestras en ambas plantas en el mismo instante. Los resultados del

aMBR provienen de un estudio anterior (desde Mayo hasta Julio de 2010). A pesar de ello, y como se puede observar en la Tabla 31, las características del afluente tratado fueron similares a los tratados por los sistemas aMBR y TC. Sin embargo el afluente del SAnMBR presentó una concentración mayor de sólidos en suspensión y DQO total. En este periodo de tiempo, los únicos métodos analíticos que estaban puestos a punto fueron los del, OP, t-NP, 4-NP, E1, E2 y EE2, por lo que BPA y PCP no se estudiaron.

En el presente estudio, los parámetros operacionales de los procesos estudiados fueron: TRC y TRH de 5 ± 1 d y 4 ± 1 h, respectivamente, para el proceso TC; TRC de 80 ± 15 d y TRH de 8 ± 1 h (entre octubre de 2010 y Enero de 2011) y 25 ± 3 h (entre febrero y mayo de 2011), para el sistema SAnMBR; y TRC y TRH de 100 ± 5 d y 9 ± 1 h, respectivamente, para el sistema aMBR.

En la Tabla 31 se muestran las características promedio del agua tratada por las plantas SAnMBR, TC y aMBR durante el periodo de tiempo estudiado. Se puede observar la elevada concentración de sulfato, así como la baja concentración de la DQO soluble. También se puede observar la importante variabilidad de la carga de entrada, lo que se puede deducir de los elevados valores de la desviación estándar asociada a cada parámetro.

Tabla 31. Características promedio del agua de entrada a los tratamientos secundarios.

Parámetro		SAnMBR		TC		aMBR	
		Promedio	± s.d.	Promedio	± s.d.	Promedio	± s.d.
SST	mgSST/L	330	± 90	115	± 23	120	± 38
SSV	mgSSV/L	270	± 80	97	± 27	93	± 35
DQO _{total}	mgDQO/L	600	± 200	290	± 33	310	± 20
DQO _{soluble}	mgDQO/L	68	± 13	96	± 13	135	± 10
AGV	mgDQO/L	9	± 5	6	± 3	12	± 2
S-SO ₄	mgS/L	102	± 9	112	± 7	110	± 10
N-NH ₄	mgN/L	26	± 6	32	± 4	30	± 3
P-PO ₄	mgP/L	3	± 1	5	± 2	4	± 1
Alcalinidad	mgCaCO ₃ /L	310	± 80	350	± 29	300	± 35

5.5.1.1. Fracción soluble

En lo referente a la presencia de CDE en la fracción soluble, la Tabla 32 y la Tabla 33 muestran datos estadísticos de los disruptores analizados en los diferentes puntos de muestreo de las tres plantas: afluente al SANMBR (A_{SANMBR}), afluente al TC (A_{TC}), afluente al aMBR (A_{aMBR}), reactor del TC (R_{TC}), reactor del aMBR (R_{aMBR}), efluente del SANMBR (E_{SANMBR}), efluente del TC (E_{TC}) y efluente del aMBR (E_{aMBR}). Estudios realizados con la fracción soluble de los reactores de membrana (SANMBR y aMBR) y sus efluentes (E_{SANMBR} y E_{aMBR}) mostraron que ambas muestras eran equivalentes. Por lo que para el proceso SANMBR únicamente se trabaja con el efluente (E_{SANMBR}), debido a la menor manipulación de la muestra, sin embargo en el proceso aMBR se trabaja con ambas (R_{aMBR} y E_{aMBR}), debido al reducido número de muestras disponibles. El nivel de concentración de las hormonas (E1, E2 y EE2) en cada una de las líneas de aguas estudiadas estuvo en todo momento por debajo del LDD, por lo que en párrafos posteriores no se citan.

Tabla 32. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en cada punto de muestreo de los sistemas SANMBR y TC para la fracción soluble.

(µg/L)	OP				t-NP				4-NP			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.
A_{SANMBR}	0,99	<LDD	0,21	0,31	4,9	<LDD	2,28	1,14	3,2	<LDD	0,86	1,21
E_{SANMBR}	1,24	<LDD	0,37	0,39	13,0	1,3	6,28	4,15	0,5	<LDD	0,07	0,14
A_{TC}	0,37	<LDD	0,10	0,12	6,7	<LDD	2,41	1,86	1,4	<LDD	0,31	0,50
R_{TC}	0,57	<LDD	0,09	0,16	0,9	0,17	0,55	0,26	0,8	<LDD	0,16	0,25
E_{TC}	0,08	<LDD	0,03	0,03	2,1	<LDD	0,96	0,65	0,3	<LDD	0,06	0,12

Nomenclatura: A_{SANMBR} : Afluente del SANMBR; E_{SANMBR} : Efluente del SANMBR; A_{TC} : Afluente del TC; R_{TC} : Reactor de TC y E_{TC} : Efluente del TC.

En la Tabla 32, se observa cómo la concentración de OP y t-NP en el agua de entrada es menor que en el agua de salida en el proceso SANMBR, mientras que para el proceso TC la concentración de dichos disruptores es mayor en la entrada que en la salida. Dicho comportamiento queda explicado con lo citado en el apartado 5.4.1.1 (página 135), dónde se observó que bajo condiciones anaerobias se produce la escisión de los grupos etoxi de los APEO de cadena corta, produciendo

los alquiflenoles OP y t-NP; mientras que bajo condiciones aerobias la concentración de dichos compuestos (OP y t-NP) en la fracción soluble se reduce. Respecto al 4-NP se observa cómo tanto el proceso aerobio como anaerobio favorecen el proceso de degradación en la línea de aguas.

Tabla 33. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en cada punto de muestreo del sistema aMBR para la fracción soluble.

(µg/L)	OP				t-NP				4-NP			
	Max.	Min.	Promedio	s.d.	Max.	Min.	Promedio	s.d.	Max.	Min.	Promedio	s.d.
A_{aMBR}	0,034	0,020	0,027	0,010	0,870	0,700	0,785	0,120	0,080	0,047	0,064	0,023
R_{aMBR}	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.
E_{aMBR}	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.

Nomenclatura: A_{aMBR}: Afluente del aMBR; R_{aMBR}: Reactor de aMBR y E_{aMBR}: Efluente del aMBR. (n.a.). No aplicable

En la Tabla 33 se observa cómo un proceso aMBR permite la eliminación completa de OP, t-NP y 4-NP presentes en la fase soluble del agua residual. En el proceso aMBR, la concentración hallada en el efluente es, en todos los casos, inferior al LDD.

La comparación de los rendimientos de eliminación de los procesos aerobios (TC y aMBR) revela que el proceso aerobio de membranas (aMBR) es más efectivo frente a la eliminación de estos compuestos. Los rendimientos de eliminación para el proceso TC se encuentran comprendidos entre un 64 y 82 %, mientras que la degradación en el proceso aMBR fue completa, destacando que, tal y como se puede observar en la Tabla 32 y la Tabla 33, las concentraciones de disruptores en el afluente del tratamiento aMBR fueron un orden de magnitud inferiores a las del proceso TC. Debido a la elevada diferencia de concentración en los afluentes de TC y aMBR, el cálculo de los rendimientos de eliminación en el reactor aMBR se realiza considerando que los valores inferiores al LDD equivalen a la mitad del LDD (ver Tabla 4, página 123). De esta forma puede considerarse que, las concentraciones de disruptor en el efluente del aMBR fueron 0,001, 0,013 y 0,004 µg/L de OP, t-NP

y 4-NP respectivamente, siendo los rendimientos de eliminación 98,1, 99,2 y 96,9 % para OP, t-NP y 4-NP, respectivamente.

Comparando los parámetros operacionales de ambos procesos aerobios (TC y aMBR), se observa que el parámetro TRH parece ser un factor importante en la eliminación de disruptores de la fracción soluble. En el proceso aMBR se empleó un valor de TRH de 9 ± 1 h, frente a un TRH de 4 ± 1 h en el proceso TC. Los datos sugieren que el empleo de un mayor TRH, tal y como se llevó a cabo el estudio en el proceso aMBR, conduce a una mayor eliminación de disruptores de la fracción soluble. Además el elevado TRC del proceso aMBR (100 ± 5 d), comparado con el del proceso TC (5 ± 1 d), produce poblaciones bacterianas con microorganismos capaces de degradar compuestos de elevada resistencia a la degradación.

Igualmente se comparan los procesos con parámetros operacionales similares, pero con condiciones de tratamiento distintas, como son SAnMBR y aMBR. Los parámetros operacionales del proceso SAnMBR son TRC y TRH de 80 ± 15 d y 8 ± 1 h, respectivamente, los cuales son similares a los del proceso aMBR citados en el párrafo anterior (TRC de 100 ± 5 d y TRH de 9 ± 1). La comparación entre el proceso aerobio (aMBR) y anaerobio (SAnMBR) revela que el oxígeno presente en el medio es clave a la hora de controlar la degradación de estos microcontaminantes, ya que ambos procesos mostraron rendimientos de eliminación muy distintos. Se observa cómo en el proceso SAnMBR no existió eliminación para OP y t-NP mientras que en el proceso aMBR la eliminación fue completa. Respecto al 4-NP se puede observar cómo con ambos procesos fueron capaces de producir eliminaciones significativas de este disruptor, siendo completa en el proceso aMBR. Mientras que para OP y t-NP el oxígeno disuelto presenta una mayor influencia respecto a la eliminación que el TRC y TRH, para el 4-NP se observan eliminaciones elevadas para ambos procesos. Los resultados sugieren que elevados tiempos de retención hidráulico y celular, bajo condiciones aerobias, son las condiciones de operación que producen la mayor eliminación de alquifenoles de la fracción soluble.

El SAnMBR estuvo operando a dos tiempos de retención hidráulico; 8 ± 1 h entre octubre de 2010 y Enero de 2011; y 25 ± 3 h entre febrero y mayo de 2011. En la Tabla 34 se muestran los promedios de las concentraciones en afluente y efluente de OP, t-NP y 4-NP en el proceso SAnMBR a los dos tiempos de retención hidráulico estudiados.

Tabla 34. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en afluente y efluente para el proceso SAnMBR para los dos tiempos de retención hidráulico estudiados.

		µg/L	Máx.	Min	Promedio	s.d.
TRH = 8 d	Afluente	OP	0,25	<LDD	0,11	0,10
		t-NP	4,90	<LDD	2,73	1,09
		4-NP	3,20	<LDD	0,70	1,16
	Efluente	OP	0,64	<LDD	0,24	0,23
		t-NP	13,0	<LDD	6,99	4,14
		4-NP	0,50	<LDD	0,11	0,18
		µg/L	Máx.	Min	Promedio	s.d.
TRH = 25 d	Afluente	OP	0,99	<LDD	0,36	0,45
		t-NP	2,70	<LDD	1,66	1,04
		4-NP	0,38	<LDD	0,16	0,15
	Efluente	OP	1,24	<LDD	0,56	0,50
		t-NP	12,2	<LDD	7,30	4,92
		4-NP	0,06	<LDD	0,02	0,03

La concentración de OP y t-NP en el efluente es mayor para TRH de 25 d. Mientras que para el 4-NP, se obtienen eliminaciones similares para ambos TRH. Los datos sugieren que un mayor tiempo de residencia de la fracción soluble en el reactor produce mayor degradación de los APEO de cadena corta, y por lo tanto una mayor concentración de t-NP en la fracción soluble. Sin embargo, el 4-NP presenta eliminaciones similares para ambos TRH.

5.5.1.2. Fracción suspendida

Respecto a la presencia de CDE en la fracción suspendida, en la Tabla 35 se pueden observar los datos estadísticos de los disruptores analizados en el afluente y reactor de las plantas SAnMBR y TC. Se observa cómo el afluente de ambas plantas presenta concentraciones similares, lo que indica que el efecto de los diferentes pre-tratamientos sufridos por ambos afluentes (desarenador y rototamiz en el caso del SAnMBR y decantación primaria para el reactor industrial TC) no afecta significativamente a la concentración de disruptor en la fracción suspendida

del afluente. En la Tabla 35 se observa como la concentración de OP y t-NP en el afluente y reactor de cada proceso son del mismo orden.

Tabla 35. Promedio de las concentraciones de OP y t-NP en cada punto de muestreo de los sistemas SAnMBR y TC para la fracción suspendida.

(µg/kg)	OP				t-NP				4-NP			
	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Máx.	Mín.	Promedio	s.d.	Max.	Min.	Promedio	s.d.
A _{SAnMBR}	133	<LDD	45	43	2.592	<LDD	1.298	898	7	<LDD	7	5
R _{SAnMBR}	150	<LDD	52	57	2.000	<LDD	1.221	705	22	<LDD	18	5
A _{TC}	80	<LDD	26	30	1.896	<LDD	693	584	100	<LDD	74	37
R _{TC}	67	<LDD	20	24	1.000	<LDD	399	336	115	<LDD	72	53

Nomenclatura: A_{SAnMBR}: Afluente del SAnMBR; A_{TC}: Afluente del TC; R_{SAnMBR}: Reactor de SAnMBR; R_{TC}: Reactor de TC.

Tras la comparación de los resultados de ambos reactores se observó que las concentraciones de OP y t-NP en el reactor SAnMBR fueron superiores que las observadas en el reactor TC. Los datos sugieren que, tal y como se ha indicado anteriormente, para el OP y el t-NP el gradiente de concentración entre la fracción soluble y suspendida unido a la elevada afinidad de este disruptor por la materia orgánica (log K_{ow} comprendido entre 4,9 y 5,7), favorecen la retención de estos sobre el fango de un proceso anaerobio frente a uno aerobio. Respecto al 4-NP, se observó que las concentraciones tanto en el afluente como el reactor del proceso SAnMBR fueron inferiores a las determinadas en el afluente y reactor del proceso TC. El comportamiento del EE2 en la fracción suspendida tampoco se ha podido evaluar debido a que la mayoría de las muestras presentaron una concentración inferior al LDD.

Comparando ambos sistemas aerobios (TC y aMBR), las concentraciones halladas en las fracciones suspendidas del sistema aMBR fueron inferiores a las halladas en el TC. Dicho comportamiento se puede explicar atendiendo a la importante diferencia de TRC entre ambos sistemas (5 ± 1 d y 100 ± 5 d para TC y aMBR, respectivamente). El elevado valor de TRC del proceso aMBR permite aumentar, bajo condiciones aerobias, el tiempo de contacto entre el fango y una

fracción soluble de reducida concentración en disruptores, de esta forma se favorece la desorción de los disruptores del fango del aMBR. A pesar de que no se hallaron hormonas en la fracción soluble, la hormona EE2 fue detectada a nivel de LDC en la fracción suspendida del afluente y reactor del proceso TC. En el sistema aMBR ninguna hormona fue detectada, por este motivo no se pudieron estudiar en ningún fango.

En la Tabla 36 se muestran los promedios de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en el fango anaerobio del proceso SAnMBR a dos TRH.

Tabla 36. Promedio de las concentraciones de OP, t-NP y 4-NP en el reactor del proceso SAnMBR para los dos tiempos de retención hidráulico estudiados.

	Conc. (µg/kg)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
TRH = 8 d	OP	3,33	<LDD	2,23	1,56
	t-NP	566,7	<LDD	301,7	374,8
	4-NP	22,00	<LDD	18,00	4,58
	Conc. (µg/kg)	Máx.	Min	Promedio	s.d.
TRH = 25 d	OP	149,6	<LDD	77,0	54,8
	t-NP	2.000,0	<LDD	1.588,5	346,4
	4-NP	<LDD	<LDD	n.a.	n.a.

(n.a.). No aplicable.

Como se puede observar en la Tabla 36, las concentraciones de OP y t-NP en el reactor del proceso SAnMBR para un TRH de 8 h (entre octubre 2010 y enero 2011) fueron inferiores a las determinadas para un TRH de 25 h (entre febrero y mayo 2011). Los resultados sugieren que el aumento del TRH bajo condiciones anaerobias permitió una mayor degradación de los APEO existentes, lo que ocasionaría un aumento de la concentración de alquilfenoles en la fracción soluble y posteriormente una mayor retención sobre la fracción suspendida. Respecto a 4-NP y EE2, estos fueron detectados a niveles de concentración comprendidos entre LDD y LDC en la fracción suspendida operando a un TRH de 8 h; mientras que la concentración disminuyó por debajo del LDD al modificar el TRH a 25 h. Todo

parece indicar que el aumento del TRH favoreció la degradación de 4-NP y EE2 (ambos más biodegradables que OP y t-NP), por lo tanto el gradiente de concentración entre la fracción soluble y la suspendida produjo la liberación de 4-NP y EE2 desde la fracción suspendida a la soluble.

A la vista de los resultados, el comportamiento de los CDE en la fracción suspendida se encuentra controlada por la concentración de estos en la fracción soluble, modificando el gradiente de concentración hacia la adsorción o desorción.

5.5.2. Comparación de los postratamientos para el efluente del SAnMBR

El proceso UCT y los tratamientos basados en la combinación de luz, oxígeno disuelto y microalgas tratan el efluente del proceso SAnMBR, por lo que ambos se catalogan como postratamientos. Al igual que en el apartado anterior, se comparan los resultados de eliminación de ambos postratamientos con el fin de conocer qué sistema es más indicado para obtener una mejor eliminación de disruptores del agua residual. El estudio tanto del proceso UCT como el proceso combinado de luz, oxígeno disuelto y microalgas se centraron en los disruptores detectados en el efluente del SAnMBR (OP, t-NP, 4-NP y BPA), por lo que únicamente se compararon estos resultados.

Cabe destacar que los análisis realizados sobre las muestras de la planta UCT fueron sin fortificar, debido a la dificultad de modificar el caudal tratado por el sistema UCT; mientras que para el estudio combinado de luz, oxígeno disuelto y microalgas se estableció el siguiente nivel de fortificación: 3,5, 15, 10 y 10 $\mu\text{g/L}$ de OP, t-NP, 4-NP y BPA, respectivamente. Como se indica en apartados anteriores este nivel de fortificación corresponde a la concentración típica en el efluente del SAnMBR multiplicada por un factor 5.

El muestreo realizado para el afluente y efluente del postratamiento UCT se realizó con muestras integradas (24 h) y puntuales para el caso del reactor, mientras que para el experimento basado en la combinación de luz, oxígeno disuelto y microalgas fueron puntuales.

5.5.2.1. Fracción soluble

En la Tabla 37 se puede observar el promedio de las concentraciones para la fracción soluble en cada punto de muestreo para el sistema UCT. Comparando las concentraciones en el afluente del UCT, mostradas en la Tabla 37, con las concentraciones de trabajo del experimento combinado (3,5, 15, 10 y 10 µg/L de OP, t-NP, 4-NP y BPA, respectivamente), se observa que el UCT trabajó con concentraciones sensiblemente inferiores a las estudiadas en el experimento con combinación de luz, oxígeno disuelto y microalgas.

Tabla 37. El promedio de las concentraciones de los CDE (OP, t-NP, 4-NP y BPA) en los tres puntos de muestreo de sistema de postratamiento UCT.

µg/L	A _{UCT}		R _{UCT}		E _{UCT}	
	Promedio	s.d.	Promedio	s.d.	Promedio	s.d.
OP	0,59	1,04	0,12	0,17	0,07	0,17
t-NP	3,47	3,58	0,35	0,40	0,26	0,38
4-NP	LDD	n.a.	<LDD	n.a.	<LDD	n.a.
BPA	0,86	n.a.	LDD	n.a.	<LDD	n.a.

Nomenclatura: A_{UCT}: Afluente del UCT, R_{UCT}: Reactor de UCT y E_{UCT}: Efluente de UCT.
(n.a.). No aplicable.

En la Tabla 38 se muestran los rendimientos de eliminación obtenidos por los distintos tipos de procesos.

Tabla 38. Rendimientos de eliminación de los disruptores (OP, t-NP, 4-NP y BPA) para el proceso UCT y proceso combinado.

(%)	UCT	Proceso combinado				
		POM	P	PO	O	PM
OP	85,1	99,8	37,2	95,6	88,8	98,8
t-NP	92,8	100,0	36,0	92,9	88,2	99,0
4-NP	n.a.	100,0	57,3	80,1	83,3	100,0
BPA	n.a.	98,5	32,3	93,4	86,2	98,7

En la fracción soluble, se observa como los rendimientos de eliminación de los experimentos realizados en ausencia de aireación forzada (“P”) son sensiblemente inferiores a los determinados tanto para experimentos con aireación forzada (“POM”, “PO”, “O” y UCT), sobresaturado de oxígeno (“PM”).

En lo referente al proceso combinado se observa que el aumento de la concentración de oxígeno disuelto aumenta los rendimientos de eliminación, mostrando un mayor rendimiento de eliminación el experimento “PM”. Para los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “PM” la concentración de oxígeno disuelto fue de $8,65 \pm 0,15$, $8,15 \pm 0,11$, $8,11 \pm 0,12$ y $14,7 \pm 0,3$ mg O₂/L respectivamente, mientras que para el experimento “P” la concentración de oxígeno disuelto fue $1,7 \pm 0,2$ mg O₂/L.

Comparando el proceso UCT, el cual operó a una concentración de oxígeno disuelto comprendida entre 1 y 2 mg O₂/L, con los procesos combinados se observa un comportamiento similar. En este caso se obtienen mayores rendimientos de eliminación para los procesos con mayor concentración de oxígeno disuelto, es decir, los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “PM”. Respecto al 4-NP y al BPA, éstos no se pueden evaluar en el proceso UCT debido a que la concentración de ambos compuestos en el afluente se encuentra comprendida entre el LDD y LDC (ver LDD en la Tabla 4, página 123). Comparando el proceso UCT frente al experimento “P”, los cuales trabajan con concentraciones similares de oxígeno disuelto, se observa cómo los rendimientos de eliminación son superiores en el UCT. Los datos sugieren que el mayor tiempo de retención hidráulico (13 h) empleado en el proceso UCT frente a los 80 min de los experimentos combinados es el causante del mayor rendimiento de eliminación.

5.5.2.2. Fracción suspendida

Con respecto a la fracción suspendida, en la Tabla 39 se muestra la concentración de disruptor hallada en las fracciones suspendidas de ambos sistemas de postratamiento, UCT y los experimentos con microalgas (“POM” y “PM”).

Tabla 39. Concentración de los disruptores (OP, t-NP, 4-NP y BPA) hallados en las fracciones suspendidas los procesos UCT y microalgas ("POM" y "PM").

(µg/kg)	UCT	Luz, OD y microalgas	
		POM	PM
OP	6,9	42,6	35,8
t-NP	61,6	388,4	285,2
4-NP	1,7	7,0	4,1
BPA	44,0	484,7	421,0

Comparando los experimentos con microalgas se observó que las concentraciones de disruptores en la fracción suspendida del experimento "POM" fueron superiores a las del experimento "PM". Este comportamiento se explicó con la diferencia de velocidad de degradación de los disruptores, como el experimento "POM" presentó una velocidad de degradación menor a la del experimento "PM", el sistema estuvo sometido, en el experimento "POM", a un gradiente de concentración mayor, por lo que los CDE presentaron más tendencia a quedarse retenido sobre la fracción suspendida. La reducida retención sobre el fango del proceso UCT parece ser debida a la menor concentración de disruptor en el afluente (en los experimentos "POM" y "PM" es aproximadamente 5 veces superior al afluente del proceso UCT).

Los resultados parecen indicar que la concentración de oxígeno disuelto es el parámetro determinante en la degradación de los disruptores de la fase soluble y de su posterior desorción de la fracción suspendida. Los resultados sugieren que los experimentos "PM" y "POM" presentan concentraciones superiores a la del proceso UCT en la fracción suspendida debido a que también presentan una fracción soluble con concentraciones más elevadas.

Conclusiones

6. Conclusiones

Las conclusiones más relevantes que se pueden extraer del trabajo de tesis desarrollado son.

- Los microcontaminantes de estructura fenólica, presentes en la fracción soluble del agua residual, se pueden cuantificar mediante el método analítico basado en la microextracción en fase sólida (SPME) combinada con la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Los límites de detección (LDD) conseguidos se encuentran comprendidos entre 2 y 25 ng/L para OP, t-NP y 4-NP, mientras que para E1, E2, EE2 PCP y BPA los LDD se encuentran entre 200 y 600 ng/L.
- Es posible llevar a cabo la extracción de los microcontaminantes de estructura fenólica, presentes en la fracción suspendida del agua residual, mediante la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), y posterior preconcentración y cuantificación mediante la técnica SPME/GC/MS. Los LDD conseguidos se encuentran comprendidos entre 20 y 110 ng/kg para OP, t-NP y 4-NP, mientras que para E1, E2, EE2 PCP y BPA los LDD se encuentran entre 400 y 1000 ng/kg.
- La planta industrial de fangos activados (TC) operando con un tiempo de retención celular (TRC) de 5 ± 1 d y un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 4 ± 1 h permite conseguir eliminaciones superiores al 65 % para OP, 4-NP y t-NP en la fracción soluble. Además, la fracción suspendida de este proceso es capaz de retener los disruptores OP, 4-NP y t-NP en concentraciones comprendidas entre LDD y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- El proceso aerobio de membrana sumergida (aMBR) operando con un TRC de 100 ± 5 d y un TRH de 9 ± 1 h es capaz de eliminar completamente los disruptores OP, 4-NP y t-NP en la fracción soluble. La fracción suspendida del proceso aMBR presenta concentraciones de OP y 4-NP inferiores al LDD. Únicamente se detecta t-NP en una de las muestras de fango aerobio.

- La fracción soluble del agua residual tratada por un proceso anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR), operando a un TRH entre 6 y 35 h y un TRC entre 25 y 100 d, experimenta un aumento superior al 100 % en la concentración de OP y t-NP debido a la degradación de los alquifenoles polietoxilatos de cadena corta. Respecto al 4-NP y BPA, estos disruptores experimentan una degradación parcial, siendo éstas superiores al 60 %.
- La fracción suspendida del proceso SAnMBR es capaz de retener elevadas concentraciones de OP y t-NP. Un elevado TRC unido a elevadas concentraciones en la fase soluble lleva a elevadas retenciones sobre el fango anaerobio. Este comportamiento se ve favorecido por el elevado gradiente de concentración entre la fracción soluble y suspendida.
- El proceso anaerobio SAnMBR es capaz de eliminar completamente el PCP y EE2 de la fracción soluble; sin embargo la concentración de ambos disruptores en el afluente de este proceso estaba muy próxima al LDD, por lo que el estudio de su comportamiento es limitado.
- El análisis del proceso global SAnMBR-UCT muestra rendimientos de eliminación netos para todos los disruptores estudiados en la fracción soluble. Para OP y t-NP estos rendimientos son 58 y 83 % respectivamente, mientras que para el 4-NP y BPA, se observa una eliminación superior al 99 % en la fracción soluble.
- En la planta piloto SAnMBR-UCT, se observa que los disruptores que obtienen elevados rendimientos de degradación (R_{Deg}) presentan reducidos rendimientos de adsorción (R_{Ads}). Así pues, R_{Deg} (4-NP > BPA > t-NP \approx OP) mayores conducen a R_{Ads} (4-NP < BPA < t-NP \approx OP) menores. Este comportamiento se debe al diferente gradiente de concentración entre ambas fracciones.
- Respecto a la fracción suspendida de la planta piloto SAnMBR-UCT, se observa que el fango anaerobio presenta una concentración de disruptor mayor que el fango aerobio, para los disruptores detectados (OP, t-NP, 4-NP y BPA). Este comportamiento se debe al mayor gradiente de

concentración existente entre la fracción soluble y suspendida del tratamiento anaerobio. La concentración de disruptor en la fracción soluble de un proceso anaerobio es mayor, por lo que la adsorción sobre el fango se potencia. Bajo condiciones aerobias, tanto la concentración en la fracción soluble como la adsorción sobre fango aerobio son menores.

- En los ensayos de eliminación de disruptores de estructura fenólica por acción de luz, oxígeno y microalgas se observa que aquellos experimentos que trabajan bajo condiciones elevadas de oxígeno disuelto (“POM”, “PM”, “PO” y “O”), entre 8 y 14 mg O₂/L, alcanzan rendimientos de eliminación próximos al 100 % tras 90 h de exposición. El experimento que trabaja bajo condiciones reducidas de oxígeno disuelto (“P”), inferior a 3 mg O₂/L, alcanza rendimientos de eliminación comprendidos entre el 50 y el 80 % para OP, t-NP y BPA, alcanzando una eliminación completa para el 4-NP.
- Respecto a los rendimientos del postratamiento con cultivo de microalgas (“POM” y “PM”), se observa que el rendimiento del proceso de adsorción (R_{Ads}) sigue el orden 4-NP < OP < t-NP < BPA, mientras que el rendimiento del proceso de degradación (R_{Deg}), también en este sistema de tratamiento, sigue el patrón inverso 4-NP > OP > t-NP > BPA. Esta tendencia sugiere que una menor eliminación por degradación en la fase soluble conduce a una mayor eliminación por adsorción en la fase suspendida.
- Se han empleado los experimentos “POM”, “PO”, “O” y “P” para la determinación de las cinéticas de degradación de los disruptores estudiados. Estas cinéticas de degradación se explican mediante dos mecanismos independientes; mecanismo en presencia de oxígeno (oxígeno como agente oxidante) y mecanismo en presencia de luz (radical hidroxilo como agente oxidante). Se asume que ambas cinéticas son de segundo orden, tanto para el mecanismo del oxígeno como el del radical hidroxilo, y su cálculo se lleva a cabo simplificando el modelo a una cinética de pseudo-primer orden. Las constantes cinéticas de degradación de segundo orden para el mecanismo del oxígeno (k_{O₂}) están comprendidas entre 77 y 125 L·mol⁻¹·min⁻¹, mientras que para el mecanismo del radical hidroxilo las constantes cinéticas (k_{·OH}) están comprendidas entre 7,0·10⁺¹⁰ y

$6,6 \cdot 10^{+12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (para una concentración de radical hidroxilo de 10^{-15} mol/L). Estos valores indican que el radical hidroxilo es mejor oxidante que el oxígeno, sin embargo, la reducida concentración del radical hidroxilo en el medio de reacción hace que sea el mecanismo del oxígeno el que controle la degradación de los disruptores.

- En los ensayos de eliminación de disruptores de estructura fenólica por acción de luz, oxígeno y microalgas se observa que las constantes cinéticas de degradación observadas (k_{obs}), aumentan con la concentración de oxígeno disuelto. El experimento que trabaja a $14 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ("PM") presenta una k_{obs} superior a las k_{obs} observadas para los experimentos que trabajan a concentraciones próximas a $8 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ("POM", "PO" y "O"). Asumiendo que la constante de pseudo-primer orden del radical hidroxilo permanece constante (concentración de nitrato e intensidad de luz constantes), se determina que es la constante de pseudo-primer orden del oxígeno (k'_{O_2}) la que experimenta este aumento, siendo ésta (k'_{O_2}) directamente proporcional al aumento de la concentración de oxígeno disuelto.
- El modelo cinético se ha validado, empleando las constantes cinéticas determinadas en la etapa de calibración con los experimentos "POM", "PO", "O" y "P", bajo las condiciones experimentales del experimento "PM". El modelo cinético establecido reproduce satisfactoriamente los datos experimentales de los cuatro microcontaminantes estudiados (OP, 4-NP, t-NP y BPA) bajo condiciones diferentes a las empleadas para la calibración del modelo.
- La comparación entre procesos aerobios y anaerobios muestra que un proceso bajo condiciones aerobias produce eliminaciones próximas al 100 % en la fracción soluble. Respecto a un proceso que trabaje bajo condiciones anaerobias, éste produce eliminaciones incompletas para 4-NP y BPA, mientras que para OP y t-NP las condiciones anaerobias producen un aumento de su concentración en la fracción soluble.
- El empleo de un proceso anaerobio como tratamiento secundario requiere un postratamiento aerobio para conseguir eliminaciones elevadas de

disruptores. En este sentido, es posible acoplar el efluente del proceso anaerobio a un proceso aerobio de fangos activados o de cultivo de microalgas que permita mejorar tanto la eliminación de disruptores como de nutrientes. Mientras que un postratamiento de fangos activados necesita energía para airear el medio de reacción, un cultivo de microalgas trabajando únicamente con microalgas y luz (según lo descrito en el experimento "PM") es capaz producir in-situ concentraciones elevadas de oxígeno disuelto sin necesidad de aporte energético.

Desarrollos Futuros

7. Desarrollos futuros

El desarrollo de la presente tesis supone un avance en el conocimiento de los procesos de eliminación de CDE en aguas residuales. Esta investigación deja abierta nuevas líneas de investigación, a continuación se presentan las que se consideran más interesantes.

7.1. Métodos analíticos

- Mejorar los LDD de los compuestos estudiados, especialmente E1, E2, EE2 y PCP, para así poder estudiar correctamente el comportamiento de estos compuestos en los tratamientos estudiados, calcular los balances de masa correspondientes y determinar las cinéticas de degradación.
- Desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación de APEO, los precursores de OP y t-NP para determinación conjunta tanto de los precursores como de los metabolitos.
- Comprobar si es posible analizar las nuevas sustancias prioritarias incluidas en la Directiva 2013/39/UE y desarrollar, para las que sea posible, los métodos analíticos que permitan su análisis y control.

7.2. Degradación de los disruptores endocrinos

- Desarrollo de experimentos que permitan comprender la degradación de los disruptores endocrinos mediante el empleo de los oxidantes más comunes en las EDAR, tales como ozono, hipoclorito sódico o radiación ultravioleta, los cuales se encuentran incluidos mayoritariamente dentro de un tratamiento terciario (Ning et al., 2007).
- Ampliar los estudios cinéticos de degradación de todos los disruptores en fango anaerobio y aerobio. Monitorizar la degradación de los disruptores tanto fango anaerobio de la etapa SAnMBR como fango aerobio de la etapa UCT, determinando de esta manera las cinéticas de degradación bajo dichas condiciones.

- Estudiar la degradación de los APEO en los procesos estudiados. Así como, determinar su cinética de degradación tanto en condiciones aerobias como anaerobias.
- Transferir la tecnología obtenida en el estudio a escala laboratorio de depuración con microalgas a una planta piloto. Puesta a punto de dicha planta piloto, diseñada como postratamiento al tratamiento secundario SAnMBR y determinando los parámetros operacionales óptimos para la obtención de los mejores rendimientos de eliminación.
- Estudiar el comportamiento de las nuevas sustancias prioritarias incluidas en la Directiva 2013/39/UE en las plantas descritas en la presente tesis.
- Identificación de los productos de degradación de los disruptores estudiados (OP, t-NP, 4-NP, BPA, PCP, E1, E2, EE2).

7.3. Degradación de los disruptores endocrinos en una planta piloto con cultivo de microalgas

En el apartado 5.4.2 de la presente tesis se ha estudiado la eliminación de CDE mediante un cultivo de microalgas, este experimento se ha realizado a escala laboratorio y etiquetado como “PM”. El siguiente paso a estudiar en este campo es la transferencia de esta tecnología desde la escala laboratorio a planta piloto. El 31 de Mayo de 2014 empezó a trabajar en continuo una planta piloto con cultivo de microalgas (PPCM), ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet (Alboraiá, Valencia). En esta planta únicamente fue posible llevar a cabo unos pocos estudios preliminares, restando para futuros desarrollos un estudio completo y pormenorizado del comportamiento de los CDE en este proceso. Se realizó un muestreo el 22 de Julio de 2014. En la Figura 45 se muestra el diagrama de flujo de la PPCM.

La PPCM se diseñó como un postratamiento, por lo que el agua tratada corresponde con el permeado del proceso secundario SAnMBR. La PPCM consistió en un tanque de homogeneización intermedio aireado (340 L) con el fin de reducir la concentración de sulfuro en el afluente, el cual interfiere en el proceso biológico y produce problemas de corrosión. El programa de aireación se estableció como: 150 s de aireación y 1200 s sin aireación. Tras esta etapa se alimentó en continuo

cuatro fotobiorreactores (FBR), con un volumen total de cada FBR de 625 L (550 L volumen de reacción). Posteriormente el efluente se filtró mediante dos tanques de membranas de ultrafiltración (TM), con un volumen total de cada TM de 1000 L (800 L de volumen de trabajo y 200 L de volumen de espaciado de cabeza). Cada uno de los TM incluye un módulo de membrana de ultrafiltración de fibra hueca (PURON® Koch Membrane Systems) (PUR-PSH31) de 0,05 μm de tamaño de poro. Y cada uno de estos módulos consiste en 9 haces de fibras huecas de 1,8 m de longitud, lo que da un total de 31 m^2 de superficie de membrana por módulo. El permeado obtenido se almacena en dos tanques CIP de 250 L de volumen cada uno, los cuales se emplean en la etapa de contralavado del módulo de membranas.

Las condiciones de operación entre el 31 de Mayo de 2014 y el 17 de Septiembre de 2014 fueron: TRC de 8 ± 1 d y un TRH de $3,0\pm 0,8$ d. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo entre $8,9\pm 1,1$ mg O_2/L . Las principales características observadas del afluente tratado fueron las concentraciones de amonio y fosfato de 59 ± 4 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$ y $7,2\pm 0,5$ mg $\text{P-PO}_4^{3-}/\text{L}$.

Como se puede observar en la Figura 45 la principal diferencia entre la PPCM y el experimento "PM" se centra en el empleo de una corriente de CO_2 para el control del pH y aporte de una fuente de carbono inorgánico. Los FBR presentan recirculación del espaciado de cabeza con el fin de aprovechar el CO_2 .

El muestreo llevado a cabo en la planta piloto se diseñó con el fin de determinar los rendimientos de degradación de los CDE en un proceso basado en cultivo de microalgas a escala planta piloto. Los puntos de muestreo elegidos fueron afluente (situado en el tanque de homogeneización intermedio), efluente (situado tras la unión de ambos tanques CIP) y reactor de algas (situado en FBR3).

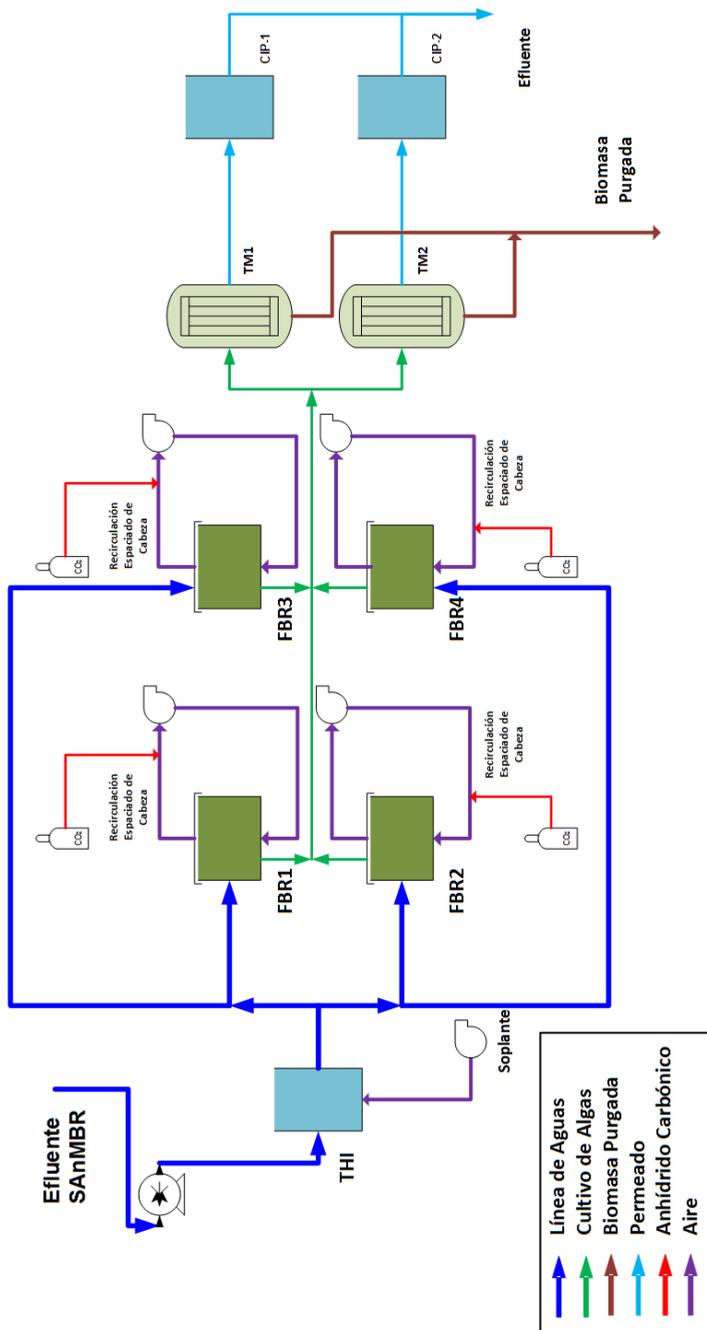


Figura 45. Diagrama de flujo del postratamiento a escala planta piloto y basada en cultivo de microalgas. Nomenclatura: **THI**: Tanque de homogeneización intermedio; **FBR**: Fotobiorreactor; **TM**: Tanque de membrana y **CIP**: Clean-in-place.

En la Tabla 40 se muestran las concentraciones halladas de los disruptores en la fracción soluble.

Tabla 40. Concentraciones de los CDE en la fracción soluble de los puntos de muestreo establecidos para la PPCM.

μg/L	Fracción Soluble		
	A _{FBRM}	R _{FBRM}	E _{FBRM}
OP	0,041	LDD	LDD
t-NP	2,325	0,164	LDD
4-NP	<LDD	<LDD	<LDD
BPA	0,685	<LDD	<LDD
PCP	<LDD	<LDD	<LDD
E1	<LDD	<LDD	<LDD
E2	<LDD	<LDD	<LDD
EE2	<LDD	<LDD	<LDD

A_{PPCM}: Afluente del PPCM; R_{PPCM}: Reactor del PPCM y E_{PPCM}: Efluente del PPCM
(n.a.). No aplicable.

Se puede observar como el cultivo de microalgas es capaz de eliminar los disruptores de la fracción soluble. En el OP y el t-NP se observa una elevada reducción de la concentración. A pesar de que el BPA se elimina completamente de la fracción soluble, este valor no es representativo, ya que la concentración en el afluente es muy reducida (comprendida entre el LDD y LDC). Respecto a 4-NP, PCP, E1, E2 y EE2, las concentraciones en el afluente fueron inferiores al LDD por lo que no se pudieron evaluar.

En la Tabla 41 se muestran las concentraciones de disruptor halladas en la fracción suspendida del FBR3.

Tabla 41. Concentraciones de los CDE en la fracción suspendida del fotobiorreactor de la PPCM.

μg/kg	Fracción suspendida							
	OP	t-NP	4-NP	BPA	PCP	E1	E2	EE2
R _{FBRM}	0,080	0,158	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD

A_{PPCM}: Afluente del PPCM; R_{PPCM}: Reactor del PPCM y E_{PPCM}: Efluente del PPCM
(n.a.). No aplicable.

Los reducidos valores de OP y t-NP detectado en el fango (R_{PPCM}) sugieren que, al igual que ocurre en el postratamiento UCT, en el tratamiento aerobio con microalgas el proceso de adsorción sobre la fracción suspendida no se encuentra favorecido. Comparando estos valores con los de los procesos aerobios UCT y TC (Tabla 7 y Tabla 13, en las páginas 129 y 139) se observa que el cultivo de microalgas es capaz de retener concentraciones menores de disruptor que UCT y TC. Este comportamiento se debe a la elevada concentración de oxígeno en el reactor de la PPCM ($8,9 \pm 1,1$ mg O_2/L).

Al tratarse de un proceso en continuo, el balance de masa se calcula según las ecuaciones del apartado 5.4.1.3. En la Tabla 42 se muestra el balance de masa realizado para los disruptores OP, t-NP y BPA, el resto no se incluyen debido a las bajas concentraciones detectadas en el proceso.

Tabla 42. Balances de masa correspondientes a OP, t-NP y 4-NP para la planta PPCM.

$\mu g/d$	F_A	F_E	F_P	G	R_{Ads}	R_{Deg}
OP	30,07	0,45	0,31	29,31	0,0052	97,5
t-NP	1705,00	11,75	24,03	1669,22	0,0002	97,9
BPA	502,33	0,00	0,00	502,33	0,0000	100,0

F_A : Caudal másico en el Afluente; F_E : Caudal másico en el Efluente; F_P : Caudal másico en la purga; G: Generación; R_{Ads} : Rendimiento de Adsorción y R_{Deg} : Rendimiento de Degradación

Se puede observar como para OP y t-NP se obtienen rendimientos de degradación superiores al 97 %, mientras que para el BPA la degradación es completa. Respecto al rendimiento de adsorción, se observa que estos valores son inferiores al 0,005 %, revelando su reducida tendencia a retención sobre un fango aerobio de microalgas.

Comparando los rendimientos de degradación (R_{Deg}) para OP y t-NP obtenidos en ambos postratamientos aerobios (PPCM y UCT), se observa como un proceso basado en PPCM produce rendimientos de degradación mayores (superior al 97 %) que los obtenidos en el proceso UCT (comprendidos entre el 84 y el 92 %) (ver Tabla 14, página 144). Mientras que para el BPA, éste no se puede evaluar en los procesos

PPCM y UCT, debido a que la concentración de BPA en el afluente de ambos procesos se encuentra comprendida entre el LDD y LDC (ver Tabla 4, página 123). Respecto a los rendimientos de adsorción (R_{Ads}) se puede observar como el proceso UCT presenta valores superiores (entre 0,1 y 0,6 %) a los obtenidos para el proceso PPCM (inferiores al 0,005 %). Los resultados sugieren que la PPCM es capaz de eliminar más disruptores de la fracción soluble que el proceso UCT, mientras que es el proceso UCT el que es capaz de eliminar más disruptores mediante el mecanismo de adsorción. Sin embargo, y con el fin de llevar a cabo una correcta comparación entre ambos postratamientos, es necesario un estudio más detallado de la PPCM.

Anexos

Anexo I. Acrónimos y nomenclatura

4-NP	4-n-nonilfenol
AGV	Ácidos grasos volátiles
aMBR	Biorreactor aerobio de membranas
BPA	Bisfenol-A
CE	Comisión Europea
CIP	Clean-in-Place
DQO	Demanda química de oxígeno
DBO	Demanda biológica de oxígeno
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -etinilestradiol
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EI	Impacto electrónico
F _E	Flujo de masa de CDE efluente
F _A	Flujo de masa de CDE afluente
F _P	Flujo de masa de CDE purga
G	Generación
GC/MS	Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espaciado de cabeza
MBR	Biorreactores de membrana
LC	Límites de confianza
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
M _A	Masa de CDE en el afluente
M _E	Masa de CDE en el efluente
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
PMC	Peso molecular de corte
NCA	Normas de calidad ambiental
OD	Oxígeno disuelto
OI	Ósmosis Inversa
OP	Octilfenol
PA	Poliacrilato
PCP	Pentaclorofenol
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
PPCM	Planta piloto de cultivo de microalgas

RFA	Radiación Fotosintéticamente Activa
s_b	Desviación estándar de la pendiente
RSD	Desviación estándar relativa
R_{Ads}	Rendimiento de eliminación por adsorción
R_{Deg}	Rendimiento de eliminación por degradación
R_{Elim}	Rendimiento de eliminación
SAnMBR	Biorreactor anaerobio de membrana sumergida
SIM	Modo seguimiento de iones específicos
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SST	Sólidos suspendidos totales
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
t-NP	4-nonilfenol (ramificado)
TC	Tratamiento Convencional de fangos activados
TRC	Tiempo de retención celular
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UCT	University of Cape Town

Anexo II. Vista general de las plantas piloto

En este anexo se presenta una vista general de las plantas piloto estudiadas.

En la Figura 46 se muestra la planta piloto SAnMBR, en la Figura 47 la planta piloto aMBR, en la Figura 49 la planta piloto UCT y en la Figura 49 la planta PPCM.



Figura 46. Vista general de la planta SAnMBR.



Figura 47. Vista general de la planta piloto aMBR.



Figura 48. Vista general de la planta piloto UCT.



Figura 49. Vista general de la planta piloto PPCM.

Anexo III. Propiedades cromatográficas, espectrales y físicas de los disruptores endocrinos

En la Tabla 43 se muestran la estructura química, el coeficiente de reparto octanol-agua y las características cromatográficas de los CDE estudiados en la presente tesis.

Tabla 43. Estructura química, tiempo de retención, iones de cuantificación y característicos de los compuestos analizados. Los valores del coeficiente de partición octanol-agua (expresado como $\log K_{ow}$) para los compuestos ha sido predicho por el software informático ALOGPS 2.1 desarrollado por Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCLAB, 2005; Tetko et al., 2005). Entre paréntesis se muestra la abundancia relativa de cada ion.

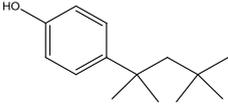
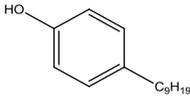
Compuesto	$\log K_{ow}$	Tiempo de retención (min)	Ion de cuantificación	Iones característicos
 Octilfenol (OP)	4,9	8,67	135 (100%)	107 (15%)
 4-n-nonilfenol (4-NP). Donde C_9H_{19} es una cadena lineal.	5,8	10,19	107 (100%)	220 (20%)

Tabla 43. Continuación.

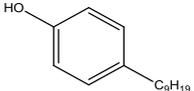
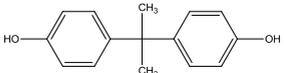
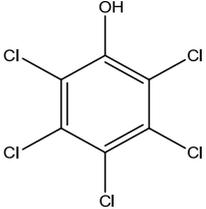
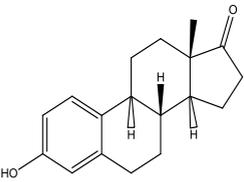
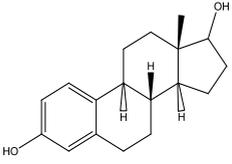
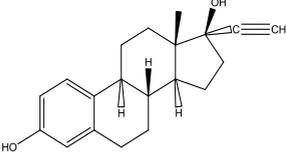
Compuesto	log K _{ow}	Tiempo de retención (min)	Ion de cuantificación	Iones característicos
 <p>t-nonilfenol (t-NP). Donde C₉H₁₉ es una cadena ramificada.</p>	5,7	9,20-9,70	135 (100%)	107 (13%)
 <p>Bisfenol-A (BPA)</p>	3,6	11,82	213 (100%)	228 (25%) 119 (20%)
 <p>Pentaclorofenol (PCP)</p>	4,7	9,74	266 (100%)	268 (65%) 264 (64%)
 <p>Estrona (E1)</p>	3,6	14,46	270 (100%)	146 (38%) 185 (37%)
 <p>17β-estradiol (E2)</p>	3,8	14,61	272 (100%)	160 (69%) 146 (62%)

Tabla 43. Continuación.

Compuesto	log Kow	Tiempo de retención (min)	Ion de cuantificación	Iones característicos
	4,0	15,12	213 (100%)	296 (55%) 160 (36%)
17α-etinilestradiol (EE2)				

Anexo IV. Espectros de masas

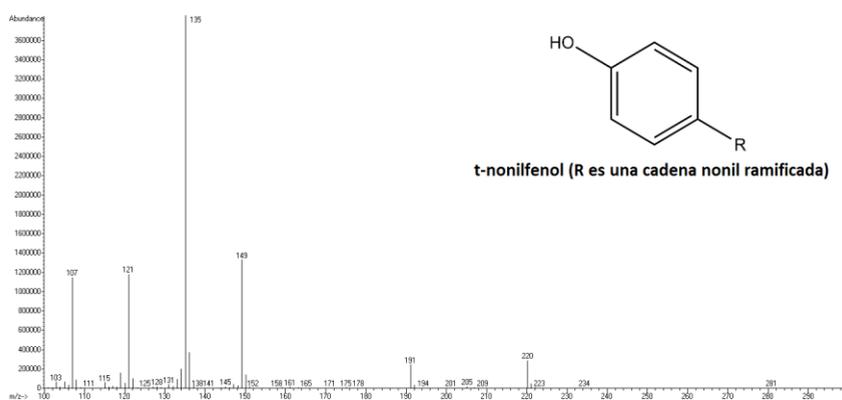
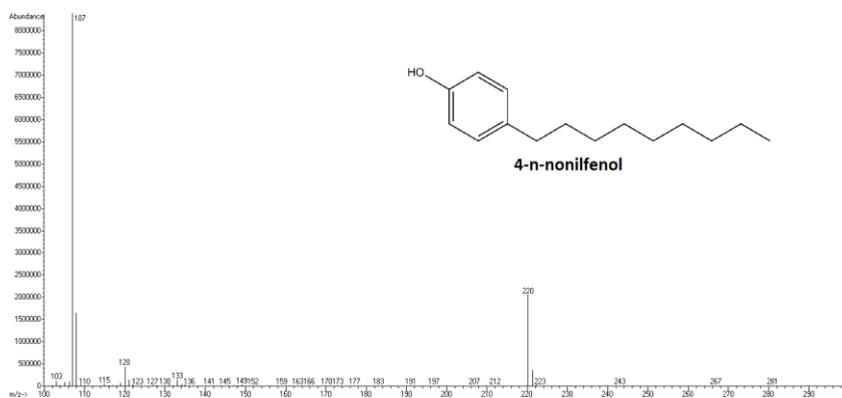
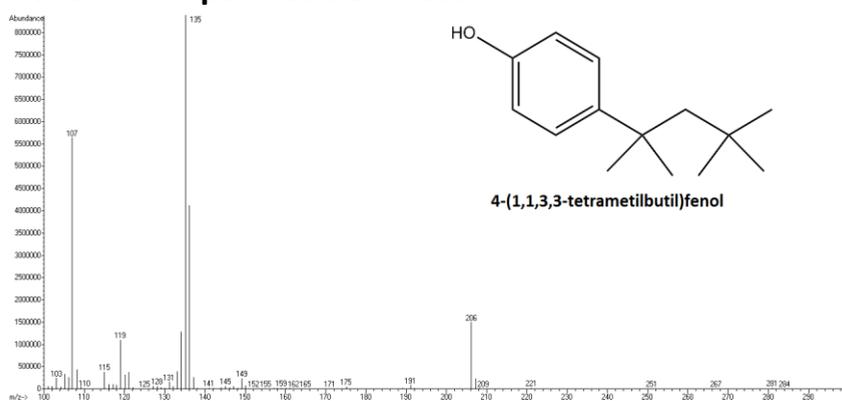


Figura 50. Espectro de masas para cada uno de los CDE estudiados en modo barrido completo (intervalo de trabajo comprendido entre 100 y 300 m/z), a un nivel de concentración de 5 $\mu\text{g/L}$ cada uno.

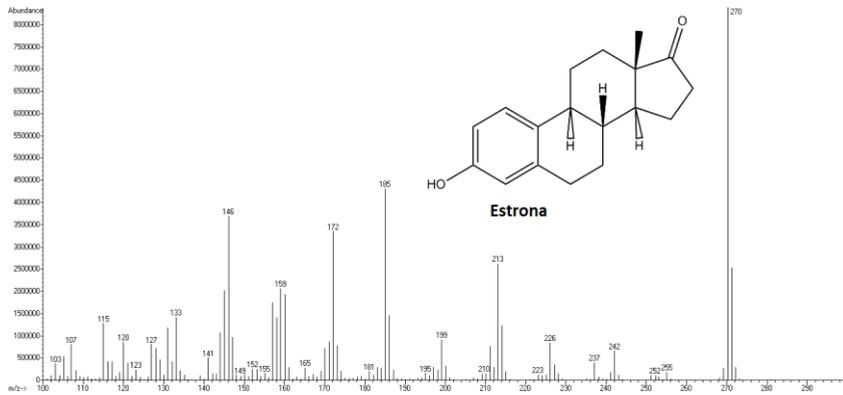
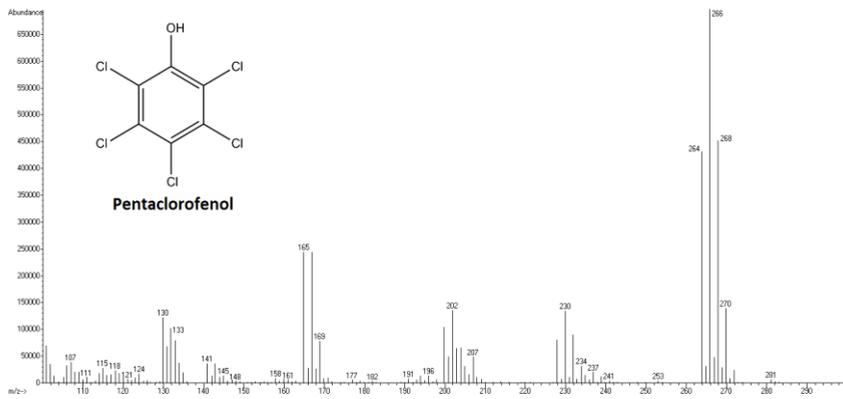
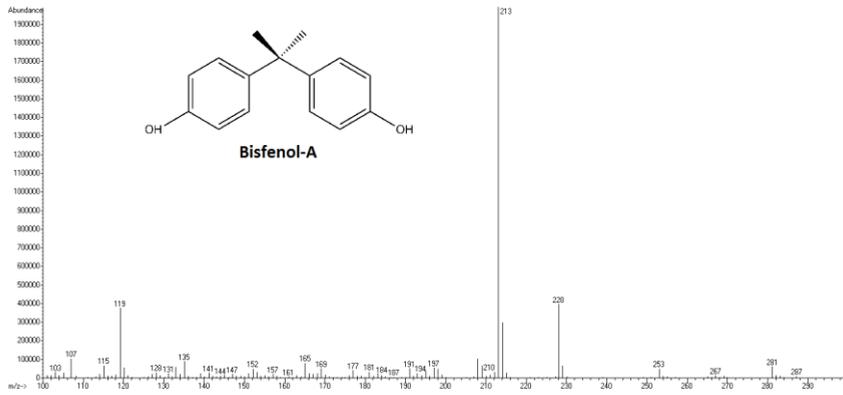


Figura 50. Continuación.

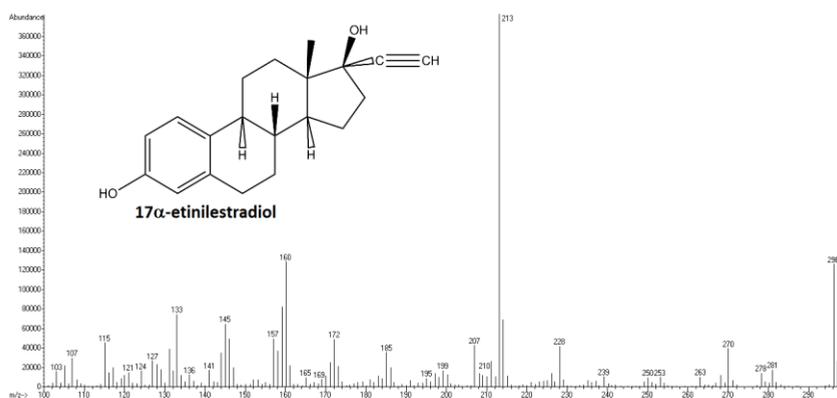
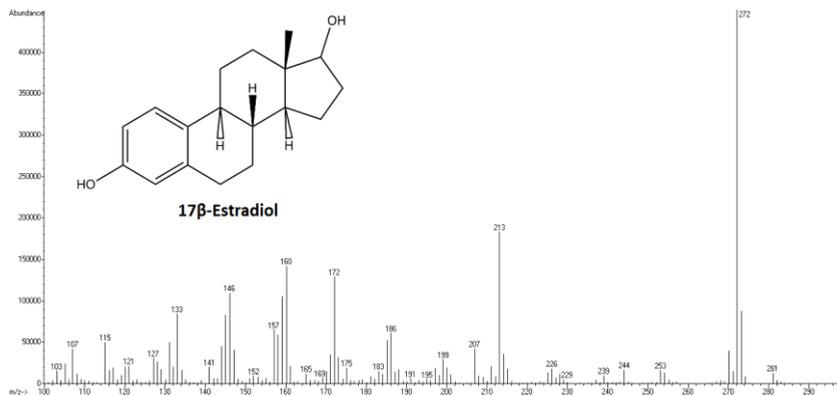


Figura 50. Continuación.

Anexo V. Mantenimiento del equipo cromatográfico

Con el fin de disponer del equipo cromatográfico calibrado, se establecen unas operaciones de mantenimiento que permitan asegurar el correcto funcionamiento del equipo. Dichas tareas se realizaron de forma preventiva con el fin de evitar problemas de funcionamiento tales como; reducción de la sensibilidad o desgastes excesivos de piezas. De este modo, la vida útil tanto del sistema como de los diferentes materiales aumenta.

Fibras de SPME

Previo a su primer uso, y según información proporcionada por el fabricante, las fibras han de someterse a un proceso de acondicionamiento, el cual varía en función del material de la misma. Éste proceso se basa en someter a la fibra a una temperatura concreta (250 – 280 °C) durante un tiempo determinado (0,5 – 1 h).

La elevada temperatura a la que se someten las fibras en el proceso de desorción produce su deterioro y por lo tanto se reduce su capacidad de adsorción/absorción por parte de los analitos. Por lo que es necesario establecer un protocolo para controlar y sustituir las fibras deterioradas. La sustitución de éstas se realiza cuando la señal producida por un patrón no cumple el criterio de aceptación establecido. Dicho criterio de aceptación establece que la variación de la señal para una determinada concentración (1 µg/L de cada analito estudiado) debe estar comprendida entre el ±10% de la señal producida por un patrón de la misma concentración medido en las primeras etapas de uso de la fibra (inferior a 10 usos).

Cromatógrafo de gases.

Para asegurar que la columna cromatográfica se encuentre en perfecto estado es necesario llevar a cabo dos tipos de comprobaciones, sangrado columna y fugas.

El sangrado de columna se define como la señal de fondo generada por la fase estacionaria de la columna que se ha desprendido, en el caso de la columna empleada (HP-5ms Ultra Inert) dicho sangrado se puede medir con los iones $m/z=207$ y 281 . Un sangrado bajo implica un mejor ruido de fondo, lo que se

traduce en una mejor sensibilidad y una cuantificación más precisa a causa de la reducción de la relación señal/ruido. Además en el caso de un MSD el sangrado de columna es una fuente de iones que no provienen del soluto, disolvente y/o fase móvil, por lo que si se minimiza el sangrado los espectros de masas obtenidos se asemejan más a los espectros generados por los analitos aislados. Además, un bajo sangrado implica una menor contaminación del detector.

Las fugas es el problema más frecuente en cromatografía gaseosa. Éstas provienen de uniones mal ajustadas o contaminaciones del gas portador. La eliminación del gas portador contaminado se soluciona de forma puntual purgando la línea de gas y de forma preventiva mediante la instalación, y correcto mantenimiento, de una trampa de gases. Las fugas ocasionadas por uniones mal ajustadas se solucionan mediante la elección de las férulas correctas y su correcto ajuste mediante las tuercas adecuadas (el fabricante proporciona información sobre los consumibles más adecuado para cada equipo). La detección de fugas en las uniones del equipo se realiza mediante el uso de un gas propulsor (Perfluortributilamina, PFTBA), cuyos iones característicos son el 69 y 83. El empleo selectivo e independiente de dicho gas sobre todas y cada una de las juntas sospechosas de presentar fugas, así como la configuración del MSD para la detección selectiva de estos dos iones, confirma y localiza la fuga.

Detector de espectroscopia de masas

El fabricante proporciona junto con el software del equipo, un conjunto de herramientas informáticas cuya finalidad es comprobar el estado del detector, así como ejecutar su auto-calibración. Las herramientas básicas son: a) AutoTune, la cual, mediante una sustancia patrón interna (PFTBA), optimiza las condiciones de operación del MSD, mejorando el rendimiento; b) Tune Evaluation, la cual comprueba que todos los parámetros del MSD están en el rango adecuado; c) Air and Water Check, la cual genera un informe para evaluar la presencia de aire y agua.

En los tres casos el sistema genera un informe, indicando las operaciones o comprobaciones que se han efectuado tras la ejecución de cada herramienta y el valor final de cada parámetro y si estos se encuentran en el intervalo operacional adecuado.

Mediante los valores EMVolts y peaks proporcionados por la herramienta AutoTune se puede detectar la suciedad de la fuente de iones. En la Figura 51 se muestra un ejemplo del informe de resultados proporcionado por esta herramienta. Dicha suciedad produce que el potencial del electromultiplicador aumente, siendo su valor máximo 3000 V. Elevados valores del electromultiplicador acortan la vida de dicho elemento, por lo que es conveniente establecer un protocolo de limpieza cuando se detecten valores elevados. Se establece como protocolo de limpieza que tras un valor de EMVolts superior a 2500 V y/o un valor de peaks superior a 300, se ejecuta una operación de limpieza de la fuente de iones, según la información proporcionada por el fabricante.

Asimismo, la abundancia relativa, relación isotópica y anchura de picos del patrón PFTBA proporcionan información general sobre el correcto funcionamiento del detector. Los fragmentos de PFTBA empleados para la calibración son: 69, 219 y 502. La abundancia relativa de los fragmentos 69 y 219 debe ser superior al 30 %, mientras que la del fragmento 502 debe ser superior al 3 %. La relación isotópica especificada por el fabricante debe ser 1,1, 4,4 y 9,9 para los fragmentos 69, 219 y 502 respectivamente. Por último, la anchura correspondiente a los picos (medido con el parámetro Pw50) debe estar comprendida en el intervalo $0,6 \pm 0,1$.

La herramienta Tune Evaluation informa sobre el correcto funcionamiento del equipo, mostrando si los resultados de las comprobaciones efectuadas se encuentran dentro de los parámetros especificados por el fabricante. En la Figura 52 se muestra un ejemplo del informe proporcionado por esta herramienta.

La herramienta Air and Water Check informa sobre la proporción de gases en el sistema. Esta proporción debe ser inferior al 10 % (respecto a la sustancia patrón PFTBA) en todos los casos, y la relación entre los iones 28 (nitrógeno) y 32 (oxígeno) estar próxima a 4:1. En la Figura 53 se muestra un ejemplo del informe final proporcionado por esta herramienta.

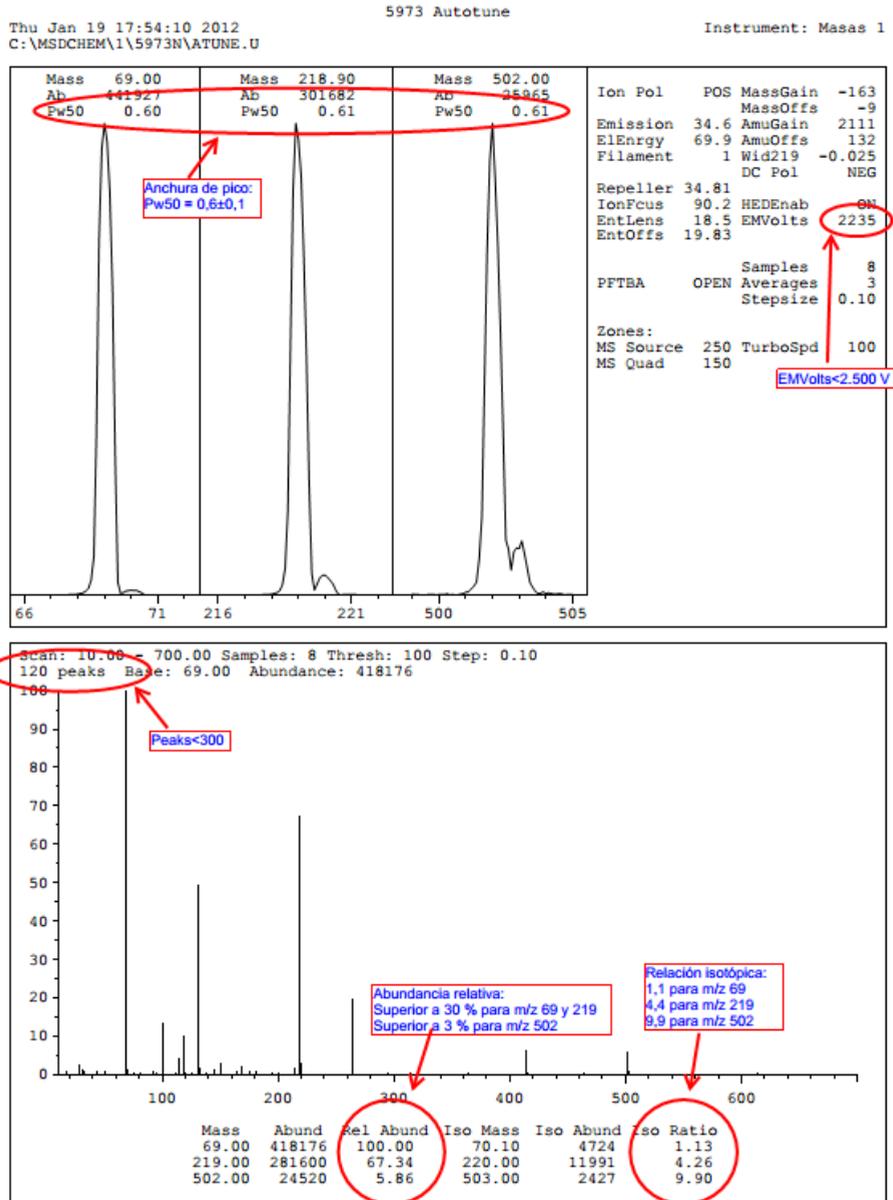


Figura 51. Informe de resultados de la herramienta AutoTune.

System Verification - Tune (Detector Optimization) Portion

Instrument Name	: Masas 1		
DC Polarity	: Negative		
Filament	: 1		
BasePeak should be 69 or 219		Ok	
Position of mass 69	69.00	Ok	
Position of mass 219	219.00	Ok	
Position of mass 502	502.09	Ok	
Position of isotope mass 70	70.03	Ok	
Position of isotope mass 220	220.00	Ok	
Position of isotope mass 503	503.09	Ok	
Ratio of mass 70 to mass 69(0.5 - 1.6%)	1.08	Ok	
Ratio of mass 220 to mass 219(3.2 - 5.4%)	4.21	Ok	
Ratio of mass 503 to mass 502(7.9 - 12.3%)	9.84	Ok	
Ratio of 219 to 69 should be > 40% and is	85.95	Ok	
Ratio of 502 to 69 should be > 2.4% and is	6.79	Ok	
Mass 69 Precursor (<= 3%)	0.28	Ok	
Mass 219 Precursor (<= 6%)	0.65	Ok	
Mass 502 Precursor (<= 12%)	1.18	Ok	
Testing for a leak in the system			
Ratio of 18 to 69 (<20%)	0.45	Ok	
Ratio of 28 to 69 (<10%)	1.48	Ok	
Electron Multiplier Voltage	2141	Ok	

Tune portion of System Verification passed.

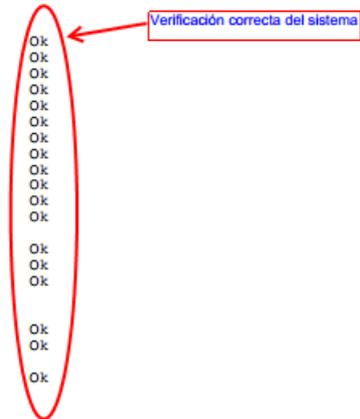
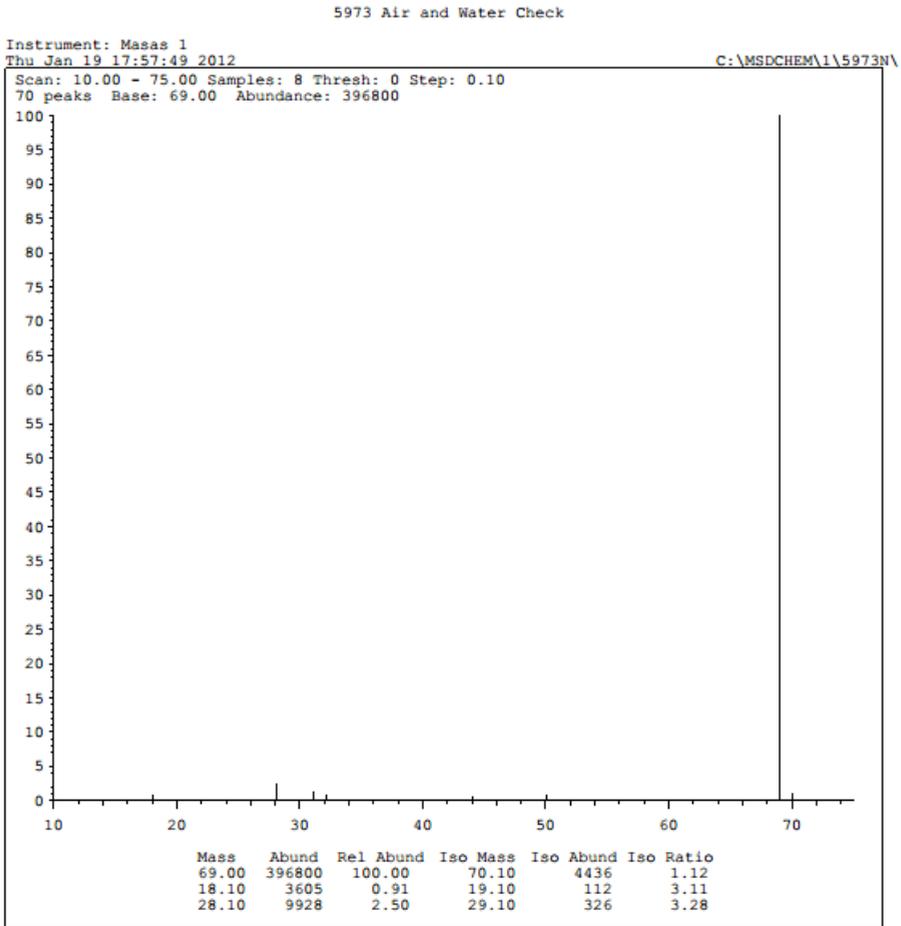


Figura 52. Informe de resultados de la herramienta Tune Evaluation.



Current Params used: ATUNE.U

Relative abundances:

18/69 = 0.91	Water%
28/69 = 2.50	Nitrogen%
32/69 = 0.85	Oxygen%
44/69 = 0.66	Carbon Dioxide%
28/18 = 275.40	Nitrogen/Water%

Abundancias relativas < 10 % para:
 m/z: 18, 28, 32 y 44.
 Relación entre 28 y 32 aproximadamente 4:1

Figura 53. Informe de resultados de la herramienta Air and Water Check.

Anexo VI. Gráficas de calibración del modelo cinético

En el presente anexo se muestra la representación gráfica de la etapa de calibración entre los datos experimentales y el ajuste cinético para los cuatro disruptores estudiados, OP, t-NP 4-NP y BPA, así como para cada uno de los experimentos empleados en la etapa de calibración, "POM", "PO", "O" y "P". Al igual que en el capítulo 5.4.2.3.3, donde se validó el modelo cinético, los ajustes se llevaron a cabo con la Ecuación 31 (página 184), empleando las constantes de la Tabla 25 (página 176). Los valores de k_{obs} empleados fueron:

$$k_{obs,1} = (k_{O_2} + s.d.) \cdot [O_2] + k_{OH} \cdot [\cdot OH]$$

$$k_{obs,2} = k_{O_2} \cdot [O_2] + k_{OH} \cdot [\cdot OH]$$

$$k_{obs,3} = (k_{O_2} - s.d.) \cdot [O_2] + k_{OH} \cdot [\cdot OH]$$

En la Figura 54, la Figura 55, la Figura 56 y la Figura 57 se muestran las gráficas para el OP y los experimentos "POM", "PO", "O" y "P" respectivamente.

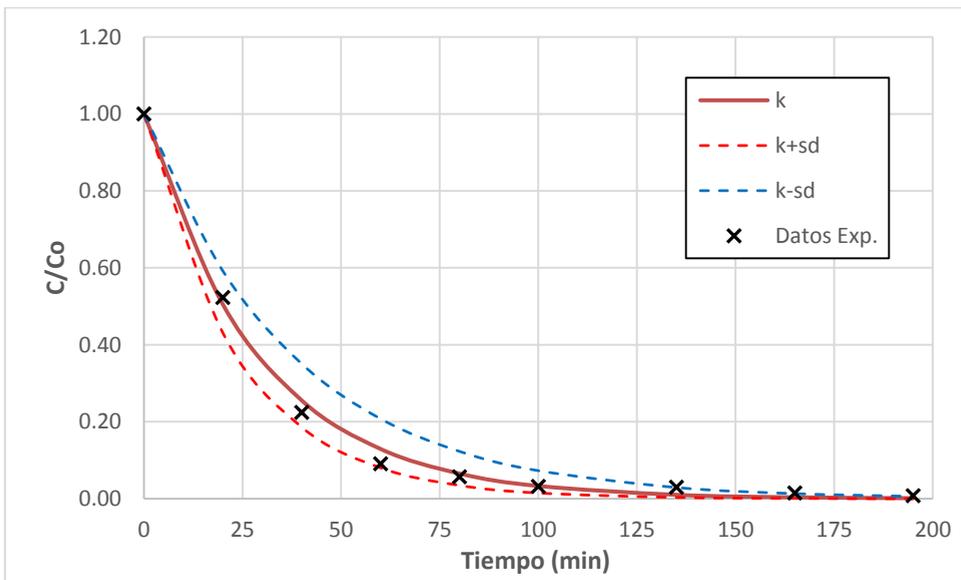


Figura 54. Gráfica de calibración del experimento "POM" para el disruptor OP.

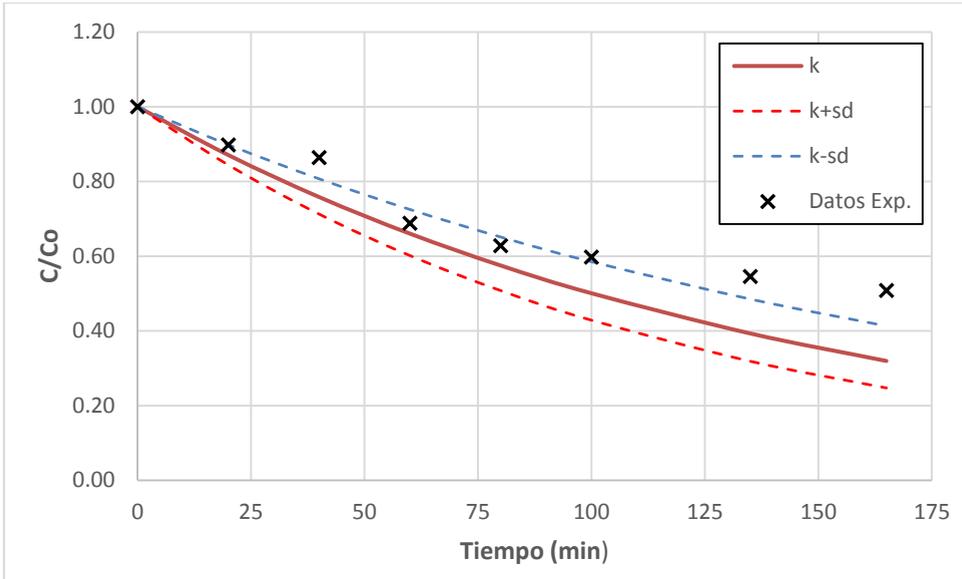


Figura 55. Gráfica de calibración del experimento "P" para el disruptor OP.

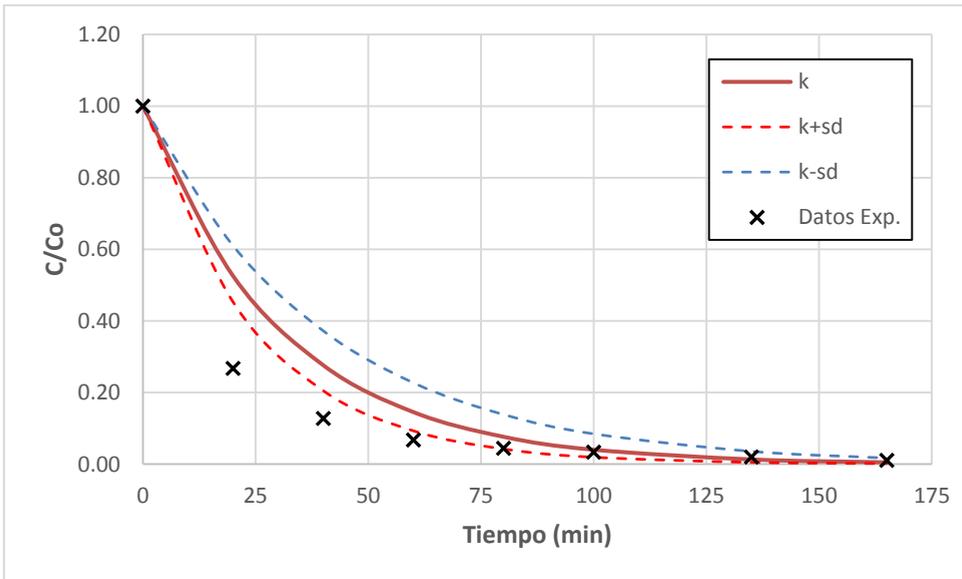


Figura 56. Gráfica de calibración del experimento "PO" para el disruptor OP.

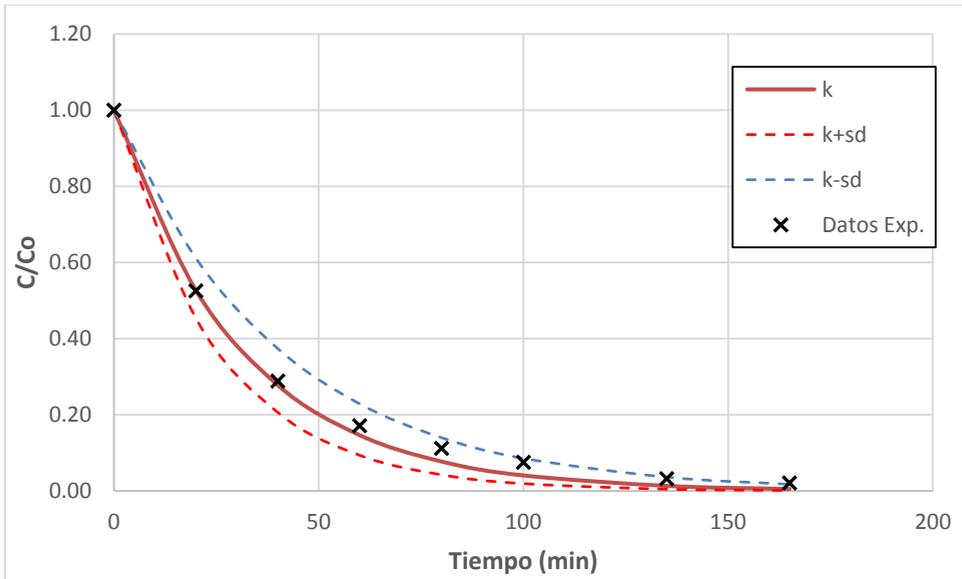


Figura 57. Gráfica de calibración del experimento "O" para el disruptor OP.

En la Figura 58, la Figura 59, la Figura 60 y la Figura 61 se muestran las gráficas para el t-NP y los experimentos "POM", "PO", "O" y "P" respectivamente.

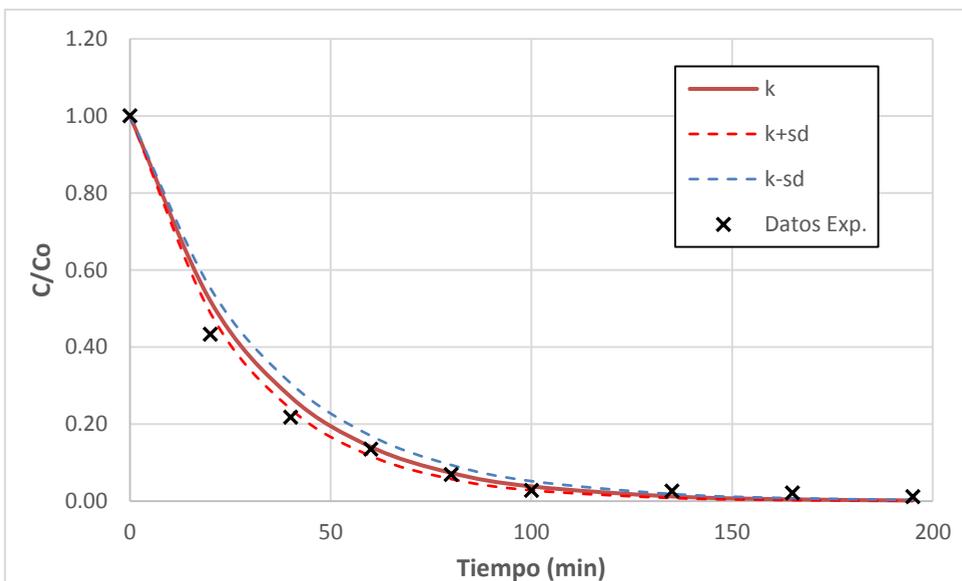


Figura 58. Gráfica de calibración del experimento "POM" para el disruptor t-NP.

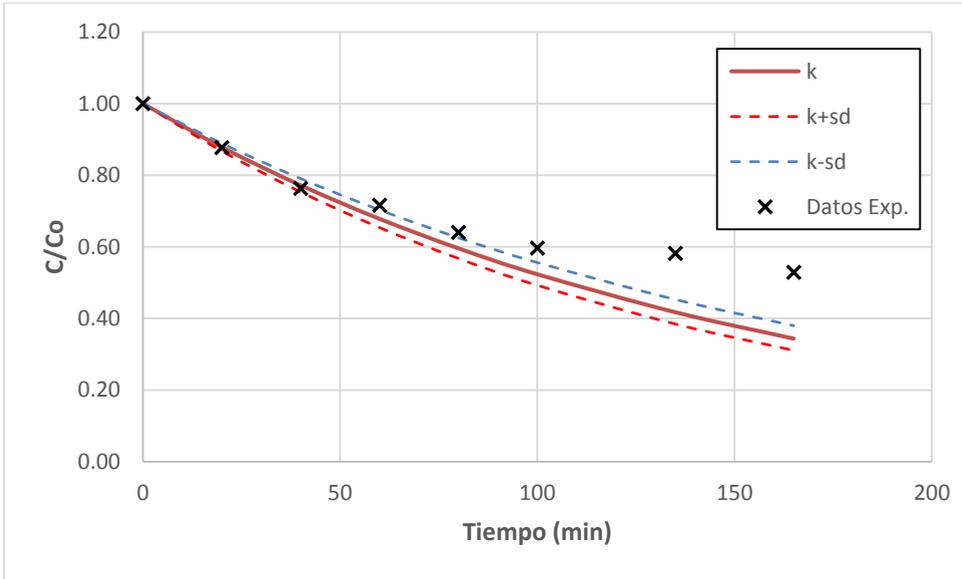


Figura 59. Gráfica de calibración del experimento "P" para el disruptor t-NP.

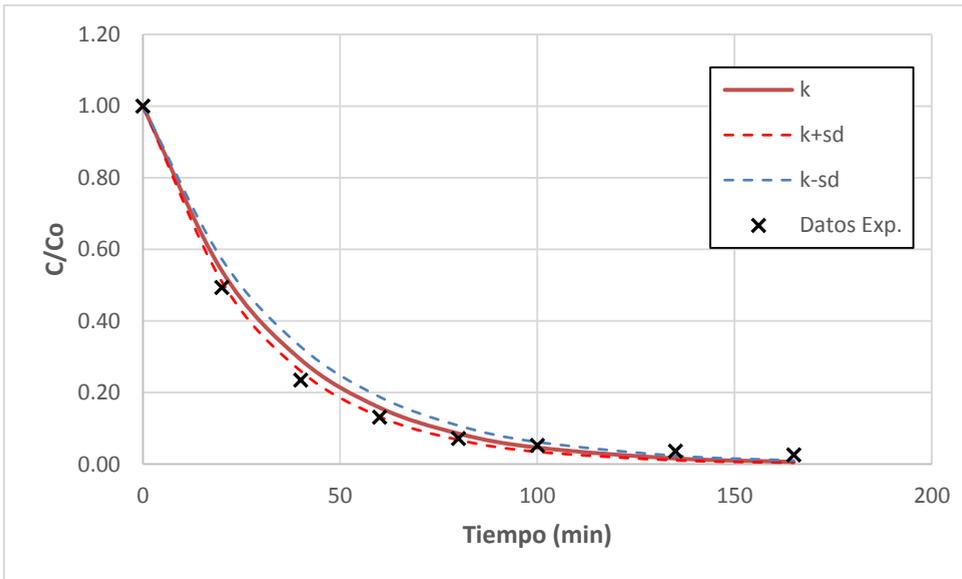


Figura 60. Gráfica de calibración del experimento "PO" para el disruptor t-NP.

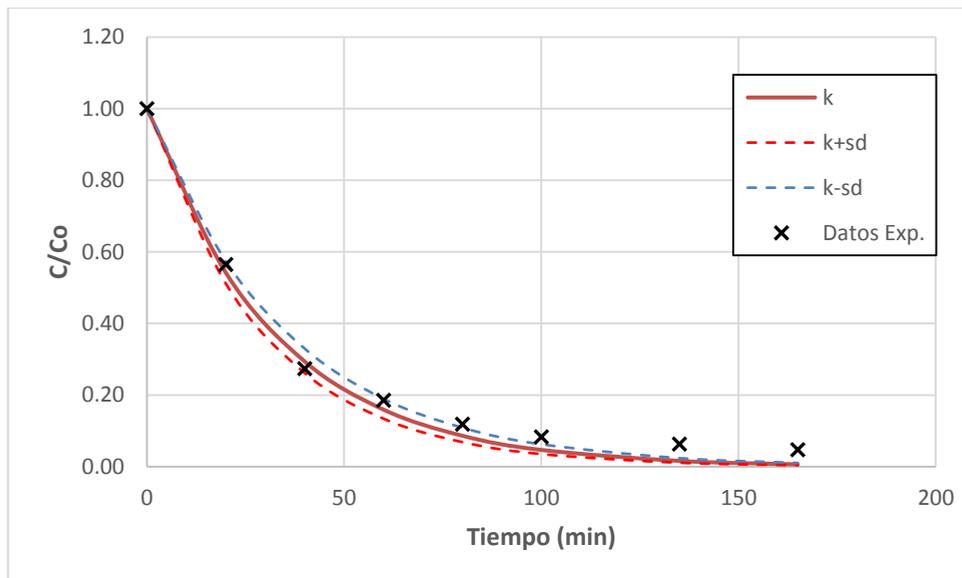


Figura 61. Gráfica de calibración del experimento "O" para el disruptor t-NP.

En la Figura 62, la Figura 63, la Figura 64, la Figura 65 se muestran las gráficas para el 4-NP y los experimentos "POM", "PO", "O" y "P" respectivamente.

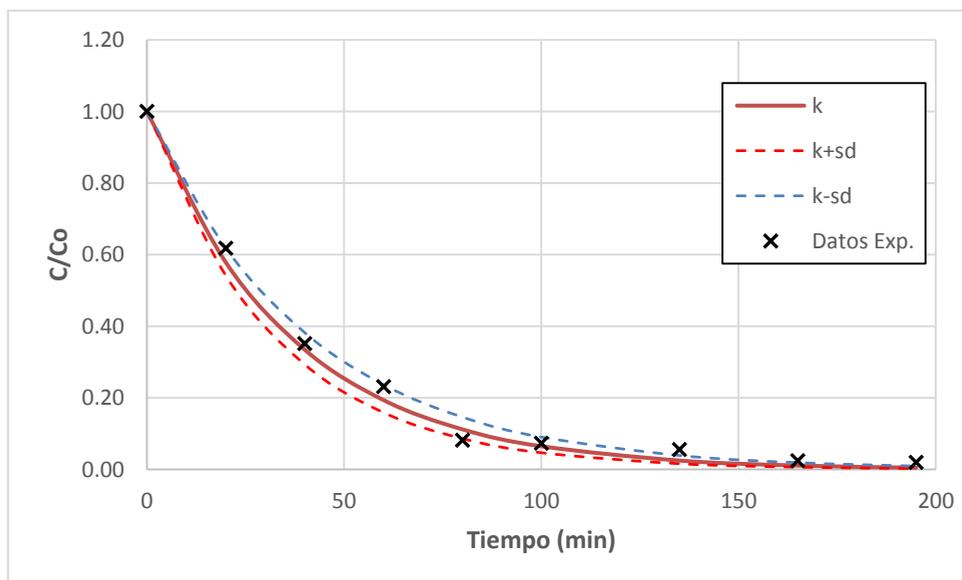


Figura 62. Gráfica de calibración del experimento "POM" para el disruptor 4-NP.

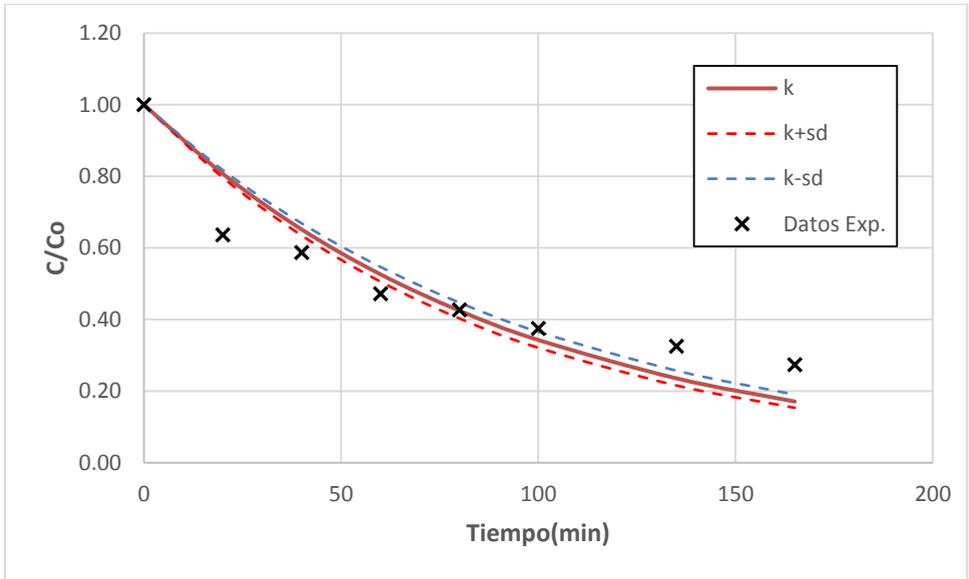


Figura 63. Gráfica de calibración del experimento "P" para el disruptor 4-NP.

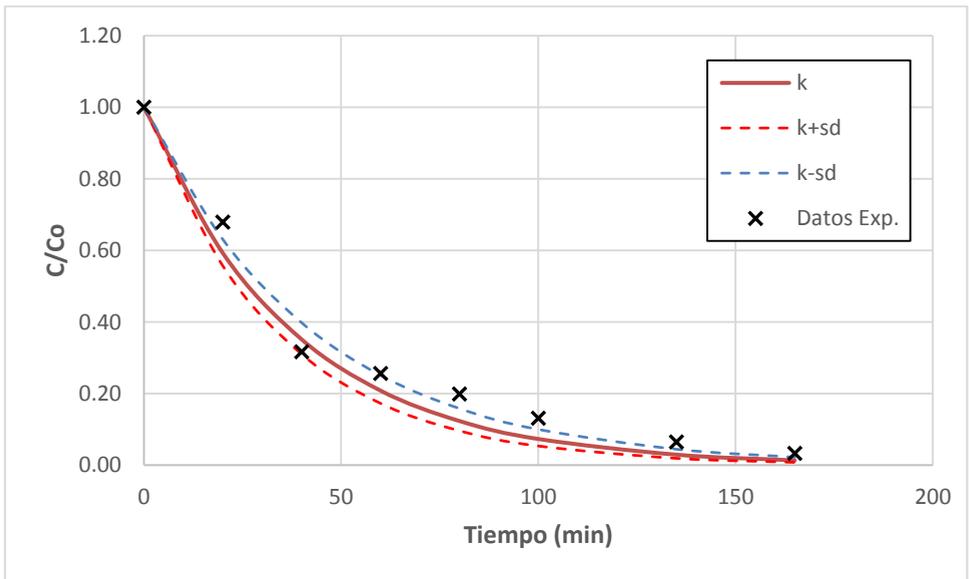


Figura 64. Gráfica de calibración del experimento "PO" para el disruptor 4-NP.

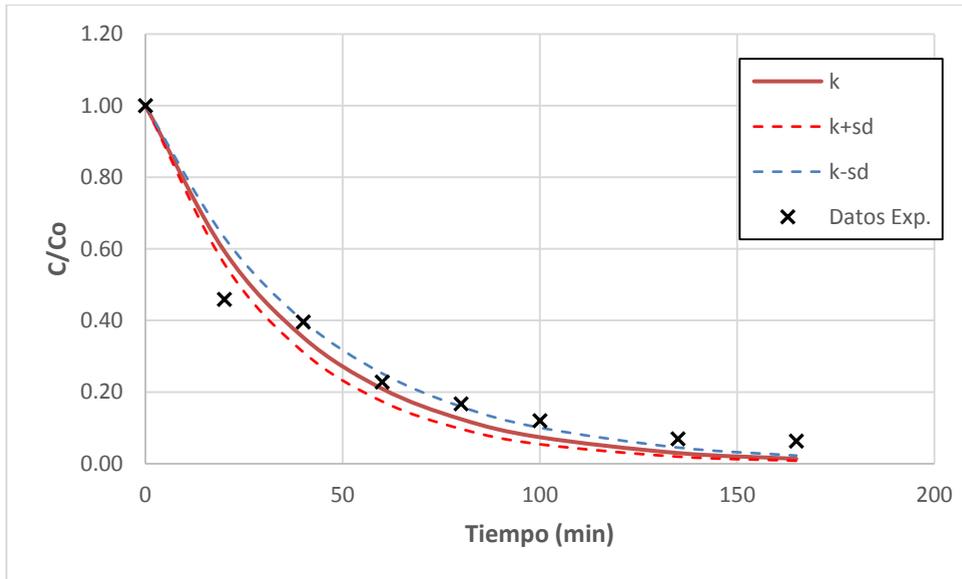


Figura 65. Gráfica de calibración del experimento "O" para el disruptor 4-NP.

En la Figura 66, la Figura 67, la Figura 68 y la Figura 69 se muestran las gráficas para el BPA y los experimentos "POM", "PO", "O" y "P" respectivamente.

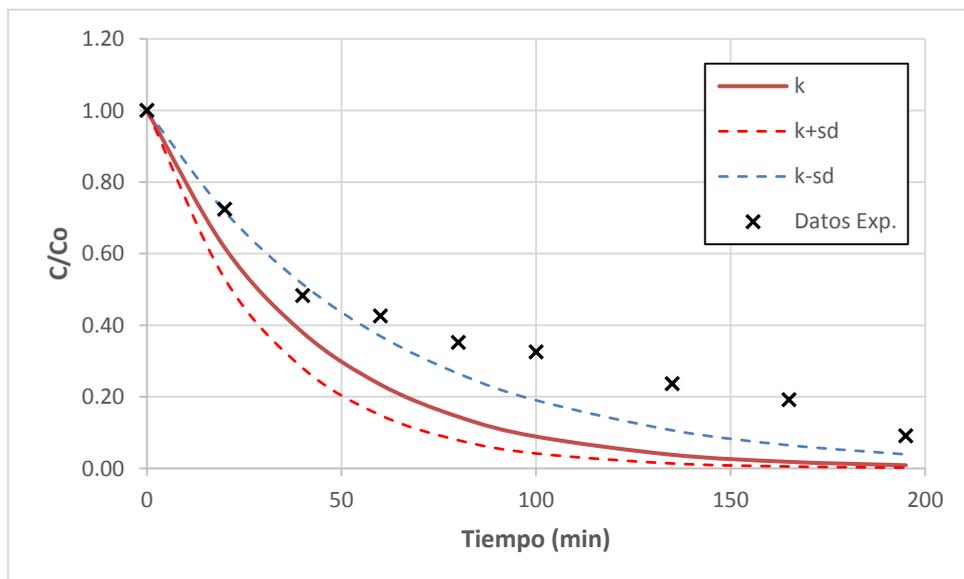


Figura 66. Gráfica de calibración del experimento "POM" para el disruptor BPA.

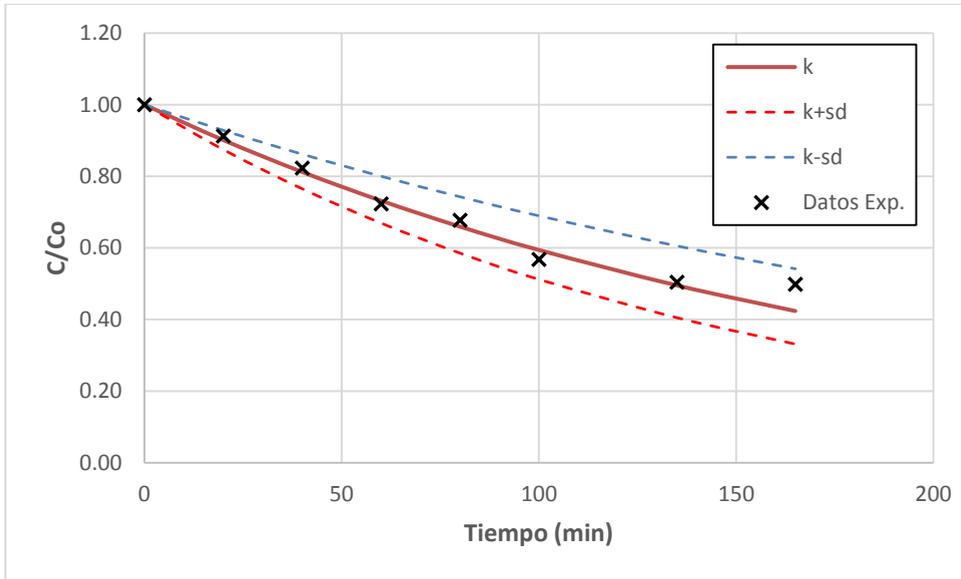


Figura 67. Gráfica de calibración del experimento "P" para el disruptor BPA.

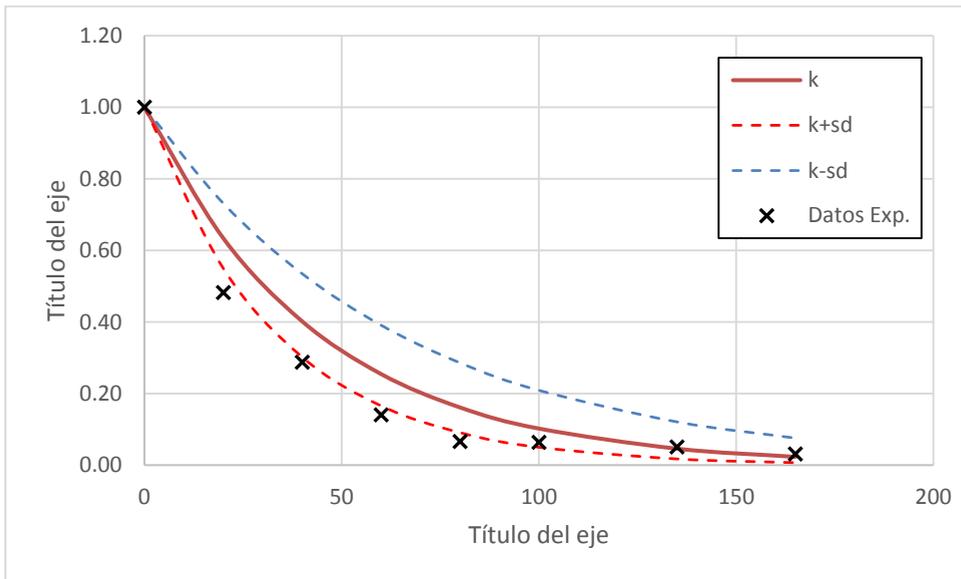


Figura 68. Gráfica de calibración del experimento "PO" para el disruptor BPA.

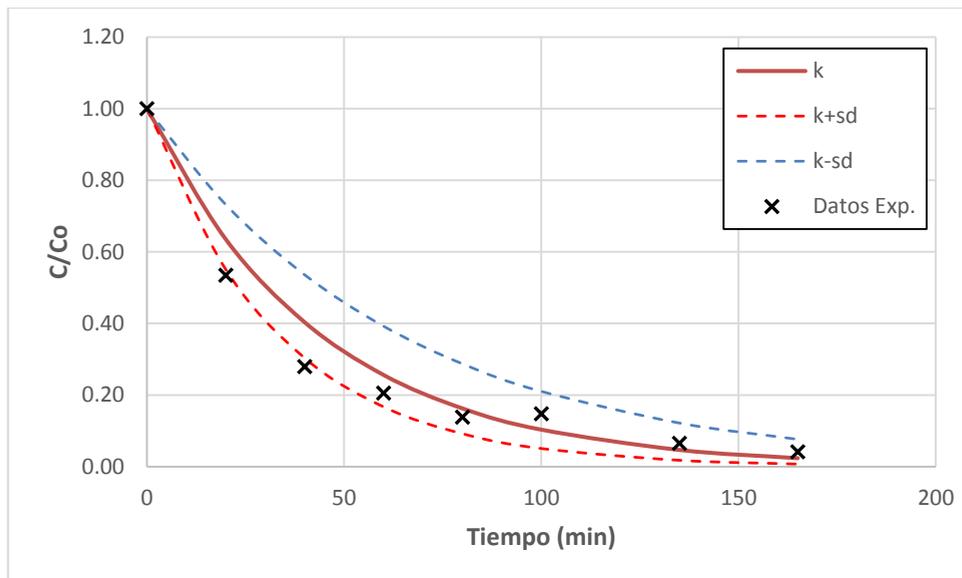


Figura 69. Gráfica de calibración del experimento "O" para el disruptor BPA.

Referencias y Bibliografía

Referencias y Bibliografía

A

- Abe K., Takahashi E., Hirano M. (2008). Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.*, 20, 283–288.
- Alpendurada M.F. (2000). Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 889, 3–14.
- Ambrosini S., Shinde S., De Lorenzi E., Sellergren B. (2012). Glucuronide directed molecularly imprinted solid-phase extraction: isolation of testosterone glucuronide from its parent drug in urine. *Analyst*, 137, 249-254.
- Andersen H., Siegrist H., Halling-Sørensen B., Ternes T.A. (2003). Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 4021–4026.
- APHA, (2005). Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC. ISBN 0-87553-047-8.
- Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
- Ashby J. (2001) Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans. *Toxicology Letters*, 120, 233–242.

B

- Bahn Müller S., Gunten U., Canonica S., (2014). Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents. *Water Research*, 57, 183-192.
- Bhattacharya S.K., Yuan Q., Jin P. (1995). Removal of pentachlorophenol from wastewater by combined anaerobic-aerobic treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 49, 143-154.

- Beard A.P., Rawlings N.C. (1999). Thyroid function and effects on reproduction in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol (PCP) from conception. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 58, 509-530.
- Bester K. (2004). Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. *Chemosphere*, 57, 863–870.
- Bouzas A., Aguado D., Martí N., Pastor J.M., Herráez R., Campins P., Seco A. (2011). Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves. *Environ. Monit. Assess.*, 176, 169–181.
- Box G.E.P., Hunter J.S. (1961). The 2^{k-p} Fractional Factorial Designs Part I. *Technometrics*, 3, 311-351.
- Brennan M., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.

C

- Campins-Falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Molins-Legua C., Herráez-Hernández R. (2008). New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211, 13–21.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M. (2007). Calculation Methods to Perform Mass Balances of Micropollutants in Sewage Treatment Plants. Application to Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.*, 41, 884-890.
- Careri M., Elviri L., Mangia A., Zagnoni I. (2003). Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Determination of Octylphenol and Nonylphenol in Municipal Wastewater at Trace Levels. *Chromatographia*, 57, 321-327.
- Castenholz R.W. (1977). The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs II. Yellowstone National Park. *Microbial Ecology*, Volume 3, 79-105.

- Cerniglia C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- Chang B.V., Chiang F., Yuan S.Y. (2005). Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere*, 59, 1415–1420.
- Cirja M., Zuhlke S., Ivashechkin P., Schaffer A., Corvini P.F.X. (2006). Fate of a ¹⁴C-Labeled Nonylphenol Isomer in a Laboratory-Scale Membrane Bioreactor. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 6131-6136.
- Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss, H. (2005a) The solid retention time-a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res.*, 39, 97-106.
- Clara M., Strenn B., Gans O., Martinez E., Kreuzinger N. and Kroiss H. (2005b) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39, 4797–4807.
- Clara M., Strenn B., Saracevic E., Kreuzinger N. (2004). Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere*, 56, 843-851.
- Cleuvers M. (2005). Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199–205.
- Comerton A.M., Andrews R.C., Bagley D.M. (2009). The influence of natural organic matter and cations on fouled nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 327, 155–163.
- Comisión Europea 2000. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. L327/1.
- Comisión Europea 2008. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 348/84.

- Comisión Europea 2013. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea. L 226/1.
- Conka K., Drobna B., Kocan A., Petrik J. (2005). Simple solid-phase extraction method for determination of polychlorinated biphenyls and selected organochlorine pesticides in human serum. *Journal of Chromatography A*, 1084, 33–38.
- Correa-Reyes G., Viana M.T., Marquez-Rocha F.J., Licea A.F., Ponce E., Vazquez-Duhalt R. (2007). Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. *Chemosphere* 68, 662–670.
- Corvini P.F.X., Schaffer A. Schlosser D. (2006a). Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols—our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 223–243.
- Corvini P.F.X., Hollender J., Ji R., Schumacher S., Prell J., Hommes G., Priefer U., Vinken R., Schäffer A. (2006b). The degradation of α -quaternary nonylphenol isomers by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 involves a type II ipso-substitution mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 114–122.

D

- Dalrymple R.M., Carfagno A.K., Sharpless C.M. (2010). Correlations between Dissolved Organic Matter Optical Properties and Quantum Yields of Singlet Oxygen and Hydrogen Peroxide. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 5824–5829
- de-Bashan L.E., Bashan Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101, 1611–1627.
- de Weert J., Viñas M., Grotenhuis T., Rijnaarts H., Langenhoff A., (2010). Aerobic nonylphenol degradation and nitro-nonylphenol formation by microbial cultures from sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 761–771.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*. 32, 1549–1558.

Directiva del Consejo de 21 de marzo de 1991 por la que se modifica por novena vez la Directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (91/173/CEE). Diario Oficial nº L 085 de 05/04/1991 p. 0034 - 0036.

Doong R., Chang S. (2000). Determination of Distribution Coefficients of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.*, 72, 3647-3652.

Drews A. (2010). Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. *Journal of Membrane Science*, 363, 1–28.

E

Eisert R., Levsen K. (1996). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, 733, 143–157.

Eisert R., Pawliszyn J. (1997). Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 69, 3140-3147.

Estrada-Arriaga E. B., Mijaylova P. (2011). Calculation methods to perform mass balance of endocrine disrupting compounds in a submerged membrane bioreactor: fate and distribution of estrogens during the biological treatment. *Water Science & Technology*, 64, 2158–2168.

European Commission, (2002). European Union Risk Assessment Report, 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol. Final report. Special Publication I.02.69.

European Commission, (2011). Proposal for a Directive 2011/0429 (COD) of the European Parliament and of the Council, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. <http://eur-lex.europa.eu/procedure/EN/201297#1210478>

European Commission, (2013). A Water Blueprint for Europe. Publications Office of the European Union, Luxembourg. DOI: 10.2779/12145.

F

- Ferrer J., Seco A. (2003). Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales. Editorial de la UPV.
- Flint S., Markle T., Thompson S., Wallace E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management* 104, 19-34.
- Fuchs W., Binder H., Mavrias G., Braun R. (2003). Anaerobic treatment of wastewater with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit. *Water Research* 37, 902–908.

G

- Gabriel F.L.P., Giger W., Guenther K., Kohler H.P.E. (2005). Differential Degradation of Nonylphenol Isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar., 1123–1129.
- Gallignani M., Ayala C., Brunetto M., Burguera J.L., Burguera M. (2005). A simple strategy for determining ethanol in all types of alcoholic beverages based on its on-line liquid–liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR. *Talanta*, 68, 470–479.
- Ge L., Deng H., Wu F., Deng N. (2009). Microalgae-promoted photodegradation of two endocrine disrupters in aqueous solutions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84, 331-336.
- Gerhard I., Frick A., Monga B., Runnebaum B. (1998). Pentachlorophenol Exposure in Women with Gynecological and Endocrine Dysfunction. *Environmental Research*, A80, 383-388.
- Giger W., Brunner P.H., Schaffner C. (1984). 4-Nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants. *Science, New Series*, Vol. 225, No. 4662, 623-625.
- Giménez J.B., Robles A., Carretero L., Durán F., Ruano M.V., Gatti M.N., Ribes J., Ferrer J., Seco. A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology*, 102, 8799–8806.

- Giménez García J.B. (2014). Estudio del tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas en biorreactores de membranas. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química, Universitat de València.
- van Ginkel C.G. (1996). Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation* 7, 151-164.
- González S., Petrovic M., Barcelo D. (2007) Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater—Comparison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere*, 67, 335–343.
- Gold L.S., Sawyer C.B., Magaw R., Backman G.M., de Veciana M., Levinson R., Hooper N.K., Havender W.R., Bernstein L., Peto R., Pike M.C., Amest B.N. (1984). A Carcinogenic Potency Database of the Standardized Results of Animal Bioassays. *Environmental Health Perspectives*. 58, 9-319.
- Gorecki T., Khaled A., Pawliszyn J. (1998). The effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction. Part 2. Experimental verification. *Analyst*, 123, 2819–2824.
- Gorecki T., Pawliszyn J. (1997). Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-phase Microextraction. Part 1. Theoretical Considerations. *Analyst*, 122, 1079–1086.
- Gorecki T., Yu X., Pawliszyn J. (1999). Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst*, 124, 643–649.
- Grobbelaar J.U. (2004) Mineral nutrition. In: Richmond A (ed). *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford, pp 97–115.
- Guenther K., Kleist E., Thiele B. (2006). Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 542–546.

H

- Halling-Sorensen B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* 40, 731-739.
- Hempel F., Bozarth A.S., Lindenkamp N., Klingl A., Zauner S., Linne U., Steinbüchel A., Maier U.G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial Cell Factories*, 10, 81.
- Hernández J.P., de-Bashan L.E., Bashan Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 190–198.
- Holbrook R.D., Novak J.T., Grizzard T.J., Love N.G. (2002). Estrogen Receptor Agonist Fate during Wastewater and Biosolids Treatment Processes: A Mass Balance Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 4533-4539.
- Holbrook R.D., Love N.G., Novak J.T. (2004). Sorption of 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol by Colloidal Organic Carbon Derived from Biological Wastewater Treatment Systems. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3322-3329.
- Hu J., Jin F., Wan Y., Yang M., An L., An W., Tao S. (2005). Trophodynamic Behavior of 4-Nonylphenol and Nonylphenol Polyethoxylate in a Marine Aquatic Food Web from Bohai Bay, North China: Comparison to DDTs. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 4801-4807.
- Huang L., Gan L., Wang N., Quan X., Logan B.E., Chen G. (2012). Mineralization of pentachlorophenol with enhanced degradation and power generation from air cathode microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 2211-2221.
- Huang L., Gan L., Zhao Q., Logan B.E., Lu H., Chen G. (2011). Degradation of pentachlorophenol with the presence of fermentable and non-fermentable co-substrates in a microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 102, 8762–8768.
- Huang Z., Ong S.L., Ng H.Y. (2010). Submerged anaerobic membrane bioreactor for low-strength wastewater treatment: Effect of HRT and SRT on treatment performance and membrane fouling. *Water Research* 45, 705-713.
- Huck C.W., Bonn G.K. (2000). Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885, 51–72.

I

Ike M., Chen M.Y., Danzl E., Sei K., Fujita M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water. Sci. Technol.*, 53, 153-159.

J

Jacobs L.E., Weavers L.K., Chin Y.P. (2008). Direct and indirect photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in nitrate-rich surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 27, 8, 1643–1648.

Janex-Habibi M.L., Huyard A., Esperanza M., Bruchet A. (2009). Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. *Water Research* 43, 1565–1576.

Jobling S., Sumpter J.P. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* Vol. 27, Issues 3-4, 361-372.

Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P. Sumpter J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15, 194–202.

Johnson A.C., Belfroid B., Di Corcia A. (2000). Estimation of steroid estrogens inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total. Environ.*, 256, 163–173.

Johnson A.C., Sumpter, J.P. (2001). Removal of endocrine disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703.

Johnson B.O., Burke F.M., Harrison R., Burdette S. (2012). Quantitative Analysis of Bisphenol A Leached from Household Plastics by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (SPME-GC-MS). *J. Chem. Educ.*, 89, 1555-1560.

- Jonkers N., Knepper T.P., de Voogt P. (2001). Aerobic Biodegradation Studies of Nonylphenol Ethoxylates in River Water Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 335-340.
- Joss A., Andersen H., Ternes T., Richle P.R., Siegrist H. (2004). Removal of estrogens in municipal waste-water treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3047-3055.
- Judd S., Judd C. (2011). *The MBR Book. Principles and Applications of Membrane Bioreactors for Water and Wastewater Treatment*. Elsevier, Oxford, Second edition.
- Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D. (2005). Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology*, 151, 45-57.
- K**
- Kajiwara N., Kunisue T., Kamikawa S., Ochi Y., Yano S., Tanabe S. (2006). Organohalogen and organotin compounds in killer whales mass-stranded in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. *Marine Pollution Bulletin* 52, 1066-1076.
- Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43, 363-380.
- Keri R.A., Ho S.M., Hunt P.A., Knudsen K.E., Soto A.M., Prins G.S. (2007). An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 24, 240-252.
- Khan G.A., Lindberg R., Grabic R., Fick J. (2012). The development and application of a system for simultaneously determining anti-infectives and nasal decongestants using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66, 24-32.
- Kim S., Lee Y., Hwang S.J. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 511-516.

- Klekner V., Kosaric N. (1992). Degradation of phenols by algae. *Environ. Technol.*, 13, 493–501.
- Kloskowski A., Pilarczyk M., Namiesnik J. (2009). Membrane Solid-Phase Microextractions. A New Concept of Sorbent Preparation. *Anal. Chem.* 81, 7363–7367.
- Koziel J.A., Noah J., Pawliszyn J. (2001). Field Sampling and Determination of Formaldehyde in Indoor Air with Solid-Phase Microextraction and On-Fiber Derivatization. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1481-1486.
- Koziel J.A., Novak I. (2002). Sampling and sample-preparation strategies based on solid-phase microextraction for analysis of indoor air. *Trends in analytical chemistry*, 21 (12), 840-850.
- Kraume M., Drews A. (2010). Membrane Bioreactors in Waste Water Treatment – Status and Trends. *Chem. Eng. Technol.* 33, 1251–1259.

L

- Lai K. M., Johnson K. L., Scrimshaw M. D., Lester, J. N. (2000). Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3890–3894.
- Lai K.M., Scrimshaw M.D., Lester J.N. (2002a). The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence. *Crit. Rev. Toxicol.*, 32, 113-132.
- Lai K.M., Scrimshaw M.D., Lester J.N. (2002b). Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *The Sci. Tot. Environ.* 289, 159-168.
- Lam M.W., Tantuco K., Mabury S.A. (2003). PhotoFate: A New Approach in Accounting for the Contribution of Indirect Photolysis of Pesticides and Pharmaceuticals in Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 899-907.
- Lasakova M., Jandera P. (2009). Molecularly imprinted polymers and their application in solidphase extraction. *J. Sep. Sci.*, 32, 799–812.

- Lardon L., Helias A., Sialve B., Steyer J.P., Bernard O. (2009). Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43, 6475-6481.
- Lei A., Wong Y., Tam N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Sci. Technol.*, 46, 195–201.
- Lesniewska B., Godlewska-Zylkiewicz B., Wilczewska A.Z. (2012). Separation and preconcentration of trace amounts of Cr (III) ions on ion imprinted polymer for atomic absorption determinations in surface water and sewage samples. *Microchemical Journal*, 105, 88–93.
- Li S.X., Hong H.S., Zheng F.Y., Deng N.S. (2008). Effects of metal pollution and macronutrient enrichment on the photoproduction of hydroxyl radicals in seawater by the alga *Dunaliella salina*. *Marine Chemistry*, 108, 207 – 214
- Li H.Q., Jiku F., Schroder H.F. (2000). Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography–mass spectrometry and tandem mass spectrometry. Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. *Journal of Chromatography A*, 889, 155–176.
- Lide D.R. (2012). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 92nd Edition Internet Version.
- Lika K., Papadakis I.A. (2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research* 62, 135–146.
- Lin Y.W., Guo G.L., Hsieh H.C., Huang S.L. (2010). Growth of *Pseudomonas* sp. TX1 on a wide range of octylphenol polyethoxylate concentrations and the formation of dicarboxylated metabolites. *Bioresource Technology*, 101, 2853–2859.
- Liao B.Q., Kraemer J.T., Bagley D.M. (2006). Anaerobic Membrane Bioreactors: Applications and Research Directions. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 36, 489-530.
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A. (2003). Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 75, 631–681.
- Liu J., Wang R., Huang B., Lin C., Zhou J., Pan X. (2012). Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. *Environmental Pollution*, 162, 325-331.

- Liu Y., Wang F., Xia S., Zhao J. (2008). Study of 4-t-octylphenol degradation and microbial community in granular sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 167–171.
- Lodi A., Binaghi L., Solisio C., Converti A., Del Borghi M. (2003). Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 656–660.
- Louch D., Motlagh S., Pawliszyn J. (1992). Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers. *Anal. Chem.*, 64, 1187-1199.

M

- Ma J., Xiao R., Li J., Yu J., Zhang Y., Chen L. (2010). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5462–5469.
- Markou G., Georgakakis D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88, 3389–3401.
- Martínez M.E., Sánchez S., Jiménez J.M., Yousfi F.E., Muñoz L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73, 263-272.
- Mazellier P., Leverd J. (2003). Transformation of 4-tert-octylphenol by UV irradiation and by an H₂O₂/UV process in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2, 946–953.
- McNamara P.J., Wilson C.A., Wogen M.T., Murthy S.N., Novak J.T., Novak P.J. (2012). The effect of thermal hydrolysis pretreatment on the anaerobic degradation of nonylphenol and short-chain nonylphenol ethoxylates in digested biosolids. *Water Research*, 46, 2937-2946.
- Meinert C., Moeder M., Brack W. (2007). Fractionation of technical p-nonylphenol with preparative capillary gas chromatography. *Chemosphere* 70, 215–223
- Melin T., Jefferson B., Bixio D., Thoeye C., De Wilde D., De Koning J., van der Graaf J., Wintgens T. (2006). Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, 187, 271–282.

- Mester Z., Sturgeon R. (2005). Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, 1243–1269.
- Miller J.N., Miller J.C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall.
- Miller E.I., Norris H.K., Rollins D.E., Tiffany S.T., Wilkins D.G. (2010). A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 15, 725-737.
- Mohapatra D.P., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. (2010). Degradation of endocrine disrupting bisphenol A during pre-treatment and biotransformation of wastewater sludge. *Chemical Engineering Journal* 163, 273–283.
- Monsalvo V.M., McDonald J.A., Khan S.J., Le-Clech P. (2014). Removal of trace organics by anaerobic membrane bioreactors. *Water Research*, 49, 103-112.
- Moosbrugger R.E., Wentzel M.C., Ekama G.A., Marais G.v.R. (1992). Simple titration procedures to determine H_2CO_3^- alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acid/bases. Water Research Commission, Report No. TT 57/92. Research Report W 74, University of Cape Town, Pretoria, Republic of South Africa.

N

- Nagpal N.K., Meays C.L. (2009). Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 α -ethinylestradiol (EE2). Technical Appendix. Science and Information Branch Water Stewardship Division Ministry of Environment. September.
- Nakada N., Tanishima T., Shinohara H., Kiri K., Takada H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*, 40, 3297–3303.
- Neta P., Huie R.E., Ross A.B. (1988). Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17, 1027-1284.

Ning B., Graham N.J.D., Zhang Y. (2007). Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part I: Direct reaction. *Chemosphere*, 68, 1163–1172.

Niri V.H., Bragg L., Pawliszyn J. (2008). Fast analysis of volatile organic compounds and disinfection by-products in drinking water using solid-phase microextraction-gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1201, 222–227.

O

Olguín E.J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, 22, 81–91.

Olivier S., Scragg A.H., Morrison J. (2003). The effect of chlorophenols on the growth of *Chlorella* VT-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 837–842.

Oswald W., Gotaas H., Golueke G.C., Kellen W.R. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. American Society of Civil Engineers, Paper nº. 2849.

Othman A.I., El-Missiry M.A., Koriem K.M., El-Sayed A.A. (2012). Alfa-Lipoic acid protects testosterone secretion pathway and sperm quality against 4-tert-octylphenol induced reproductive toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 76–83.

P

Park J., Jin H.F., Lim B.R., Park K.Y., Lee K. (2010). Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp.. *Bioresource Technology*, 101, 8649–8657.

Parrilla P., Martinez Vidal J.L. (1997). Determination of Pesticide Residues in Water Using LLE or SPE and HPLC/DAD Detection. *Analytical Letters*, 30, 1719-1738.

Paterakis N., Chiu T.Y. Koh Y.K.K., Lester J.N., McAdama E.J., Scrimshaw M.D., Soares A., Cartmell E. (2012). The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates. *Journal of Hazardous Materials*, 199–200, 88–95.

Pawliszyn J., (1997a). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York.

- Pawliszyn J., Pawliszyn B., Pawliszyn M. (1997b). Solid Phase Microextraction. *The Chemical Educator*. 1/Vol. 2, nº 4.
- Peñalver A., Pocerull E., Borrull F., Marce R.M. (1999). Evaluation of Parameters in Solid-Phase Microextraction Process. *Chromatographia*, 50, 685-688.
- Pocostales J.P., Sein M.M., Knolle W., Sonntag C.V., Schmidt T.C. (2010). Degradation of Ozone-Refractory Organic Phosphates in Wastewater by Ozone and Ozone/Hydrogen Peroxide (Peroxone): The Role of Ozone Consumption by Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 8248–8253.
- Porazzi E., Pardo Martinez M., Fanelli R., Benfenati E. (2005). GC–MS analysis of dichlobenil and its metabolites in groundwater. *Talanta* 68 146–154.
- Porter A.W., Campbell B.R, Kolvenbach B.A., Corvini P.F.X., Benndorf D., Rivera Cancel G., Hay A.G. (2012). Identification of the flavin monooxygenase responsible for ipso substitution of alkyl and alkoxyphenols in *Sphingomonas sp.* TTNP 3 and *Sphingobium xenophagum* Bayram. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 261–272.
- POSEIDON Project (EVK1-CT-2000–00047) (2005). Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. Final Report. Available from: <http://grdc.bafg.de/servlet/is/2888>
- Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L.A., Etxebarria N., Zuloaga O. (2010). Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2642-2666.

R

- Ras M., Lardon L., Bruno A., Bernet N., Steyer J.P. (2011). Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102, 200–206.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T., Bux F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411–3424.

- Robles A., Ruano M.V., Ribes J., Ferrer J. (2013). Factors that affect the permeability of commercial hollow-fibre membranes in a submerged anaerobic MBR (HF-SAnMBR) system. *Water Research*, 47, 1277-1288.
- Robles Martínez A. (2013). Modelling, simulation and control of the filtration process in a submerged anaerobic membrane bioreactor treating urban wastewater. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València.
- Rodil R., Quintana J.B., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. (2009). Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216, 2958-2969.
- Ronen Z., Abeliovich A. (2000). Anaerobic-Aerobic Process for Microbial Degradation of Tetrabromobisphenol A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2372-2377.
- Ruiz-Martínez A., Martín García N., Romero I., Seco A., Ferrer J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology*, 126, 247-253.
- Ruiz-Martínez A., Serralta J., Pachés M., Seco A., Ferrer J. (2014). Mixed microalgae culture for ammonium removal in the absence of phosphorus: Effect of phosphorus supplementation and process Modeling. *Process Biochemistry*, 49, 2249-2257.
- Ryan C.C., Tan D.T., Arnold W.A. (2011). Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. *Water Research*, 45, 1280-1286.

S

- Sánchez-Ramírez J.E., Seco A., Ferrer J., Bouzas A., García-Usach F. (2015). Treatment of a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAnMBR) effluent by an activated sludge system: The role of sulphide and thiosulphate in the process. *Journal of Environmental Management*, 147, 213-218.
- Sarrion M.N., Santos F.J., Galceran M.T. (2002). Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 947, 155-165.

- Sato H., Shibata A., Wang Y., Yoshikawa H., Tamura H. (2001). Characterization of biodegradation intermediates of non-ionic surfactants by matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry 1. Bacterial biodegradation of octylphenol polyethoxylate under aerobic conditions. *Biomacromolecules*, 4, 46–51.
- Sato H., Shibata A., Wang Y., Yoshikawa H., Tamura H. (2003). Characterization of Biodegradation Intermediates of Nonionic Surfactants by MALDI-MS. 2. Oxidative Biodegradation Profiles of Uniform Octylphenol Polyethoxylate in ¹⁸O-Labeled Water. *Biomacromolecules*, 4, 46–51.
- Schurek J., Portoles T., Hajslova J., Riddellova K., Hernandez F. (2008). Application of head-space solid-phase microextraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in tea samples. *Analytica Chimica Acta*, 611, 163–172.
- Scopus (2015). www.scopus.com. Acceso en Julio de 2015.
- Semple K.T., Cain R.B. (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1265–1273.
- Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z.L., Williams B.D., Lewis G., Naidu R. (2004). Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide, α -endosulfan, and its metabolite, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 3030–3035.
- Shen D.S., Liu X.W., Feng H.J. (2005). Effect of easily degradable substrate on anaerobic degradation of pentachlorophenol in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Hazardous Materials B119*, 239–243.
- Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M. (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*, 38, 2323–2330.
- Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Serrano F.O. (1995). The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environ Health Perspect*, 103, 113–122.
- Spietelun A., Pilarczyk M., Kloskowski A., Namiesnik J. (2011). Polyethylene glycol-coated solid-phase microextraction fibres for the extraction of polar analytes—A review. *Talanta*, 87, 1–7.

- Stasinakis A.S., Kordoutis C.I., Tsiouma V.C., Gatidou G., Thomaidis N.S. (2010). Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. *Bioresource Technology*, 101, 2090–2095.
- Stasinakis A.S., Petalas A.V., Mamais D., Thomaidis N.S. (2008). Application of the OECD 301F respirometric test for the biodegradability assessment of various potential endocrine disrupting chemicals. *Bioresource Technology*, 99, 3458–3467.
- Stasinakis A.S., Thomaidis N.S., Nikolaou A., Kantifes A. (2005). Aerobic biodegradation of organotin compounds in activated sludge batch reactors. *Environmental Pollution*, 134, 431–438.
- Steen R.J.C.A., Hogenboom A.C., Leonards P.E.G., Peerboom R.A.L., Cofino W.P., Brinkman U.A.Th. (1999). Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 857, 157–166.
- Stein S., Mirokhin Y., Tchekhovskoi D., Mallard G. (2005). The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland.
- Stoichev T., Basto M.C.P., Vasconcelos V., Vasconcelos M.T.S.D. (2010). Fate and effects of nonylphenol in the presence of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Chemistry and Ecology*, 26, 395–399.
- Subashchandrabose S.R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. (2013). Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic. *Environment International*, 51, 59–72.

T

- Tabira Y., Nakai N., Asai D., Yakabe Y., Tahara Y., Shinmyozu T., Noguchi M., Takatsuki M., Shimohigashi Y. (1999) Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.*, 262, 240-245.
- Tan B.L.L., Hawker D.W., Müller J.F., Tremblay L.A., Chapman H.F. (2008) Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography–mass spectrometry. *Water Research*, 42, 404–412.
- Tanghe T., Dhooge W., Verstraete W., (1999). Isolation of a Bacterial Strain Able To Degrade Branched Nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 746–751.
- Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D., Metcalf L., Eddy H.P. (2003). *Wastewater engineering: treatment, dispersal and reuse*. ISBN 0070418780. Irwin McGraw Hill, Boston, MA.
- Ternes T.A., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H., Joss A. (2004). A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–4084.
- Tetko I.V., Gasteiger J., Todeschini R., Mauri A., Livingstone D., Ertl P., Palyulin V.A., Radchenko E.V., Zefirov N.S., Makarenko A.S., Tanchuk V.Y., Prokopenko V.V. (2005). Virtual computational chemistry laboratory – design and description. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 19, 453–463.
- Thiele B., Heinke V., Kleist E., Guenther K. (2004). Contribution to the Structural Elucidation of 10 Isomers of Technical p-Nonylphenol. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3405-3411.
- Toyama T., Momotani N., Ogata Y., Miyamori Y., Inoue D., Sei K., Mori K., Kikuchi S., Ike M. (2010). Isolation and Characterization of 4-tert-Butylphenol-Utilizing *Sphingobium fuliginis* Strains from *Phragmites australis* Rhizosphere Sediment. *Applied and environmental microbiology*, 76, 6733–6740.

V

VCCLAB (Virtual Computational Chemistry Laboratory), 2005. ALOGPS 2.1. Website located at: <http://www.vcclab.org/>

W

Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y., Ruan R. (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, 1174–1186.

Wang B., Lan C.Q. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, 102, 5639–5644.

Wang S., Oakes K.D., Bragg L.M., Pawliszyn J., Dixon G., Servos M.R. (2011). Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere*, 85, 1472–1480.

Wheeler T.F., Heim J.R., LaTorre M.R., Janes A.B. (1997). Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS. *J. Chromatogr.*, 35, 19-30.

Wintgens T., Gallenkemper M., Melin T. (2002). Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination*, 146, 387-391.

Witorsch R. (2002). Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36, 118–130.

Writer J.H., Ryan J.N., Keefe S.H., Barber L.B. (2012). Fate of 4-Nonylphenol and 17 β -Estradiol in the Redwood River of Minnesota. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 860–868.

Wu J., Ee K.H., Lee H.K. (2005). Automated dynamic liquid–liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1082, 121–127.

Y

- Yan X., Yang Y., Li Y., Sheng G., Yan G. (2002). Accumulation and biodegradation of anthracene by *Chlorella protothecoides* under different trophic conditions. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 13, 145–150.
- Yang W., Cicek N., Ilg J. (2006). State-of-the-art of membrane bioreactors: Worldwide research and commercial applications in North America. *Journal of Membrane Science*, 270, 201–211.
- Yang J., Li X., Hu H., Zhang X., Yu Y., Chen Y. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella elipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. *Applied Energy*, 88, 3295–3299.
- Ying G.G., Kookana R.S. (2003). Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1256-1260.
- Ying G.G., Kookana R.S. (2005). Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2640-2645.
- Ying G.G., Williams B., Kookana R.S. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 28, 215–226.

Z

- Zepp R.G., Hoigne J., Bader H. (1987). Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 443–450.
- Zhang Z., Li G., Luo L., Chen G. (2010). Study on seafood volatile profile characteristics during storage and its potential use for freshness evaluation by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.*, 659, 151–158.
- Zhang Z., Pawliszyn J. (1995). Quantitative Extraction Using an internally Cooled Solid Phase Microextraction Device. *Anal. Chem.*, 67, 34-43.

- Zhou H., Huang X., Wang X., Zhi X., Yang C., Wen X., Wang Q., Tsuno H., Tanaka H. (2010). Behaviour of selected endocrine-disrupting chemicals in three sewage treatment plants of Beijing, China. *Environ. Monit. Assess.*, 161, 107–121.
- Zuo Y. (2003). Light-induced formation of hydroxyl radicals in fog waters determined by an authentic fog constituent, hydroxymethanesulfonate. *Chemosphere*, 51, 175–179.