



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



isiry

Instituto de Seguridad Industrial,
Radiofísica y Medioambiental

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA
Y PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

**Tratamiento biológico aerobio para
aguas residuales con elevada
conductividad y concentración de fenoles**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Eva Ferrer Polonio

Dirigida por:

Dr. José Antonio Mendoza Roca

Dra. Alicia Iborra Clar

Valencia Mayo 2017

AGRADECIMIENTOS

La sabiduría popular, a la cual recurro muchas veces, dice: “Es de bien nacido ser agradecido”... pues sigamos su consejo, aquí van los míos.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores la confianza depositada en mí y a Depuración de Aguas del Mediterráneo, especialmente a Laura Pastor y Silvia Doñate, la dedicación e ilusión puestas en el proyecto.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he tenido la inmensa suerte de contar con un grupo de personas de las que he aprendido muchísimo y que de forma desinteresada han colaborado en este trabajo, enriqueciéndolo enormemente. Gracias al Dr. Jaime Primo Millo, del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València, por el asesoramiento recibido y por permitirme utilizar los equipos de cromatografía de sus instalaciones. También quiero dar un agradecimiento especial a una de las personas de su equipo de investigación, ya que sin su ayuda, tiempo y enseñanzas en los primeros análisis realizados con esta técnica, no me hubiera sido posible llevar a cabo esta tarea con tanta facilidad...gracias Dra. Nuria Cabedo Escrig. Otra de las personas con las que he tenido la suerte de colaborar ha sido la Dra. Blanca Pérez Úz, del Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Blanca, aunque no nos conocemos personalmente, tu profesionalidad y dedicación han permitido superar las barreras de la distancia...gracias. Dentro de este grupo de personas no podía faltar el Dr. José Luis Alonso Molina, responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua de la Universitat Politècnica de València. José Luis, gracias por tu colaboración y ayuda y gracias por hacerme accesible una pequeña parte del mundo de la microbiología. Gracias también a Inma y a Julian por estar siempre dispuestos a ayudarme, todo un lujo tener a gente así cerquita. Y por último...gràcies Cèsar, per a una analfabeta informàtica com jo que estigueres ahí ha sigut de gran ajuda, además d'alguns consells d'estadística que també m'ha vingut molt bé...thanks.

Pero todo no ha sido trabajo... también han habido muchas risas gracias al grupito de “*Las chic@s de abajo*”. Este grupo ha ido aumentando y disminuyendo en función de las personas que han ido pasando por el laboratorio a hacer su doctorado, TFG, TFM, Erasmus... Muchos nombres y caras vienen a mi cabeza; Chiara, Tatiana, Mireia, Miriam, Queralt, Danielle, Mandy, Ken... pero a la que más echamos todos

en falta, sin lugar a dudas, es Elena A...aunque es un ventaja saber que tenemos casa en Noruega si vamos de vacaciones 😊

Y después están los fijos del grupito: Sergio, Laura, Mónica y dos infiltradas del grupo de “*los de arriba*”... Rita y Bianca, aunque no sois del “*lab bueno*” os queremos igual *guapis*. Sobre las 11 se lanza el whatsapp



y tenemos aseguradas unas



¿Falta alguien? Jejeje, ¡¡claro que falta gente!! ... “La mare” no se ha olvidado de vosotros. Faltan mis compañer@s de lab, aunque para mí son mucho más que eso, son amigos...y de los buenos, de los que te ayudan a solucionar los problemas y con los que compartes ilusiones y metas, vamos...de los que no tienen precio. Carlitos, mi compi de proyecto, aunque Mariajo dice que ya no molas tanto como antes, yo digo que SI MOLAS. José Luis, ojala se m’apegara un poquet de la teua disciplina en el lab...tu i jo som com el ying i el yang de les normes de seguretat, encara recorde la teua cara quan me veres traure el tupper del dinar de la nevera de les mostres...jajaja. Ara vas tu Mariajo, encara que te pegue el puro per a que estigues al tanto de la política i temes d’actualitat...tu ni cas!!! I el tema musical ja no el toque...eres “carne de cañón del reguetón” i no hi ha res a fer. Irene i Elena, quan se vos tira a faltar!!! a la UPV li falta alguna cosa des que no esteu. En junio quedada de “*modelitos*” en Asturias, queremos prao y queremos espicha y un poquiño de sidriña.

Ya terminando con esto, no podía faltar mi familia en mis agradecimientos. Mis padres, mi hermana y mi sobrina Rocío...que es lo que más quiero en este mundo. Family...per fi presente la Tesis!!!

Y mis últimos agradecimientos van para la persona que sin duda es mi modelo a seguir, con la que he podido contar en todo momento y de la que más he aprendido en estos últimos años ... mi tutor José Antonio, sin duda esta oportunidad que me has dado ha cambiado mi vida. Gracias en MAYÚSCULAS, **negrita** y subrayado.

ÍNDICE

RESÚMENES	1
PREFACIO	15
NOTACIÓN	23
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	31
I.1. Motivación	35
I.2. Objetivos	37
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	41
II.1. Producción de las aceitunas de mesa	45
II.1.1. Marco económico.....	45
II.1.2. Procesado de las aceitunas de mesa.....	47
<i>II.1.2.1. Aceitunas verdes de mesa al “Estilo Español”</i>	49
<i>II.1.2.2. Agua residual generada en el procesado</i>	52
II.1.3. Gestión del agua residual generada durante el procesado y envasado.....	54
II.2. Salmuera de fermentación del procesado de la aceituna (FTOP)	57
II.2.1. Caracterización de las FTOP.....	59
II.3. Bibliografía	61
CAPÍTULO III. ESTUDIOS PREVIOS	65
III.1. Pretratamientos	69
III.1.1. Modificación del pH y Coagulación/Floculación.....	72
III.1.2. Adsorción.....	75
<i>III.1.2.1. Carbón Activo</i>	86
<i>III.1.2.2. Recuperación de compuestos fenólicos</i>	90

III.2. Tratamiento biológico aerobio	95
III.2.1. Tratamiento biológico de aguas hipersalinas.....	95
<i>III.2.1.1. Microorganismos Halotolerantes y Halófilos</i>	96
III.2.2. Biodegradación de compuestos fenólicos.....	102
III.2.3. Metabolismo celular y requerimiento de nutrientes.....	104
III.2.4. Reactores Biológicos Secuenciales.....	110
III.3. Tratamiento biológico con fases anaerobias y aerobias alternas	115
III.4. Tratamientos terciarios	118
III.4.1. Tratamiento con membranas.....	120
III.5. Resumen	124
III.6. Bibliografía	127
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS	141
IV.1. Equipos experimentales	145
IV.1.1. Jar-test.....	145
IV.1.2. Planta Piloto ITACA: SBR.....	146
IV.2. Equipos instrumentales	151
IV.2.1. Espectrofotómetro.....	151
IV.2.2. Microtox®.....	152
IV.2.3. Microscopios para el recuento e identificación de bacteria y protistas en el fango activo.....	152
IV.2.4. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia.....	154
IV.2.5. Respirómetro.....	155
IV.2.6. Módulos de membranas.....	157
IV.2.7. Equipos auxiliares.....	160
IV.3. Métodos analíticos	161

IV.3.1. Demanda química de oxígeno.....	161
IV.3.2. Nitrógeno total.....	162
IV.3.3. Fósforo total.....	162
IV.3.4. Cloruros.....	163
IV.3.5. Color.....	163
IV.3.6. Sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles.....	164
IV.3.7. Toxicidad.....	165
IV.3.8. Identificación y cuantificación de bacterias.....	168
<i>IV.3.8.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH) para la cuantificación bacteriana del fango activo.....</i>	<i>169</i>
<i>IV.3.8.2. Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes salina.....</i>	<i>175</i>
IV.3.9. Identificación y cuantificación de protistas.....	176
<i>IV.3.9.1. Recuento de protistas en el fango activo.....</i>	<i>177</i>
<i>IV.3.9.2. Aislamiento e identificación de los protistas.....</i>	<i>178</i>
IV.3.10. Capacidad antioxidante total.....	180
IV.3.11. Fenoles totales.....	182
IV.3.12. Perfil fenólico: análisis HPLC.....	183
IV.3.13. Respirometría.....	193
IV.4. Reactivos.....	198
IV.5. Bibliografía.....	204
 CAPÍTULO V. METODOLOGÍA.....	 209
V.1. Caracterización de las FTOP.....	215
V.2. Pretratamientos.....	215
V.2.1. Ajuste de pH.....	217
V.2.2. Coagulantes-Floculantes.....	218
V.2.3. Adsorción con carbón activo.....	219

V.2.4. Recuperación de compuestos fenólicos.....	222
V.3. Tratamiento Biológico.....	230
V.3.1. Puesta en marcha.....	230
V.3.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos.....	234
V.3.2.1. <i>Concentración de nutrientes en las FTOP</i>	236
V.3.2.2. <i>Pretratamiento de las FTOP con carbón activo</i>	238
V.3.2.3. <i>Condiciones isotermas del licor de mezcla a 30°C</i>	241
V.3.3. Alternancia de fases anaerobias y fases aerobias.....	244
V.4. Tratamiento terciario: ultrafiltración y nanofiltración.....	247
V.5. Bibliografía.....	251
CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....	253
VI.1. Pretratamientos.....	259
VI.1.1. Tratamientos alternativos previos a la operación de reciclado o recuperación.....	259
VI.1.1.1. <i>Introduction</i>	260
VI.1.1.2. <i>Materials and Methods</i>	263
VI.1.1.3. <i>Results and Discussion</i>	266
VI.1.1.4. <i>Conclusions</i>	277
VI.1.1.5. <i>References</i>	278
VI.1.2. Recuperación de compuestos fenólicos de las FTOP para su valorización.....	283
VI.1.2.1. <i>Introduction</i>	284
VI.1.2.2. <i>Materials and Methods</i>	287
VI.1.2.3. <i>Results and Discussion</i>	291
VI.1.2.4. <i>Conclusions</i>	305

VI.1.2.5. <i>References</i>	306
VI.2. Tratamiento biológico	311
VI.2.1. Puesta en marcha.....	311
VI.2.1.1. <i>Introduction</i>	312
VI.2.1.2. <i>Materials and Methods</i>	315
VI.2.1.3. <i>Results and Discussion</i>	323
VI.2.1.4. <i>Conclusions</i>	333
VI.2.1.5. <i>References</i>	334
VI.2.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos.....	341
VI.2.2.1. <i>Introduction</i>	342
VI.2.2.2. <i>Materials and Methods</i>	344
VI.2.2.3. <i>Results and Discussion</i>	352
VI.2.2.4. <i>Conclusions</i>	363
VI.2.2.5. <i>References</i>	364
VI.2.3. Influencia de los parámetros operacionales sobre la eliminación de la materia orgánica y la población protista del fango activo.....	369
VI.2.3.1. <i>Introduction</i>	370
VI.2.3.2. <i>Materials and Methods</i>	373
VI.2.3.3. <i>Results and Discussion</i>	380
VI.2.3.4. <i>Conclusions</i>	397
VI.2.3.5. <i>References</i>	398
VI.2.4. Reducción del consumo energético.....	405
VI.2.4.1. <i>Introduction</i>	407
VI.2.4.2. <i>Materials and Methods</i>	409
VI.2.4.3. <i>Results and Discussion</i>	415
VI.2.4.4. <i>Conclusions</i>	426

VI.2.3.5. <i>References</i>	427
VI.3. Tratamiento integrado: combinación de tratamiento biológico y membranas	433
VI.3.1. Combinación de tecnologías: tratamiento biológico y membranas.....	433
VI.3.1.1. <i>Introduction</i>	434
VI.3.1.2. <i>Materials and Methods</i>	437
VI.3.1.3. <i>Results and Discussion</i>	444
VI.3.1.4. <i>Conclusions</i>	455
VI.3.1.5. <i>References</i>	455
VI.4. Costes de operación	463
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	473
VII.1. Conclusiones específicas	477
VII.1.1. Caracterización del agua residual.....	477
VII.1.2. Pretratamientos.....	477
VII.1.3. Tratamiento biológico.....	480
VII.1.4. Tratamiento terciario.....	482
VII.1.5. Estudio económico.....	482
VII.2. Conclusiones finales	483
ANEXO I. ÁRBOL FILOGENÉTICO	485
ANEXO II. COSTES DEL TRATAMIENTO DE UN AGUA RESIDUAL URBANA	489

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

Figura II.1.	Estructura de la oleuropeína y el ligstrósido junto a los productos derivados de su hidrólisis alcalina.....	49
Figura II.2.	Etapas del procesado de las aceitunas de mesa al “ <i>Estilo Español</i> ”.....	51

CAPÍTULO III. ESTUDIOS PREVIOS

Figura III.1.	Tecnologías aplicadas al tratamiento de aguas residuales...	71
Figura III.2.	Teoría de la doble capa de Stern.....	73
Figura III.3.	Clasificación IUPAC: Isotermas de adsorción en sistemas gaseosos.....	79
Figura III.4.	Clasificación de Giles: Isotermas de adsorción en disolución..	80
Figura III.5.	Grupos superficiales presentes en el carbón activado.....	88
Figura III.6.	Formatos del carbón activo.....	89
Figura III.7.	Resina MN200 de Purolite.....	91
Figura III.8.	Relación entre los procesos anabólicos y catabólico.....	105
Figura III.9.	Compuestos en los que se puede encontrar el nitrógeno.....	106
Figura III.10.	Teoría de la doble capa de Stern.....	107
Figura III.11.	Esquema de un sistema de fangos activos y de un SBR.....	112
Figura III.12.	Esquema representativo de un ciclo de funcionamiento de un SBR.....	113
Figura III.13.	Tipos de sistemas combinados anaerobio-aerobio.....	116
Figura III.14.	Procesos de membranas basados en el gradiente de presión.....	122

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura IV.1.	Equipo de Jar-test.....	145
Figura IV.2.	Planta Piloto ITACA	146
Figura IV.3.	Esquema SBR.....	147
Figura IV.4.	Autómata planta ITACA; interfaz informativa.....	149
Figura IV.5.	Autómata planta ITACA; interfaz modificación.....	149
Figura IV.6.	Microtox® de AZUR ENVIRONMENTAL.....	152
Figura IV.7.	Microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50 del IAMA.....	153
Figura IV.8.	HPLC (ISIRYM).....	155
Figura IV.9.	Respirómetro BM-Advance.....	156
Figura IV.10.	Unidad de reacción del Respirómetro BM-Advance.....	156
Figura IV.11.	Componentes interiores de la unidad de reacción del Respirómetro BM-Advance.....	157
Figura IV.12.	Planta piloto de ultrafiltración.....	158
Figura IV.13.	Planta piloto de nanofiltración (NF1).....	159
Figura IV.14.	Planta piloto de nanofiltración (NF2).....	159
Figura IV.15.	Detalle del equipo Microtox®.....	166
Figura IV.16.	Esquema dosificación y dilución para Microtox®.....	167
Figura IV.17.	Esquema hibridación técnica FISH.....	170
Figura IV.18.	Imagen del fango activo con el microscopio BX50 y la sonda <i>Chloroflexi</i>	173
Figura IV.19.	Imagen del fango activo con el microscopio BX50 y la sonda γ - <i>Proteobacteria</i>	173
Figura IV.20.	Tratamiento de imagen con software Borrás.....	174
Figura IV.21.	Hoja EXCEL con los datos del software Borrás.....	175
Figura IV.22.	Cámaras de recuento Sedgewick-Rafter.....	178
Figura IV.23.	Portaobjetos con cavidad cóncava excavada.....	179

Figura IV.24.	Patrones para recta de calibrado de tirosol.....	183
Figura IV.25.	Cromatograma tipo para una FTOP con el HPLC (JASCO). Identificación de picos; (1 y 5) Hidroquinona, (2) Hidroxitirosol, (3) Tirosol.....	186
Figura IV.26.	Esquema de preparación de muestras para análisis en HPLC..	189
Figura IV.27.	Representación gráfica del OUR para una FTOP, en la cual el eje de ordenas representa el OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).....	195
Figura IV.28.	Representación gráfica de R_S para una FTOP.....	197

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura V.1.	Vida útil de la resina; Activación y ciclos de adsorción y desorción de la resina.....	229
Figura V.2.	Reactores utilizados en el estudio del rendimiento del tratamiento biológico de las FTOP: influencia de la concentración de nutrientes y pretratamiento con CAP.....	239
Figura V.3.	Sistema calefactor externo al SBR.....	243

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

Figure VI.1.	Removal percentage of turbidity, SS, soluble COD and T.Ph in FTOP ₂₀ after pH adjustment and sedimentation tests.....	269
Figure VI.2.	FTOP ₈ turbidity after pre-treatment with three coagulants ($1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and five flocculants ($30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).....	270
Figure VI.3.	FTOP ₉ turbidity after pre-treatment with GT25 (between $100\text{-}2000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + ZW332 ($30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).....	271
Figure VI.4.	Removal percentage of turbidity, SS, soluble COD and T.Ph after pre-treatment with GT25 ($800\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + ZW332 ($30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for different pH.....	271
Figure VI.5.	Total phenols percentage removal in FTOP ₁₉ after PAC pre-treatment with $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of BM8.....	274

Figure VI.6.	Langmuir isotherm for FTOP ₂₀ (22°C).....	275
Figure VI.7.	Freundlich isotherm for FTOP ₂₀ (22°C).....	276
Figure VI.8.	Langmuir isotherm for FTOP ₂₀ and FTOP ₂₂ (22°C).....	278
Figure VI.9.	T.Ph concentration throughout the adsorption process (180 min, 150 rpm, 21±1 °C) with three MN200 dosages: figure IV.9 a) 10 g·L ⁻¹ , figure IV.9 b) 20 g·L ⁻¹ and figure IV.9 c) 40 g·L ⁻¹	296
Figure VI.10.	Intra-particle diffusion model from NF-1 with three MN200 dosage: 10, 20 and 40 g·L ⁻¹	299
Figure VI.11.	T.Ph concentration throughout the desorption process (60 min, 150 rpm, 21±1 °C) with three MN200 dosages: figure IV.11 a) 10 g·L ⁻¹ , figure IV.11 b) 20 g·L ⁻¹ and figure IV.11 c) 40 g·L ⁻¹	302
Figure VI.12.	Phenolic profile in NF-1 (on top), NF-1 after adsorption by 40 g·L ⁻¹ of MN200 (in the middle) and ethanol phase after desorption process (at the bottom). Peak identification: (1) Hydroquinone (internal std); (2) HTY; (3) TY.....	304
Figure VI.13.	SBR scheme.....	320
Figure VI.14.	COD removal (%), conductivity (mS·cm ⁻¹) and Turbidity (NTU) of SBR-1 effluent.....	324
Figure VI.15.	MLSS, MLVSS and F/M ratio in SBR-1.....	325
Figure VI.16.	COD removal (%), conductivity (mS·cm ⁻¹) and turbidity (NTU) of SBR-2 effluent.....	326
Figure VI.17.	MLSS, MLVSS and F/M ratio in SBR-2.....	327
Figure VI.18.	MLVSS/MLSS ratio from SBR-1 and SBR-2.....	329
Figure VI.19.	Quantification Bacteria and Archaea from the 46 th day; SBR-1 ■ (58.3 mS·cm ⁻¹), SBR-2 ■ (77.0 mS·cm ⁻¹).....	331
Figure VI.20.	Quantification Bacteria and Archaea from the 66 th day; SBR-1 ■ (76.7 mS·cm ⁻¹), SBR-2 ■ (88.7 mS·cm ⁻¹).....	332
Figure VI.21.	Quantification Bacteria and Archaea from 108 th day; SBR-1 ■ (89.3 mS·cm ⁻¹), SBR-2 ■ (98.5 mS·cm ⁻¹).....	332
Figure VI.22.	SBRs experimental time.....	349

Figure VI.23.	SBR-1: Conductivity, temperature, COD removal and F/M ratio. Vertical lines: [—] FTOP-2, [·····] FTOP-2 + nutrients ratio 250/5/1, [- - -] FTOP-2 + 10% excess nutrients.....	352
Figure VI.24.	SBR-1: MLSS, MLVSS and MLVSS/MLSS ratio. Vertical lines: [—] FTOP-2, [·····] FTOP-2 + nutrients ratio 250/5/1, [- - -] FTOP-2+10% excess nutrients.....	353
Figure VI.25.	SBR-2: Conductivity, temperature, COD removal efficiency and F/M ratio. Vertical lines: [- · -] FTOP-2 _{PAC}	356
Figure VI.26.	SBR-2: MLSS, MLVSS and F/M ratio. Vertical lines: [- · -] FTOP-2 _{PAC}	357
Figure VI.27.	SBR-3: COD removal, F/M ratio, MLSS and MLVSS. Vertical lines: [- - -] FTOP-4 _{PAC}	359
Figure VI.28.	SBR-3: COD removal, F/M ratio, MLSS and MLVSS. Vertical lines: [- - -] FTOP-4 _{PAC}	359
Figure VI.29.	FTOP-4 _{PAC} and SBR-4 effluent phenolic profile. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.....	361
Figure VI.30.	Quantification of <i>γ-Proteobacteria</i> in the SBRs.....	362
Figure VI.31.	SBR operational time.....	375
Figure VI.32.	Live observation of vegetative (trophic) and cyst stages under DIC microscopy (x40). (a-c): Trophic stage; the ciliates fed on bacteria predated actively on the surface of the flocs. Contractile vacuoles (CV) and caudal cilium (CC) in the posterior pole. Bacteria can be observed in the digestive vacuoles (arrow in c). (d-g): The cyst stages. Contractile vacuole (CV) visible (g). Scale Bars: 10 μm...	382

Figure VI.33.	Silver carbonate staining of the trophic and cyst stages. Bright field (x100 and x40). (a). Trophic stage right side of the cell and oral area; arrow shows the position of the contractile vacuole pore (VP), the caudal complex (CC), the somatic kinety 1 (Sk1), the polikinetes 1 and 2 (Pk1/Pk2) from the oral area and the macronuclei (Ma) (x100). (b). Cyst stages with cells already showing infraciliary patterns on the surface of the cell; macronuclei and micronuclei are visible (x40). (c). Detail of the infraciliature from the oral area with the posterior end of the haplokinety and the oral polikinetes 1, 2 and 3. Scale Bars: 10 μm	383
Figure VI.34.	Lugol's fixed flagellate. Phase contrast microscopy (x100 and x40). (a-b). Three of the four flagella are clearly visible as well as the karyomastigont with the nucleus, under the flagellar insertion. Scale Bars: 10 μm	386
Figure VI.35.	Evolution of COD removal percentage in the SBRs. Vertical lines: [—] FTOP-2, [- - -] FTOP-3 and [·····] FTOP-4. Grey area = experimental time for Step-1.....	390
Figure VI.36.	Relationship between ciliates amount and Y_{obs} in a) SBR-1, b) SBR-2, c) SBR-3, SBR-3A and SBR-3B. Vertical lines: [—] FTOP-2, [- - -] FTOP-3 and [·····] FTOP-4. Gray area = experimental time for Step-1.....	392
Figure VI.37.	Mean ciliate abundances ($\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) observed in the SBRs during Step-1 and Step-2.....	394
Figure VI.38.	Mean COD removal, ciliates abundance and flagellates frequency within the four clusters obtained.....	397
Figure VI.39.	SBR-1 ML: MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS and ΔX . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Curved line [·····]: trend of sludge production (ΔX).....	416
Figure VI.40.	SBR-1 effluent: COD and Total phenols removal (%) and Time_{DO} . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Horizontal lines: [—] Time_{air}	418

Figure VI.41.	Phenolic profile to FTOP-2 and Step-2 in SBR-1. Peak identification: (1) Hydroxytyrosol; (2) Tyrosol.....	419
Figure VI.42.	SBR-2 ML: MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS and ΔX . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- -] separate the FTOP feeding. Curved line [····]: trend of sludge production (ΔX).....	421
Figure VI.43.	SBR-2 effluent: COD and Total phenols removal (%) and Time _{DO} . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- -] separate the FTOP feeding. Horizontal lines: [—] Time _{air}	422
Figure VI.44.	Phenolic profile to Step-2 in SBR-2.....	423
Figure VI.45.	Relationship between time _{DO} and SOUR in SBR-1.....	426
Figure VI.46.	Evolution of the COD and T.Ph removal efficiency and the effluent COD and T.Ph concentration. Vertical lines: [—] FTOP-2; [····] FTOP-3; [- -] FTOP-4.....	444
Figure VI.47.	HPLC chromatograms for the effluent SBR and FTOP-3. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.....	446
Figure VI.48.	Evolution of the permeate flux with VRF in the UF process for two tests concentrating from a VRF of 1 to 1.57 (UF1 and UF2) and one UF test concentrating with the finals rejections of UF1 and UF2 until reaching a final VRF of 2.10 (UF3).....	449
Figure VI.49.	Evolution of the COD and T.Ph concentrations in the UF permeate.....	450
Figure VI.50.	HPLC chromatograms for the UF permeate. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.....	451
Figure VI.51.	Evolution of the permeate flux in the NF treatment...	452
Figure VI.52.	Integrated treatment for the FTOP wastewaters. Streams: (1) FTOP wastewater, (2) SBR effluent, (3) UF permeate, (4) NF permeate.....	454
Figura VI.53.	Esquema del tratamiento integral para las FTOP.....	475

PREFACIO

Tabla 1.	Artículos de investigación publicados.....	20
Tabla 2.	Artículos de investigación en revisión.....	21

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

Tabla II.1.	Principales países productores de aceituna.....	46
Tabla II.2.	Estructura química de los principales compuestos fenólicos en los subproductos de la producción de aceite de oliva.....	48
Tabla II.3.	Parámetros físico-químicos de las aguas residuales generadas en el procesado de las aceitunas de mesa al “ <i>Estilo Español</i> ”.....	53
Tabla II.4.	Rango de concentraciones para las salmueras de fermentación del procesado de aceitunas de mesa.....	60

CAPÍTULO III. ESTUDIOS PREVIOS

Tabla III.1.	Características de la Fisorción y la Quimisorción.....	77
Tabla III.2.	Taxonomía de las Archaea Halófilas.....	98
Tabla III.3.	Taxonomía de las Bacterias Halófilas.....	99

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla IV.1.	Equipos acoplados a los SBR de la planta piloto ITACA....	148
Tabla IV.2.	Parámetros controlados por el autómata de la planta ITACA..	150
Tabla IV.3.	Espectrofotómetro DR 6000.....	151
Tabla IV.4.	Características técnicas HPLC (ISIRYM).....	154
Tabla IV.5.	Microorganismos identificados mediante la técnica FISH..	169

Tabla IV.6.	Lista de sondas de oligonucleótidos y las concentraciones de formamida.....	161
Tabla IV.7.	Tiempo de retención del tirosol e hidroxitirosol en los HPLC utilizados.....	185
Tabla IV.8.	Técnicas para determinar la biomasa.....	193
Tabla IV.9.	Carbón Activo en Polvo de CHIEMIVALL.....	198
Tabla IV.10.	Resinas utilizadas en la Recuperación de Fenoles.....	198
Tabla IV.11.	Coagulantes y Floculantes de DERYPOL.....	199
Tabla IV.12.	Reactivos utilizados en la experimentación.....	199
Tabla IV.13.	Preparación del tampón de hibridación y de la solución de lavado según el porcentaje de formamida (FA).....	202

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla V.1.	Puesta en marcha SBRs; Características operacionales.....	233
Tabla V.2.	Características operativas de los reactores SBR-2, SBR-3 y SBR-4 utilizados en la evaluación del pretratamiento de las FTOP con CAP en el tratamiento biológico.....	241
Tabla V.3.	Características operacionales seguidas en el estudio de la alternancia de fases anaerobias y fases aerobias.....	245
Tabla V.4.	Parámetros operacionales del SBR-1 durante el tratamiento integrado (Biológico+UF+NF).....	248

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

Table VI.1.	Powder activate carbon.....	263
Table VI.2.	Coagulants and flocculants.....	264
Table VI.3.	Wastewater characterization.....	267
Table VI.4.	Total phenols removal efficiencies in the adsorption test with FTOP ₁₅ and 4 g·L ⁻¹ PAC concentration (4h reaction time).....	273

Table VI.5.	Physico-chemical characteristics of MN200 resin (data from supplier).....	288
Table VI.6.	Wastewaters characterization.....	292
Table VI.7.	Adsorption process (180 min, 150 rpm, 21 ± 1 °C) with three MN200 dosages (10, 20 and $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	293
Table VI.8.	Adsorption study of COD for three MN200 dosage (10, 20 and $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) at equilibrium.....	295
Table VI.9.	Kinetic parameters for phenols adsorption with three MN200 dosage; 10, 20 and $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	298
Table VI.10.	Isotherm parameters for T.Ph adsorption in FTOP-1, FTOP-2, UF-1, UF-2 and NF-1 on MN200 resin (21 ± 1 °C).....	301
Table VI.11.	T.Ph concentration percentage adsorbed and desorbed in the first and latest cycle in the experiments performed to study MN200 useful life.....	305
Table VI.12.	List of oligonucleotide probes applied and respective formamide concentrations.....	318
Table VI.13.	SBRs operation characteristics.....	321
Table VI.14.	FTOP characteristics.....	322
Table VI.15.	Total phenols, HTY and TY concentration, TAA and toxicity.....	330
Table VI.16.	FTOPs characteristics.....	345
Table VI.17.	SBRs operation characteristics.....	348
Table VI.18.	<i>Pseudocohnilembus</i> species descriptions, environmental locations and cyst presence reported to date.....	372
Table VI.19.	FTOP characteristics.....	374
Table VI.20.	Operational conditions in the SBRs.....	376
Table VI.21.	Morphometric data for <i>Pseudocohnilembus</i> species (dimensions in μm).....	385
Table VI.22.	Average values \pm standard deviations of some parameters of influent, mixed liquor, effluent and operational process during Step-1 and Step-2 in the sampling days.....	388
Table VI.23.	Cluster characteristic variables.....	396

Table VI.24.	FTOP samples characterisation.....	409
Table VI.25.	SBRs operation characteristics.....	411
Table VI.26.	Results of the respirometric analysis and their relation to the SBRs operating parameters.....	424
Table VI.27.	FTOP samples characterization.....	438
Table VI.28.	Operating conditions.....	439
Table VI.29.	Ultrafiltration and nanofiltration membranes characteristics..	440
Table VI.30.	Streams characterization in the integrated FTOP treatment..	448
Tabla VI.31.	Producción de aceitunas de mesa en Sevilla (campana 2008/2009).....	463
Tabla VI.32.	Costes asociados al pretratamiento de las FTOP para reducir los fenoles totales desde 1000 mg·L ⁻¹ hasta 400 mg·L ⁻¹	466
Tabla VI.33.	Costes asociados a la línea del tratamiento biológico de las FTOP.....	468
Tabla VI.34.	Compilación de costes asociados al tratamiento de nanofiltración en relación al coste de reemplazamiento de membranas (CRM).....	469
Tabla VI.35.	Costes asociados a la línea de tratamiento terciario de las FTOP.....	471

RESUMENES

RESUMEN

Título: “Tratamiento biológico aerobio para aguas residuales con elevada conductividad y concentración de fenoles”

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la depuración de un agua residual industrial, generada durante la producción de aceitunas de mesa al “*Estilo Español*”. En concreto se ha trabajado con las salmueras agotadas de la etapa de fermentación láctica de las aceitunas (FTOP: Fermentation Brine from the Table Olive Processing).

Para la depuración de las FTOP se propone un tratamiento integral, cuya finalidad es regenerar estos efluentes y reutilizarlos como salmuera nueva o como líquido de envasado de las aceitunas. Este sistema integral tiene como eje central la aplicación de un tratamiento biológico, apoyado por una serie de pretratamientos y un tratamiento terciario.

PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Con los pretratamientos se buscó reducir la carga contaminante de las FTOP para facilitar el tratamiento biológico posterior. Además, uno de ellos también tuvo como objetivo la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en estas aguas residuales, para su posterior valorización dentro de las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentación.

– Eliminación de materia orgánica y fenoles

Las técnicas utilizadas fueron la modificación del pH, la adición de coagulantes y floculantes y la adsorción con carbón activo en polvo (CAP). Ni el ajuste de pH ni el empleo de coagulantes y floculantes, ambos con posterior sedimentación, ofrecieron rendimientos de eliminación de sólidos

en suspensión y DQO que justificaran su uso previo al tratamiento biológico. Los mayores porcentajes de eliminación de DQO y fenoles se consiguieron con la adsorción. Durante este estudio se optimizó el tiempo de reacción y se correlacionó la adsorción con la isoterma de Langmuir.

– **Recuperación de compuestos fenólicos**

Se utilizó una resina polimérica no iónica como adsorbente y etanol como desorbente, para recuperar los compuestos fenólicos. Se optimizaron los tiempos de adsorción y desorción, se correlacionó la adsorción con una cinética de pseudo-segundo orden y se ajustó a la isoterma de Langmuir. Además, se evaluó la vida útil de la resina. Todos los ensayos se llevaron a cabo con tres tipos de muestra: FTOP, FTOP pretratada con ultrafiltración (UF) y FTOP pretratada con UF más nanofiltración (NF).

TRATAMIENTO BIOLÓGICO

Se usaron reactores biológicos secuenciales (SBR: Sequential Batch Reactor). El desarrollo experimental se dividió en tres etapas:

– **Puesta en marcha**

Se siguieron dos estrategias de adaptación de la biomasa: 1) adaptación conjunta a alta salinidad y compuestos fenólicos de las FTOP y 2) preadaptación inicial a medios salinos, utilizando un agua sintética salina libre de fenoles, previa a la adición de FTOP. La adaptación conjunta fue mejor, consiguiendo elevados rendimientos de eliminación de DQO (80%) y compuestos fenólicos (97%). La biomasa bacteriana incrementó su población de *Proteobacterias* a medida que aumentó la conductividad en los SBRs.

– Optimización del proceso: rendimiento y consumo energético

Para aumentar el rendimiento de eliminación de los contaminantes se realizaron tres actuaciones: 1) se estableció la relación óptima de nutrientes en las FTOP en 250:5:1 (DQO:Nitrógeno:Fósforo). Se comprobó que el déficit de nutrientes disminuyó el rendimiento del SBR y que un exceso de los mismos no conducía a una mejora significativa, 2) el pretatamiento de las FTOP con carbón permitió reducir el tiempo de retención hidráulico de 40 a 16 días, manteniendo el rendimiento del SBR y 3) el aumento y mantenimiento de la temperatura del licor de mezcla a 30°C no tuvo el efecto esperado, dando lugar a rendimientos por debajo de los obtenidos en los SBRs a temperatura ambiente. Las *Proteobacterias* representaron más del 70% de la población bacteriana. En cuanto a la población protista se encontró un único ciliado (*Pseudocohnilembus sp*), que en algunos casos convivió con otra especie flagelada (*Chilomastix sp*).

Para optimizar el consumo energético se redujo el tiempo de aireación durante la etapa de reacción, pasando de 22 a 14 horas, con una reducción mínima del rendimiento del reactor.

TRATAMIENTO TERCIARIO

Durante el tratamiento biológico se comprobó que las FTOP contienen aproximadamente un 20% de materia orgánica no biodegradable. Es por ello que se aplicó un tratamiento terciario al efluente obtenido del tratamiento biológico, formado por un sistema de membranas de UF y NF en serie. Con este sistema se obtuvo un efluente final apto para su reutilización.

RESUM

Títol: “Tractament biològic aerobi per a aigües residuals amb elevada conductivitat y concentració de fenols”

En la present Tesis Doctoral s’ha dut a terme la depuració d’un aigua residual industrial, generada durant la producció d’olives de taula al “*Estilo Español*”. En concret s’ha treballat en les salmorres esgotades procedents de l’etapa de fermentació làctica de les olives (FTOP: Fermentation Brine from the Table Olive Processing).

Per a depurar les FTOP es proposa un tractament integral, en la finalitat de regenerar estos efluents i reutilitzar-los com salmorra nova o com líquid de envasat de les olives. Este sistema integral te como eix central l’aplicació d’un tractament biològic, acompanyat d’una sèrie de pretractaments i un tractament terciari.

PRETRACTAMENTS FÍSICO-QUÍMICS

Amb els pretractaments es va perseguir reduir la carrega contaminant de les FTOP per facilitar el tractament biològic posterior. A més, un d’ells també tingué com objectiu la recuperació dels compostos fenòlics presents en estes aigües residuals, per a la seua posterior valorització dins de les indústries farmacèutiques, cosmètiques i d’alimentació.

– Eliminació de matèria orgànica i fenols

Les tècniques utilitzades foren la modificació del pH, l’adició de coagulants i floculants i l’adsorció amb carbó actiu en pols (CAP). Ni l’ajust de pH ni l’ús de coagulants y floculants, tots dos amb posterior sedimentació, oferiren rendiments d’eliminació de sòlids en suspensió i DQO que justificaren el seu

ús de forma prèvia al tractament biològic. Els majors percentatges d'eliminació de DQO i fenols s'aconseguien amb l'adsorció. Al llarg de l'estudi s'optimitzà el temps de reacció i es va correlacionar l'adsorció amb la isoterma de Langmuir.

– ***Recuperació de compostos fenòlics***

Es va utilitzar una resina polimèrica no iònica com adsorbent i etanol com desorbent, per recuperar els compostos fenòlics. S'optimitzaren el temps d'adsorció i el de desorció, es correlacionà l'adsorció amb una cinètica de pseudo-segon ordre i es va ajustar amb la isoterma de Langmuir. A més, es va avaluar la vida útil de la resina. Tots els assajos es feren amb tres tipus de mostra: FTOP, FTOP pretractada amb ultrafiltració (UF) i FTOP pretractada amb UF més nanofiltració (NF).

TRACTAMENT BIOLÒGIC

Es feren servir reactors biològics seqüencials (SBR: Sequential Batch Reactor). El període experimental es va dividir en tres etapes:

– ***Posada en marxa***

Es segueixen dos estratègies d'adaptació de la biomassa: 1) adaptació conjunta a l'alta salinitat i compostos fenòlics de les FTOP i 2) preadaptació inicial a mitjos salins, fent servir un aigua sintètica salina lliure de fenols, abans de l'adició de la FTOP. L'adaptació conjunta va ser millor, aconseguint alts rendiments d'eliminació de DQO (80%) i compostos fenòlics (97%). La biomassa bacteriana incrementà la seua població de *Proteobacteries* a mesura que anà augmentant la conductivitat en els SBRs.

– **Optimització del procés: rendiment i consum energètic**

Per incrementar el rendiment d'eliminació dels contaminants es feren tres actuacions: 1) es va establir la relació òptima de nutrients en les FTOP en 250:5:1 (DQO:Nitrògeno:Fòsfor). Es va comprovar que el dèficit de nutrients reduí el rendiment del SBR i un excés d'ells no va conduir a una millora significativa, 2) el pretractament de les FTOP amb carbó va permetre reduir el temps de retenció hidràulic de 40 a 16 dies, mantenint el rendiment del SBR i 3) l'augment i manteniment de la temperatura del licor de mescla a 30°C no va tindre l'efecte esperat, donant lloc a rendiments per baix dels obtinguts als SBRs a temperatura ambient. Les *Proteobacteries* representaren més del 70% de la població bacteriana. En quan a la població protista es trobà un únic ciliat (*Pseudocohnilembus sp*), que en alguns casos va conviure amb altra espècie flagel·lada (*Chilomastix sp*).

Per optimitzar el consum energètic es va reduir el temps d'aireació durant l'etapa de reacció, passant de 22 a 14 hores, amb una reducció mínima del rendiment del reactor.

TRACTAMENT TERCIARI

Durant el tractament biològic es va comprovar que les FTOP contenen aproximadament un 20% de matèria orgànica no biodegradable. Això fa necessari aplicar un tractament terciari al efluent obtingut del biològic, format per un sistema de membranes de UF i NF en sèrie. Amb este sistema s'aconseguí un efluent final apte per a la seua reutilització.

ABSTRACT

Title: “Aerobic biological treatment for wastewaters with high conductivity and phenol concentration”

The treatment of an industrial wastewater has been carried out in this Doctoral Thesis. This wastewater is the spent brine generated from the lactic Fermentation step during the “*Spanish Stile*” Table Olives Production (FTOP).

An integral treatment is proposed for the FTOP management, which finality is to reuse this effluent as new brine or as solution for olives conservation. The biological system is the main treatment studied, which is complemented by some pre-treatments and a tertiary treatment.

PHYSICO-CHEMICAL PRE-TREATMENTS

The main objective of pre-treatments was to reduce the pollutant concentration in the FTOP, to make easier the subsequent biological treatment. In addition, one of these pre-treatments also had as objective the recovery of the phenolic compounds from these wastewaters. These natural phenols are valuable compounds in the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

– Organic matter and phenols removal

pH adjustment, coagulants and flocculants addition and adsorption with powder activated carbon (PAC) were the techniques selected. Neither pH adjustment nor coagulation and flocculation achieved significant suspended solids and COD removal efficiencies. Therefore, these techniques were not considered as suitable pre-treatments for a subsequent biological treatment. The adsorption process achieved the highest COD and phenols removal

percentages. The reaction time was optimized and adsorption was modelled by Langmuir isotherm.

– ***Phenolic compounds recovery***

A non-ionic polymeric resin was used as adsorbent and ethanol as desorbent, to recover the phenolic compounds. The adsorption and desorption times were optimized; the adsorption process was described by a pseudo-second order kinetics and was fitted to Langmuir isotherm. Additionally, the resin reuse was evaluated. Three kinds of samples were used in the experiments: FTOP, ultrafiltrated FTOP and ultrafiltrated plus nanofiltrated FTOP.

BIOLOGICAL TREATMENT

Sequential batch reactors (SBR) were used. Experiments consisted of three steps:

– ***Start-up***

Two strategies for the process start-up were performed for biomass adaptation to the FTOP: 1) adaptation to the simultaneous presence of salt and phenolic compounds of FTOP and 2) pre-acclimation to saline environments using saline synthetic water without phenols and subsequent FTOP addition. The first strategy was the best, which achieved high COD (80%) and phenolic compounds (97%) removal efficiencies. Amounts of *Proteobacteria* population increased with increasing SBR conductivity.

– ***Optimization process: performance and energy consumption***

In order to increase the pollutants removal efficiencies three studies were carried out: 1) nutrients optimal relationship in the FTOP was 250:5:1

(COD:Nitrogen:Phosphorous). The SBR performance decreased for a nutrients ratio below the optimal one. No improvement in the SBR performance was observed with excess nutrients addition, 2) the hydraulic retention time decreased from 40 to 16 days when SBR was fed with pre-treated FTOP by adsorption with carbon and 3) the increase and maintenance of mixed liquor temperature at 30°C did not produce the expected results, driving to a SBR performance lower than that achieved in the SBR working at room temperature. More than 70% of the bacterial population belonged to the *Proteobacteria* phylum. Dominant ciliate specie (*Pseudocohnilembus sp*) was identified, which coexists with other flagellate specie (*Chilomastix sp*) in some periods of the experimental procedure.

Aeration time during reaction step was decreased from 22 to 14 hours in order to optimize the energy consumption. The reduction in the reactor yield was negligible.

TERTIARY TREATMENT

The biological process showed that the 20% of organic matter of the FTOP was non-biodegradable. Thereby; a tertiary treatment including a combined membrane system (ultrafiltration and nanofiltration in a series configuration), was necessary in order to treat the SBR effluent. This system provided a suitable final effluent for its reuse.

PREFACIO

PREFACIO

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha formado parte de un proyecto de investigación subvencionado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), perteneciente al Ministerio de Economía y Competitividad, que fue también cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. El proyecto global recibió el nombre de ITACA, el cual estuvo enmarcado dentro del Programa INNPRONTA (IPT-20111020). Su desarrollo se llevó a cabo entre el 16/08/2011 y el 21/12/2014, aunque cabe decir que la parte experimental incluida en esta Tesis Doctoral, se prolongó hasta julio de 2015. Este proyecto involucró a 10 empresas de ámbito nacional; ADASA, DEISA, Aqualia, Cespa, Cyclus, DAM, Dow, idener, JAP Energías Medioambientales y Técnicas Reunidas. Además, incorporó a 11 organismos de investigación, entre los que se incluye la Universitat Politècnica de València, que fue subcontratada por la empresa Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM).

De la colaboración surgida entre DAM y la Universitat Politècnica de València, surgieron tres becas de especialización, que permitieron el desarrollo de tres tesis doctorales, entre las que se incluye la presentada en este trabajo. Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo dentro del Programa de Doctorado de Ingeniería y Producción Industrial de la Escuela de Doctorado de la Universitat Politècnica de València.

El ámbito general del proyecto ITACA fue la investigación de nuevos conceptos de tecnologías de depuración para aguas residuales industriales o urbanas, que permitieran de una manera eficiente y sostenible, convertir el proceso de tratamiento en una estrategia para la reutilización y el aprovechamiento de sustancias, subproductos y residuos. Siguiendo este espíritu, se abordó el tratamiento de un agua residual procedente de la industria del procesado de aceitunas de mesa al “*Estilo Español*”. En concreto se trataron las salmueras agotadas procedentes de la etapa de fermentación láctica (FTOP). El planteamiento del tratamiento de este tipo

de aguas se realizó bajo la premisa de utilizar técnicas respetuosas con el medioambiente, que por supuesto fueran económicamente viables. Además, se le dio prioridad al uso de tratamientos que permitieran la reutilización del efluente con vistas a una generación de residuos cero (o lo más próxima a ello) y/o una reutilización de los recursos que emanen de ellos.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Este trabajo de investigación se ha dividido en siete capítulos, cuyo contenido se resumen a continuación. En el Capítulo I de “Introducción” se abordan las motivaciones que han llevado al desarrollo de esta Tesis Doctoral. Además, se plantea el objetivo principal perseguido y la forma de desarrollarlo a través del cumplimiento de una serie de objetivos secundarios. En el Capítulo II de “Antecedentes”, se evalúa el impacto económico de las empresas dedicadas a la producción de aceitunas de mesa, a nivel mundial y en España. En este capítulo también se detallan las etapas del proceso productivo realizado, llevando a cabo un exhaustivo estado del arte sobre las características de los efluentes generados, dando especial relevancia a los tratamientos aplicados hasta el momento. Con esta revisión se pone de manifiesto la necesidad de trabajar sobre tratamientos alternativos, que solucionen los problemas de gestión de las FTOP. En el Capítulo III se exponen los datos más relevantes de la investigación bibliográfica realizada sobre los tratamientos que se decidieron llevar a cabo. En capítulo llamado “Estudios Previos” se proporciona el conocimiento necesario y las pautas a seguir, para abordar la experimentación posterior. En el Capítulo IV se describen los “Materiales y Método Analíticos” utilizados durante el estudio realizado. En él se describen las plantas piloto y los equipos de medición usados. Así mismo, se detallan los métodos analíticos empleados en la determinación de los diferentes parámetros seleccionados. La “Metodología Experimental” seguida se detalla en el Capítulo V, el cual se ha dividido en varias secciones. En cada una de estas secciones se abordan las diferentes actuaciones llevadas a cabo, para el tratamiento

integral de las FTOP: pretratamientos, tratamiento biológico principal y tratamiento terciario. Los “Resultados” obtenidos se presentan en el Capítulo VI en formato de artículo científico (versión autor). Se ha optado por este formato porque cada uno de los objetivos planteados y estudiados se ha plasmado en un artículo de investigación, obteniendo a través de su lectura la comprensión global del trabajo realizado. En total se han escrito siete artículos de los cuales seis están publicados y el último se ha sido enviado recientemente para su publicación. Todas las revistas seleccionadas son publicaciones de ámbito internacional indexadas al JRC (Journal Citation Reports), situadas en el primer cuartil dentro de la categoría de Ingeniería Química e Ingeniería Ambiental. En la Tabla 1 se detallan los trabajos publicados y en la Tabla 2 se puede el ver el artículo enviado recientemente. Por último, en el Capítulo VII se enumeran las “Conclusiones” obtenidas tras el análisis de todos los datos aportados.

Otras contribuciones de esta Tesis son las siguientes:

- Publicación en una revista de difusión nacional, relacionada con el ámbito profesional del tratamiento de aguas.

Tratamiento de salmueras del procesado de la aceituna. Tecnoaqua n° 10, Noviembre-Diciembre 2014, pag. 70-76. E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, L. Pastor-Alcañiz, S. Doñate-Álvarez.

- Comunicación póster en congreso.

Biological treatment of the fermentation brine of table olives processing, E. Ferre-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, L. Pastor-Alcañiz. IWA, World Water Congress & Exhibition, 21-26 September 2014 Lisbon, Portugal.

Tabla 1. Artículos de investigación publicados.

	Revista	Factor de impacto
Fermentation brines from Spanish style green table olives processing: treatment alternatives previous to recycling or recovery operations. (2015)_DOI: 10.1002/jctb.4550	Journal of Chemical Technology and Biotechnology	Año 2015 2,738
Adsorption of raw and treated by membranes fermentation brines from table olives processing for phenolic compounds separation and recovery. (2015)_DOI: 10.1002/jctb.4807	Journal of Chemical Technology and Biotechnology	Año 2015 2,738
Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry. (2015)_DOI: 10.1016/j.cej.2015.03.062	Chemical Engineering Journal	Año 2015 5,310
Biological treatment performance of hypersaline wastewaters with high phenols concentration from table olive packaging industry using sequencing batch reactors. (2016)_DOI: 10.1016/j.jiec.2016.07.046	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	Año 2015 4,179
Effect of alternating anaerobic and aerobic phases on the performance of a SBR treating effluents with high salinity and phenols concentration. (2016)_DOI: 10.1016/j.bej.2016.05.010	Biochemical Engineering Journal	Año 2015 2,463
Brine recovery from hypersaline wastewaters from table olive processing by combination of biological treatment and membrane technologies. (2016)_DOI: org/10.1016/j.jclepro.2016.11.169	Journal of Cleaner Production	Año 2015 4,959

Tabla 2. Artículos de investigación en revisión.

	Revista	Factor de impacto
Dominance of a <i>Pseudocohnilembus</i> species in a wastewater treatment plant with SBR treating highly saline sewage from an olive production industry_ <i>Enviado el 3/04/2017</i>	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	Año 2015 4,179

NOTACIÓN

NOTACIÓN

ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
A_{Ph}	Área del pico representativo de un determinado compuesto fenólico proporcionada por el HPLC
A_{HQ}	Área del pico representativo de la Hidroquinona proporcionada por el HPLC
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CA	Carbón activo
CAP	Carbón activo en polvo
C.M	Carga másica
COT	Carbono orgánico total
C_{O_2}	concentración de OD en el licor de mezcla ($mg \cdot L^{-1}$)
C_{Ph}	Concentración de un determinado compuesto fenólico ($mg \cdot L^{-1}$)
C_{TY}	Concentración de tirosol ($mg \cdot L^{-1}$)
C_{HQ}	Concentración de la Hidroquinona ($mg \cdot L^{-1}$)
C_{HTY}	Concentración de hidroxitirosol ($mg \cdot L^{-1}$)
C_e	Concentración de soluto (fase líquida) en el equilibrio de adsorción ($mg \cdot L^{-1}$)
Cl^-	Cloruros ($mg \cdot L^{-1}$)
$C_{Ph,0}$	Concentración de fenoles iniciales en la fase líquida ($mg \cdot L^{-1}$)

Notación

$C_{Ph,eq}$	Concentración de fenoles en la fase líquida en equilibrio ($mg \cdot L^{-1}$)
DAM	Depuración de Aguas del Mediterráneo
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DNA	Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO_0	Demanda química de oxígeno inicial ($mg \cdot L^{-1}$)
$DQO_{degradada}$	Demanda química de oxígeno eliminada biológicamente ($mg \cdot L^{-1}$)
$DQO_{Ph,ads}$	Demanda química de oxígeno adsorbida correspondiente a los compuestos fenólicos ($mg \cdot L^{-1}$)
EDARU	Estación depuradora de aguas residuales urbanas
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares solubles
ESYRCE	Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos
FA	Formamida
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division
FISH	Fluorescence in situ hybridization: Hibridación in situ con sondas marcadas con fluoróforos
F/M	Food-to-microorganism ratio; Carga másica en función de los sólidos volátiles
FTOP	Fermentation brine from the table olive processing: Salmuera de fermentación de la aceitunas
FZ	Parámetro para medir color
GAC	Carbón activo granular

HPLC	High performance liquid chromatography: Cromatografía líquida de alta eficiencia
HQ	Hidroquinona
HTY	Hidroxitirosol
IAM	Instituto Agroforestal Mediterráneo
IIAMA	Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente
IOC	International Olive Council
ISIRYM	Instituto de Seguridad Industrial, Radiofísica y Medioambiental
ITQ	Instituto de Tecnología Química
K	Constante de adsorción
K_f	Constante de adsorción de Freundlich ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})^{-1/n}$)
k_{id}	Constante de velocidad de difusión intraparticular ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1/2}$)
K_L	Constante de adsorción de Langmuir ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$)
k_1	Constante de velocidad de primer orden (min^{-1})
k_2	Constante de velocidad de segundo orden ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
LM	Licor de mezcla
MF	Microfiltración
MBR	Membrane bioreactor: Biorreactor de membranas
NAD	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADP	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato
N_T	Nitrógeno total ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
NF	Nanofiltración

Notación

OC	Concentración de oxígeno consumido en la biodegradación ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
OD	Oxígeno disuelto
OI	Osmosis inversa
OUR	Oxygen uptake rate: Tasa de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
P_T	Fósforo total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Q	Caudal ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$)
Q_{ef}	Caudal diario de efluente ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$)
q_e	Masa de soluto adsorbida en el equilibrio por unidad de adsorbente ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
q_0	Capacidad máxima de adsorción por unidad de masa de adsorbente ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
q_t	Masa de soluto adsorbida en un tiempo determinado ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
RNA	Ribonucleic acid; Ácido ribonucleico
R_S	Concentración de oxígeno disuelto consumido en cada momento de la biodegradación ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
SAO	Solución de Ajuste Osmótica
SBR	Sequential batch reactor: Reactor biológico secuencial
SMP	Soluble microbial products: Productos microbianos solubles
SOUR	Specific oxygen uptake rate Tasa específica de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2\cdot\text{mg MLVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
SS_{ef}	Sólidos suspendidos en el efluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SS	Sólidos suspendidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SSLM	Sólidos suspendidos en el licor de mezcla ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

SSVLM	Sólidos suspendidos volátiles en el licor de mezcla ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
TAA	Total antioxidant activity: Actividad antioxidante total (mM Trolox equivalente)
T.Ph	Fenoles totales
t_R	Tiempo de retención
TRH	Tiempo de retención hidráulico
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxílico
TY	Tirosol
UF	Ultrafiltración
UPV	Universitat Politècnica de Valencia
UT	Unidades de toxicidad
V_R	Volumen de reacción (L)
Y_H	Coefficiente del rendimiento de producción de la biomasa heterótrofa
θ	Parámetro relacionado con la capa límite en el modelo intraparticular ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
ΔX	Producción neta de fangos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. MOTIVACIÓN.....	35
I.2. OBJETIVOS.....	37

I.1. MOTIVACIÓN

El agua apta para el consumo humano es un bien preciado que se debe conservar. Con el actual ritmo de industrialización y la sobrepoblación existente en zonas específicas del planeta, se produce una sobrecarga de contaminación que la naturaleza no es capaz de equilibrar, por lo que es de vital importancia reducir al máximo el vertido de contaminantes. Esta preocupación se ha plasmado en una legislación cada vez más restrictiva, que exige implantar tratamientos más eficaces y respetuosos con el medio ambiente, con el objetivo final de reducir a cero o lo máximo posible la generación de residuos.

Las industrias petroquímicas, industrias dedicadas al curtido de pieles, al procesado de pescado o al encurtido de verduras, tienen en común la generación de aguas residuales salinas con elevadas concentraciones de materia orgánica. Un ejemplo de este tipo de aguas residuales hipersalinas son las salmueras utilizadas para la fermentación de las aceitunas de mesa. Este tipo de agua residual tienen una naturaleza muy corrosiva, debido a su elevada salinidad, con contenidos en NaCl alrededor del 8% y conductividades entre 70 y 90 mS·cm⁻¹. Además, se trata de efluentes ácidos (pH alrededor de 4) con elevadas concentraciones de sólidos en suspensión y con un alto porcentaje de compuestos fenólicos. Su vertido al mar o al cauce de los ríos está prohibido en la actualidad, por su elevada salinidad (más del doble de la del agua de mar), DQO y por la presencia de compuestos fenólicos, con efectos fitotóxicos y antibacterianos que pueden afectar a los microorganismos presentes en los sistemas acuáticos. El método tradicional para tratar estas salmueras agotadas es mediante balsas de evaporación, que requieren de grandes superficies de tierra, generan malos olores y presentan el peligro de filtraciones al subsuelo, con la consecuente contaminación del suelo adyacente y de acuíferos cercanos. Aunque en la actualidad se siguen utilizando, la legislación cada vez más restrictiva prevé una necesidad de tratamientos alternativos más adecuados. Otra de las actuaciones que se llevan a cabo es su gestión en estaciones depuradoras, donde se mezclan con las aguas residuales urbanas. Esta práctica supone un

elevado coste para la industria productora de aceitunas, ya que incluye el transporte hasta la planta y el canon de depuración.

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de proponer tratamientos alternativos, que tengan en previsión el endurecimiento futuro de las leyes y que puedan llevarse a cabo en la propia industria generadora de una forma viable, tanto desde el punto de vista económico como medioambiental. En general, para el tratamiento de aguas residuales se prefieren los tratamientos biológicos, frente a otras posibles opciones, siempre que sea posible su aplicación. Esto es debido a que se trata de una técnica que permiten eliminar una amplia gama de contaminantes de una forma eficiente y respetuosa con el medio ambiente, con unos bajos costes asociados al tratamiento. El tratamiento biológico de aguas residuales hipersalinas es de por si complejo. Si además se suma la presencia de compuestos fenólicos en los efluentes a depurar, la dificultad del proceso biológico aumenta. A pesar de los problemas que ello plantea, la motivación principal de este trabajo de investigación es desarrollar un tratamiento biológico viable y eficaz para este tipo de aguas residuales, que abriría la posibilidad a su regeneración y reutilización dentro del proceso productivo, solucionando con ello la gestión de las mismas.

I.2. OBJETIVOS

Objetivo general

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es desarrollar y optimizar un sistema integral de depuración y regeneración de un agua residual industrial con elevado contenido en sal y compuestos fenólicos. Este sistema debe cumplir con las premisas de eficiencia y sostenibilidad con el medioambiente.

Para ello se propone un tratamiento biológico, que será complementado por una serie de pretratamientos y por un tratamiento terciario, que asegure las especificaciones de calidad necesarias para la reutilización del efluente final.

Objetivo específicos

Para conseguir el objetivo general planteado, será necesario ir desarrollando una serie de objetivos más específicos, a través de los cuales se podrá evaluar la viabilidad técnica de los procesos propuestos.

– 1º Objetivo específico: Caracterización del agua residual

Se llevará a cabo una revisión bibliográfica que permita conocer las características del agua residual a tratar y los tratamientos aplicados hasta el momento. Se establecerán los parámetros que se consideren más oportunos para caracterizar las FTOP y se llevará a cabo el análisis de muestras reales para establecer un rango y/o valor medio, para los parámetros seleccionados.

– 2º Objetivo específico: Estudio de los pretratamientos

Con los conocimientos adquiridos se establecerán los pretratamientos más adecuados. La finalidad de los mismos será conseguir la reducción de la materia contaminante del influente, para facilitar el tratamiento biológico

posterior. Además, se estudiará la posible recuperación de compuestos con alto valor añadido presentes (compuestos fenólicos). Para cumplir este objetivo se deberán seguir los siguientes pasos:

- Estudio bibliográfico de las técnicas seleccionadas, que proporcione el conocimiento necesario para la aplicación de las mismas al agua residual problema.
- Realización de los ensayos experimentales necesarios para determinar las condiciones óptimas para cada uno de estos pretratamientos. Con ello se obtendrá la cantidad de materia contaminante que se puede eliminar o la concentración de compuestos fenólicos que se puede recuperar. Así mismo, se determinarán los mecanismos en los que se fundamentan estos pretratamientos (ecuaciones de velocidad de reacción, isothermas...).

– *3º Objetivo específico: Aplicación del tratamiento biológico*

En primer lugar será necesario un estudio previo de los tratamientos biológicos llevados a cabo por otros investigadores, en condiciones similares a las planteadas. Para asegurar la viabilidad del proceso y con ello el cumplimiento de este objetivo, el procedimiento experimental deberá pasar necesariamente por las siguientes etapas:

- Puesta en marcha. Determinará la viabilidad de esta técnica para tratar las FTOP sin diluciones previas.
- Mejora del rendimiento del proceso. Una vez determinada la validez del tratamiento biológico aplicado, se llevarán a cabo los ensayos pertinentes para optimizarlo.
- Ahorro de energía. Se detectarán los posibles sistemas sobre los que se puede actuar y se realizarán los ensayos necesarios para verificar su efectividad, sin causar un detrimento del rendimiento del proceso.

En la consecución de todas estas etapas será fundamental el conocimiento de los factores que afectan o derivan de su aplicación. Para tener una comprensión total del sistema se realizarán los análisis físicos, químicos y biológicos necesarios.

– *4º Objetivo específico: Tratamiento terciario*

Se seleccionará el tratamiento que se considere más adecuado y se realizarán los ensayos necesarios que permitan evaluar su efectividad para conseguir el objetivo general planteado de regeneración del efluente con vistas a su reutilización.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

II.1. PRODUCCIÓN DE LAS ACEITUNAS DE MESA	45
II.1.1. Marco económico.....	45
II.1.2. Procesado de las aceitunas de mesa	47
II.1.2.1. <i>Aceitunas verdes de mesa al “Estilo Español”</i>	49
II.1.2.2. <i>Agua residual generada en el procesado</i>	52
II.1.3. Gestión del agua residual generada durante el procesado y envasado.....	54
II.2. SALMUERA DE FERMENTACIÓN DEL PROCESADO DE LA ACEITUNA (FTOP).....	57
II.2.1. Caracterización de las FTOP.....	59
II.3. BIBLIOGRAFÍA.....	61

II.1. PRODUCCIÓN DE LAS ACEITUNAS DE MESA

II.1.1. Marco económico

El olivo fue uno de los primeros árboles frutales cultivados por el hombre. Hay diversas teorías sobre el inicio del cultivo de la aceituna, pero aquellas que cobran más peso lo sitúan en Israel durante el período Calcolítico o Edad del Cobre [1].

La producción mundial de aceitunas se concentra principalmente en países Mediterráneos como España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos [2], donde adquiere una enorme importancia para la economía de estas regiones. Según los datos presentados en 2011 por el International Olive Council (IOC) [3] y el Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT) [4], el olivar mundial consta de aproximadamente 850 millones de árboles, que ocupan una superficie aproximada de 10 millones de hectáreas. En la Tabla II.1 se presenta la distribución de este cultivo en el año 2011, para los países productores.

En esta tabla se observa que, para el año señalado, España tenía la mayor superficie cultivada, aportando el 39,4% de la producción mundial de aceitunas. Estos datos nos hacen ver la importancia que este sector industrial tiene sobre la economía Española. El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente de España publicó en 2014 la “Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos” (ESYRCE) [5], en el cual se constató un aumento de la superficie cultivada de olivos respecto a las cifras presentadas en la Tabla II.1. La ESYRCE cifró en 2.593.523 las hectáreas de olivar en España, de las cuales el 83,44% se situaron en Andalucía, el 13,95% en Extremadura y el restante 2,61% en otras regiones.

Tabla II.1 Principales países productores de aceituna (Fuente: FAOSTAT [4])

País	Producción (tonelada)	Área cultivada (hectárea)
Mundo	19.845.300	9.634.576
España	7.820.060	2.330.400
Italia	3.182.204	1.144.420
Grecia	2.000.000	850.000
Turquía	1.750.000	798.493
Marruecos	1.415.902	597.513
Siria	1.095.043	684.490
Argelia	610.776	295.000
Túnez	562.000	1.779.950
Egipto	459.650	52.668
Portugal	443.800	434.200

La mayor parte de las aceitunas recolectadas se destinan a la producción de aceite y aunque sólo el 5,7% del terreno cultivado en España se dedica a la aceituna de mesa, cabe decir que nuestro país es el primer productor mundial del sector. Entre los años 2010 y 2015, España comercializó el 22% de la cuota global de mercado, generando más de 8.000 puestos de trabajo directos a nivel nacional. La Agencia de Información y Control Alimentario, que es un organismo autónomo adscrito al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente de España, publicó que en la campaña 2013/2014 la producción nacional de aceituna de mesa fue de 573.371 toneladas, de las cuales de exportaron el 57,1% [6].

Los datos aportados, nos proporcionan una visión global de la importancia que tiene la producción de aceitunas de mesa, en la economía española.

II.1.2. Procesado de las aceitunas de mesa

Aunque hay más de doscientas variedades de aceituna, no todas son aptas para su consumo como producto de mesa. Las principales variedades utilizadas en España para su consumo directo son: Manzanilla, Gordal, Hojiblanca, Carrasqueña, Cacereña, Aloreña, Verdial, Lechín y Picual [7]. Su recolección se lleva a cabo entre los meses de septiembre y diciembre.

La aceituna está compuesta en un 70% por grasas monoinsaturadas, de las cuales el 99% son ácido oleico. Otros componentes de especial importancia dentro de la composición de este fruto son los compuestos fenólicos, que suponen entre un 1% y un 3% de la masa total de la aceituna [8]. Los principales fenoles presentes en este fruto son el ligstrósido y la oleuropeína [9], nombrados por primera vez por Bourquelot y Vintilesco en 1908 [10]. Además de estos dos compuestos fenólicos, en función de la variedad de aceituna y estado de maduración se pueden encontrar otros. En la

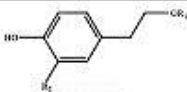
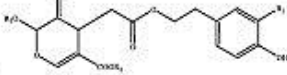
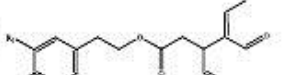
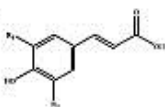
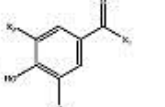
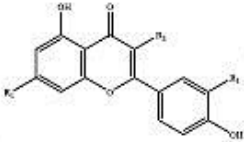
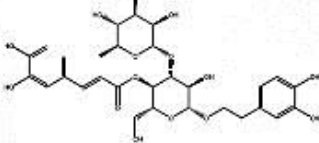
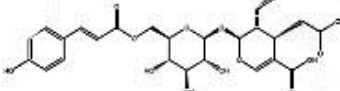
Tabla II.2 se detallan los principales grupos fenólico, junto a su estructura química, y los principales componentes de estos grupos.

Las aceitunas poseen un amargor natural debido a la oleuropeína. El objetivo principal del procesado de las aceitunas de mesa es eliminar este amargor, para hacerlas comestibles. Las técnicas de procesado más utilizadas son:

- “*Estilo Español*”, donde se procesan las aceitunas verdes en salmuera.
- “*Estilo Californiano*”, utilizado para las aceitunas negras procesadas con salmuera.
- “*Estilo Griego*”, para aceitunas al natural.

Según los datos proporcionados por el IOC en 2014, aproximadamente el 60% de la producción mundial de aceitunas de mesa correspondió al “*Estilo Español*”.

Tabla II.2. Estructura química de los principales compuestos fenólicos en los subproductos de la producción de aceite de oliva (Araujo et al. [11]).

Phenolic group	Chemical structure	Compounds
Phenyl alcohols		Hydroxytyrosol: R ₁ = H; R ₂ = OH Hydroxytyrosol glucoside: R ₁ = glucose; R ₂ = OH Tyrosol: R ₁ = H; R ₂ = H
Secoiridoids		Oleuropein: R ₁ = OH; R ₂ = CH ₃ ; R ₃ = glucose 3,4-DHPEA-EA: R ₁ = OH; R ₂ = CH ₃ ; R ₃ = H Ligstroside: R ₁ = H; R ₂ = CH ₃ ; R ₃ = glucose
		3,4-DHPEA-EDA: R ₁ = OH p-HPEA-EDA: R ₁ = H
Phenolic acids/aldehydes		Caffeic acid: R ₁ = OH; R ₂ = H p-Coumaric acid: R ₁ = H; R ₂ = H Ferulic acid: R ₁ = H; R ₂ = OCH ₃
		Galic acid: R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH Vanillic acid: R ₁ = OH; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = H Protocatechuic acid: R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = H Vanillin: R ₁ = H; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = H
Flavonoids		Rutin: R ₁ = OH; R ₂ = O-rutinoside; R ₃ = OH Luteolin: R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = OH Luteolin-7-O-glucoside: R ₁ = OH; R ₂ = O-glucose; R ₃ = OH Apigenin: R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = H Apigenin-7-O-glucoside: R ₁ = OH; R ₂ = O-glucose; R ₃ = H
Phenylethanoid glycoside		Verbascoside
p-Coumaric acid derivative		Comaelogoside

II.1.2.1. Aceitunas verdes de mesa al “Estilo Español”

El procesado de la aceituna de mesa al “Estilo Español” consta principalmente de tres etapas:

Etapa 1: Cocido. Durante esta etapa las aceitunas se sumergen en una disolución de hidróxido sódico (NaOH 1-2% peso/volumen) durante un periodo de tiempo que suele variar entre 8 y 12 horas. En ese tiempo, la sosa penetra a través de la carne de la aceituna y se produce la hidrólisis del ligstrósido y de la oleuropeína, eliminando con ello el amargor del fruto. Estos dos compuestos fenólicos polares se encuentran como glucósidos, que son los precursores de sus derivados en forma aglicona, la cual presenta una mayor polaridad. Durante la hidrólisis, la oleuropeína-aglicona se descompone en hidroxitirosol y en ácido elenólico, y el ligstrósido-aglicona en tirosol y también ácido elenólico, tal y como se observa en la Figura II.1.

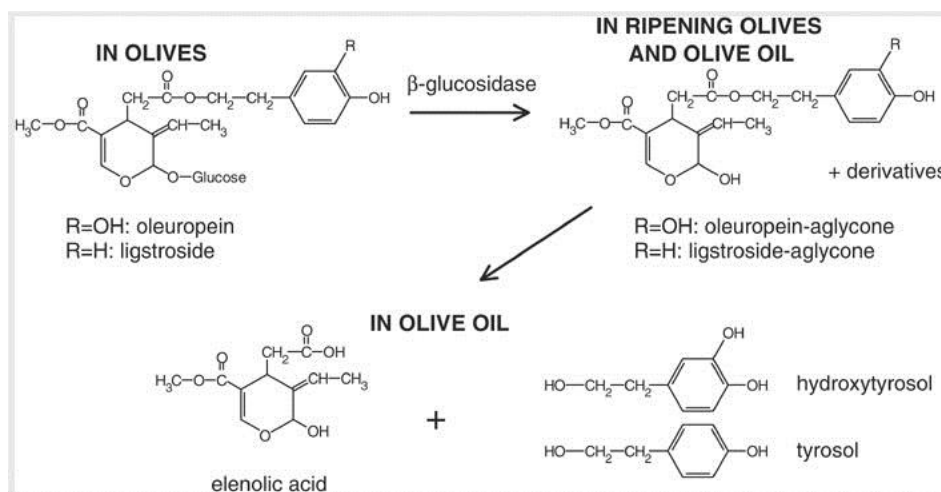


Figura II.1. Estructura de la oleuropeína y el ligstrósido junto a los productos derivados de su hidrólisis alcalina (Brenes et al. [12]).

Durante el cocido se deja penetrar la sosa a través de las tres cuartas partes de la carne de la aceituna, dejando la porción de la drupa alrededor del hueso sin estar afectada. Esto se hace para que la aceituna conserve un ligero sabor amargo y para que esta porción de carne aporte los azúcares necesarios durante la etapa de fermentación [13].

Etapa 2: Lavado. En esta etapa se elimina la disolución alcalina y se procede al lavado de las aceitunas. Actualmente, se han sustituido los dos lavados que se hacían tradicionalmente por un único lavado que dura entre 12 y 14 horas, con el objetivo de reducir el volumen de agua residual generado.

Etapa 3: Fermentación. La última etapa del procesado consiste en sumergir las aceitunas en salmuera (contiene entre un 4 y un 8% de cloruro sódico) durante 2 o 3 meses. Durante este proceso, las aceitunas adquieren las cualidades organolépticas deseadas. La fermentación produce la degradación del glucósido del ácido elenólico [12], con lo que se libera glucosa. Esta glucosa, junto a los azúcares difundidos desde la carne de las aceitunas, se utiliza como fuente de energía por los microorganismos fermentativos (*Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* [14]), transformándolos en ácidos orgánicos (principalmente en ácido láctico) [15], que provoca la disminución del pH de las salmueras hasta valores por debajo de 4,5. Durante la fermentación, los compuestos solubles en agua (carbohidratos, compuestos fenólicos...) se difunden desde la aceituna a la salmuera y la sal lo hace en sentido contrario, penetrando en el fruto. Otro factor que contribuye a la reducción del pH de la salmuera, es la difusión de los fenoles ácidos contenidos en la aceituna. Durante la fermentación se reduce el contenido fenólico de las aceitunas entre un 40 y un 60%, según la variedad utilizada, pasando a formar parte de la salmuera [16].

Posteriormente se preparan las aceitunas en sus distintas versiones: deshuesado, relleno... y finalmente se envasan. Para el envasado de las aceitunas se utiliza el denominado *líquido de gobierno*, cuyo contenido en sal depende del acabado

final de la aceituna. Según el Documento BOE-A-1983-2208, el contenido en sal del líquido de envasado debe estar entre un 4% y un 6% en aceitunas verdes en salmuera, aderezadas, al natural o aliñadas con un pH entre 4 y 4,5. En el caso de aceitunas pasteurizadas el contenido en sal puede bajar hasta el 2%, manteniendo el pH por debajo de 4,3. En aceitunas rellenas el porcentaje en NaCl no puede estar por debajo del 5% y el pH máximo permitido es de 4. El ajuste de pH del *líquido de gobierno* se suele ajustar con ácido láctico.

En la Figura II.2 se presenta un esquema donde se resumen las etapas llevadas a cabo durante la producción y envasado de las aceitunas de mesa al “*Estilo Español*”.



Figura II.2. Etapas del procesado de las aceitunas de mesa al “*Estilo Español*”

II.1.2.2. Agua residual generada en el procesado

Durante todo el proceso de producción de las aceitunas de mesa al “*Estilo Español*”, se generan importantes cantidades de agua residual. Éstas pueden fluctuar entre 3,9 y 7,5 m³ por cada tonelada de aceituna tratada, en función del método productivo y de la variedad utilizada [2]. Por otro lado y aunque no forma parte del proceso de producción propiamente dicho, se debe considerar la etapa de envasado. El envasado se puede realizar en la misma zona productiva o bien puede tratarse de una industria independiente. En el caso de tratarse de una empresa independiente, el agua residual que deben gestionar engloba la salmuera agotada de la etapa de fermentación (en la que llegan las aceitunas sumergidas) y otros efluentes, como el agua empleada en lavar las aceitunas o los frascos empleados como envase. El volumen de agua residual generado en estas plantas es muy elevado, pudiendo variar entre 6 y 12 m³ por cada tonelada de aceituna tratada [17].

La composición del agua en las etapas de cocido, lavado y fermentación, ha sido estudiada por diversos autores [8,18,19]. Entre estos cabe destacar el trabajo realizado por Parinos et al. [13], en el que se realizó una caracterización exhaustiva del agua residual de una planta situada en Grecia (Tabla II.3). Estos datos permiten evaluar la contribución que cada etapa tiene sobre la carga contaminante global del agua residual generada. Teniendo en cuenta los valores de la concentración de fenoles totales, se observa que durante el cocido las aceitunas pierden la mayor parte de su contenido fenólico, el cual se transfiere a las aguas de cocido y de lavado. La elevada DQO de estas aguas es debida a la presencia de estos fenoles y a otras sustancias como azúcares, compuestos nitrogenados (aminoácidos), ácidos orgánicos, taninos, pectinas, carotenoides y residuos de aceite. Otra característica importante de las aguas de cocido y lavado es su elevado pH, debido al álcali utilizado.

Tabla II.3. Parámetros físico-químicos de las aguas residuales generadas en el procesamiento de las aceitunas de mesa al “Estilo Español” (Parinos et al. [13]).

	Debittering	Whasing	Fermetation
COD (mg/L)	9390	13630	18910
BOD ₅ (mg/L)	3115	4640	6050
pH	12.99	11.52	4.3
Electrical Conductivity (mS/cm)	11.13	10.17	53.10
Colour	1.96	1.44	0.49
Total phenols (mg/L)	211.2	446.1	182.1
Phenolic compounds (mg/L)			
Benzoic acid	0.93	1.50	0.80
2-Phenoxyethanol	1.69	2.76	0.27
<i>Trans</i> -Cinnamic acid	1.67	1.23	N.D
4-Hydroxyphenyl ethanol (tyrosol)	16.33	47.40	16.83
n-3-Phenylacetic acid	8.09	1.79	1.69
3,4-Dimethoxybenzoic acid	1.86	10.91	3.96
Vanillic acid	5.55	5.43	2.69
3,4-Hydroxyphenyl ethanol (hydroxytyrosol)	9.69	16.21	6.09
3,4-Dihydroxybenzoic acid	10.26	1.52	0.26
Syringic acid	N.D	10.25	4.59
4-Hydroxycinnamic acid	4.18	6.00	1.33
Dibutyl phthalate	7.03	9.71	32.82
Gallic acid	5.09	0.96	3.89
Feluric acid	2.00	1.56	1.00
Caffeic acid	6.32	N.D	0.19
Total	80.39	117.23	76.41
Organic acids (mg/L)			
Oxalic acid	4.21	6.19	0.89
Cyclohexane carboxylic acid	5.00	N.D	N.D
D,L-lactic acid	N.D	6.64	63.66
D,L-malic acid	1.21	2.18	44.34
Citric acid	2.48	2.86	2.40
Palmitic acid	4.28	5.02	0.25
Oleic acid	2.53	N.D	0.29
Formic acid	3.77	4.31	25.31
Acetic acid	N.D	N.D	20.00
Butyric acid	3.9	N.D	N.D
Total	27.38	27.20	157.23
Amino acids			
Aspartic acid	14.52	21.36	7.20
Glutamic acid	9.10	13.39	4.11
Arginine	8.20	11.56	2.43
Total	31.82	46.31	13.74
Total sugars (mg/L)			
Hexozes	72.44	94.86	32.12
Pentozes and uronic acid	76.89	98.54	31.87

Para las aguas de fermentación cabe destacar en primer lugar su elevada conductividad, debida a la elevada concentración de sal empleada en su preparación. Otra característica importante es su bajo pH, que tal y como se ha comentado en la sección II.1.2.1, es debida a la presencia de ácidos fenólicos y de ácidos orgánicos como el fórmico, acético y principalmente láctico. Aunque la concentración fenólica en las aguas residuales de fermentación es menor que en las otras dos, la DQO es más elevada, debido principalmente a la presencia de estos ácidos orgánicos. Otra característica destacable, es la reducción que se registra en la concentración de azúcares y aminoácidos por la acción de los microorganismos fermentativos, que los utilizan como fuente de energía.

II.1.3. Gestión del agua residual generada durante el procesado y envasado

Tradicionalmente, la gestión de los efluentes líquidos generados en las industrias de procesado y envasado de las aceitunas de mesa ha sido la siguiente:

- Descarga directa al mar o al cauce de ríos. Esta práctica supone un grave deterioro del ecosistema donde se descarga, ya que la presencia de compuestos fenólicos puede tener un efecto devastador sobre los microorganismos presentes en los sistemas acuáticos, debido a los efectos fitotóxicos y antibacterianos que tienen los fenoles [20,21].
- Descarga en balsas de evaporación sin tratamiento previo. Aunque las balsas utilizadas deben estar impermeabilizadas, existe un elevado riesgo de filtraciones que puede acarrear la contaminación de suelos y aguas subterráneas. Además, es habitual que la aportación de efluentes sea superior a la capacidad de evaporación, por lo que finalmente estos sistemas se convierten en balsas de acumulación, que generan malos olores.

- Dilución con aguas urbanas para tratar en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Esta práctica puede repercutir negativamente sobre el tratamiento biológico de fangos activos llevado a cabo en este tipo de depuradoras, debido a la elevada salinidad y concentración de compuestos fenólicos. En las EDAR con cultivos bacterianos convencionales, concentraciones de sal por encima de un 1-2% pueden conducir a la pérdida de actividad de las células y una disminución de la capacidad de sedimentación [22,23]. Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden causar la inhibición de la actividad microbiana debido a su acción bactericida ya comentada. Es por ello que este tipo de gestión tiene un precio muy elevado para la empresa productora, que además debe costear el transporte de los efluentes.

Aunque los últimos dos tipos de actuaciones siguen vigentes, la presión ejercida por las nuevas normativas ambientales cada vez más restrictivas, junto a un creciente control por parte de la administración pública para su obligado cumplimiento, ha generado la necesidad de buscar nuevos sistemas de depuración más eficaces y respetuosos con el medioambiente.

Durante los años 80, se llevó a cabo una importante labor de investigación para reducir al máximo las necesidades de agua dentro del proceso, lo cual contribuyó a minimizar de forma significativa el volumen de agua residual generada. Los trabajos realizados por Garrido et al. [24] y por Santos Siles [25], demostraron que es posible reutilizar las aguas de cocido durante aproximadamente 15 etapas, sin que se pierdan las cualidades organolépticas de las aceitunas. Sin embargo, estos mismos autores, comprobaron que no es posible la reutilización de las aguas de lavado, proponiendo reducir de los dos lavados que eran habituales a un solo lavado, con una duración de entre 12 y 14 horas. Cabe decir, que estas dos medidas se han ido implementando en numerosas industrias del sector, con un ahorro aproximado de 1,1 m³ de agua y 5,66 kg de NaOH, por cada tonelada de aceituna tratada [26]. Otra línea de investigación llevada a cabo fue la eliminación de la etapa de lavado neutralizando la alcalinidad del agua de cocido con HCl [27,28]. Sin embargo,

los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que la adición de HCl provocó la inhibición de la fermentación láctica posterior. En cuanto a la reutilización directa de salmueras para un nuevo proceso de fermentación o bien como líquido de gobierno para el envasado, los estudios realizados no recomendaron esta práctica, ya que afectó significativamente a la calidad final de las aceitunas [29].

Una vez hechos todos estos esfuerzos para reducir al máximo los efluentes residuales generados durante el proceso, las investigaciones han ido encaminadas a buscar las técnicas más adecuadas para la depuración de los mismos. Aunque tradicionalmente se han mezclado las corrientes finales de cada proceso, existen diversos factores que indican que la segregación y tratamiento por separado, puede aumentar la eficacia de los mismos. Estos factores a tener en cuenta son:

- Estacionalidad del cultivo. Las aguas de cocido y lavado únicamente se generan durante la campaña de la aceituna, entre los meses de septiembre a diciembre. Sin embargo, la industria del envasado sigue generando agua residual durante todo el año.
- Características físico-químicas de los efluentes. En la Tabla II.3, se ha visto la similitud entre las aguas de cocido y lavado y las diferencias que presentan con respecto a las de fermentación. Estas diferencias vienen reflejadas en parámetros como el pH y la conductividad, así como en su composición (diferencias significativas en el contenido de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos).
- En general, los costes del tratamiento de las aguas residuales se reducen conforme disminuye el volumen a tratar.

Es por tanto recomendable separar por un lado el agua residual generada durante el cocido y el lavado y por otro, las generadas durante la fermentación y la etapa de envasado.

II.2. SALMUERA DE FERMENTACIÓN DEL PROCESADO DE LA ACEITUNA (FTOP)

Las salmueras de fermentación utilizadas en el procesado de las aceitunas de mesa al “*Estilo Español*” se conocen por sus siglas anglosajonas como FTOP (Fermentation brines from the Table Olive Processing), dentro del ámbito de la divulgación científica. Es por ello que se va a utilizar esta nomenclatura durante todo este trabajo.

Las FTOP son un ejemplo de agua residual industrial hipersalina que contienen compuestos fenólicos. Cabe decir, que aunque esta Tesis Doctoral se centra en la depuración de las FTOP, los resultados obtenidos podrían ser utilizados en el tratamiento de otras aguas residuales con características similares, como por ejemplo las generadas en la industria petroquímica [30].

La depuración de las FTOP reviste una especial problemática debido a sus características físico-químicas ya comentadas, entre las que cabe destacar su naturaleza corrosiva (debida al elevado contenido en sal), su acidez y su elevada concentración en sólidos en suspensión y materia orgánica, entre la que se incluyen los compuestos fenólicos. Tras llevar a cabo un exhaustivo estado del arte, cabe destacar que existen múltiples estudios acerca del tratamiento de aguas residuales procedentes de la producción del aceite de oliva. Sin embargo, para el caso del tratamiento de aguas residuales del procesado de la aceituna, los trabajos de investigación se reducen de forma significativa y para el caso particular del tratamiento por separado de las FTOP, la bibliografía específica es muy escasa. Los tratamientos propuestos hasta el momento, son los siguientes:

- Durkee et al. [31] propusieron en 1973 un sistema de evaporación con combustión sumergida, para evitar los efectos corrosivos de este tipo de aguas, con la finalidad de recuperar la sal de las salmueras agotadas.
- Leoni et al. [32] propusieron la adición de NaOH (hasta un pH de 11) y de un polielectrolito, en combinación con un tratamiento final de adsorción con

carbón activo. Brenes y Garrido [33] también propusieron la adsorción con carbón, como un posible método para eliminar el color de las salmueras agotadas.

- Brenes et al. [34] aplicaron en 1988 la ultrafiltración como tratamiento de las FTOP. Estudiaron diversos factores que afectan al rendimiento de este tipo de membranas y obtuvieron las condiciones óptimas de trabajo para una membrana de polisulfonato de 1.000 Da. Además, realizaron un estudio en el que reutilizaron parte de las salmueras regeneradas mediante ultrafiltración y adsorción [35], como líquido de envasado.
- El mismo equipo de investigación, en este caso dirigido por Garrido [35], integraron los tratamientos de adsorción con carbón activo y de ultrafiltración. Tras el tratamiento se evaluó la utilización de un 70 y un 35% de las FTOP regeneradas como líquido de envasado. Los resultados indicaron que añadir más de un 35% perjudicaba la calidad final de la aceituna y su conservación. Aunque los autores digan que con este procedimiento queda solucionado el problema de las salmueras, realmente no es así, ya que este tipo de actuación haría necesario tener almacenada una gran cantidad de FTOP regenerada hasta su utilización.
- Ya en el año 2000, estos mismos investigadores plantearon un tratamiento biológico para las FTOP con el que consiguieron rendimientos de eliminación de DQO entre el 75-85%. Cabe decir que para ello necesitaron diluir la FTOP hasta tener un 3% de NaCl, una DQO de 3000 mg·L⁻¹ y una concentración fenólica de 90 mg·L⁻¹ [36].
- Otras alternativas serían los tratamientos de oxidación, como los llevados a cabo por Rivas et al. [37] en 2003. El objetivo fue aumentar la biodegradabilidad de las salmueras disminuyendo la DQO mediante el reactivo de Fenton. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este tipo de reacciones pueden producir compuestos más tóxicos que los de partida. En un trabajo posterior, estos mismos autores implementaron esta técnica como pretratamiento a un proceso biológico aerobio posterior [38]. Este estudio se

centró en la modelización del sistema y no se presentaron datos claros sobre el rendimiento alcanzado.

- Otra de las técnicas propuestas para las FTOP vinieron de la mano de García-García et al. [39], que utilizaron la electrocoagulación. Estos autores obtuvieron porcentajes de reducción de DQO y fenoles del 40 y 78,8%, respectivamente. Para ello diluyeron la FTOP un 80%, obteniendo un agua simulada con una conductividad de $21 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, una DQO de $6850 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una concentración de fenoles totales de $428 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Con esta revisión llevada a cabo se concluye que ninguna de estas propuestas consigue solucionar el problema de las FTOP. En la mayoría de los casos presentados se necesita una dilución importante de estos efluentes, lo que conlleva un aumento considerable del agua residual a tratar y por lo tanto de los costes asociados. En otros casos se presentan técnicas, que aunque son viables desde el punto de vista técnico, no lo son desde el punto de vista económico y/o logístico, ya que no son adecuadas para grandes volúmenes de líquido.

II.2.1. Caracterización de las FTOP

En primer lugar es importante establecer el rango de variación en las características físico-químicas de las FTOP. En el apartado II.1.2.2 se ha hecho una primera aproximación al respecto a través de la Tabla II.3, gracias a los estudios llevados a cabo por Parinos et al. [13]. En la Tabla II.4 se observan la caracterización de las FTOP llevada a cabo por Fendri et al. [40] y por Romero-Barranco et al. [29]. Ambos recopilaban información de varias fuentes, presentando los datos en forma de rangos de variación de los parámetros considerados.

Tabla II.4. Rango de concentraciones para las salmueras de fermentación del procesado de aceitunas de mesa (Romero-Barranco et al. [29] y Fendri et al. [40]).

Características	Romero-Barranco	Fendri
DQO ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	16,0-26,0	10,0-35,0
DBO ₅ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	14,0-18,0	8,0-20-0
pH	3,6-4,3	3,8-4,2
Acidez libre ($\text{g Láctico}\cdot\text{L}^{-1}$)	5,0-10,0	6,0-15,0
Polifenoles ($\text{g Tanico}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,2-0,4	4,0-6,0
Color ($A_{440} - A_{700}$)	0,2-0,6	-

En esta tabla se observa que según Fendri la concentración de DQO puede variar entre 10.000 y 35.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, situándose el valor aportado por Parinos en el punto medio (18.910 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, Romero-Barranco presenta valores de DQO en un rango más estrecho. En cuanto a los fenoles totales, las concentraciones señaladas por Fendri son mucho más elevadas que las presentadas por Parinos (Tabla II.3; 182,1 $\text{mg gálico}\cdot\text{L}^{-1}$) y Romero-Barranco. Por último comentar que en las tres tablas presentadas coincide el valor de pH de las FTOP, que se encuentra alrededor de 4. En cuanto a la conductividad eléctrica sólo aporta datos Parinos, con 53,1 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. La concentración salina señalada por Romero-Barranco la sitúa entre 60 y 90 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl.

Las variaciones observadas pueden ser debidas a factores relacionados con el tipo de aceituna utilizada, tales como la variedad [16,18] y su grado de maduración [41], o relacionados con el proceso de producción, como la duración del proceso de cocido y/o fermentación [12].

II.3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Liphshitz, R. Gophna, M. Hartman, G. Biger, The beginning of olive (*olea europaea*) cultivation in the old world: A reassessment, *J. Archaeol. Sci.* 18 (1991) 441–453. doi:10.1016/0305-4403(91)90037-P.
- [2] G.C. Kopsidas, Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992) 629–631.
- [3] International Olive Council. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/147-microsite?lang=en_US. Last access date; February, (2016).
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT). <http://faostat3.fao.org/home/E>. Last access date; November, (2015).
- [5] P. Seoane-Spiegelberg, I. Barbier-Díaz, C. Barrero-Villar, Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE), Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado, 2014.
- [6] Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA). http://aplicaciones.magrama.es/pwAgenciaAO/InfMercadosAceituna_BalanceAceituna.aao. Last access date; November, (2015).
- [7] ASEMESA. Asociación de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. http://www.asemesa.es/content/datos_generales_del_sector. Last access; January, (2015).
- [8] M.J. Garrido-Fernández, A. Fernández-Díez, M.R. Adams, Table olives: production and processing, Published by Chapman and Hall, London, 1997.
- [9] M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Macheix, Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *J Agric Food Chem.* 34 (1986) 823–826. doi:10.1021/jf00071a014.
- [10] E. Bourquelot, J.C.R. Vintilesco, Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retré de l'olivier (*Olea europea* L), *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci.* 147 (1908) 533–535.
- [11] M. Araújo, F. Pimentel, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.* 45 (2015) 200–211. doi:10.1016/j.tifs.2015.06.010.
- [12] M. Brenes, L. Rejano, P. Garcia, A. Sanchez, A. Garrido, Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2702–2706. doi:10.1021/jf00058a028.

- [13] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, T.S. Giannopoulos, G.A. Pilidis, Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 339–343. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.061.
- [14] J. Arroyo-López, F. N. Bautista-Gallego, A. Rodríguez-Gómez, F. Garrido-Fernández, Predictive microbiology and table olives, in: A. Mendez-Vilas (Ed.), *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, Formatex Research Center, Badajoz, 2010: pp. 1452–1461.
- [15] M. Brenes, A. De Castro, Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing, *J. Sci. Food Agric.* 77 (1998) 353–358. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<353::AID-JSFA50>3.0.CO;2-G.
- [16] H. Kiai, A. Hafidi, Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014) 663–670. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.011.
- [17] A. Garrido-Fernández, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, Tratamiento de salmueras de fermentación de aceitunas verdes, *Int. J. Fats Oils.* 3 (1992) 291–298.
- [18] R. Malheiro, A. Sousa, S. Casal, A. Bento, J.A. Pereira, Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 450–457. doi:10.1016/j.fct.2010.11.023.
- [19] S. Charoenprasert, A. Mitchell, Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*), *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 7081–7095. doi:10.1021/jf3017699.
- [20] A. Ramos-Cormenzana, B. Juárez-Jiménez, M.P. Garcia-Pareja, Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 38 (1996) 283–290. doi:10.1016/S0964-8305(96)00061-3.
- [21] V. Marsilio, B. Lanza, Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998) 520–524. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199804)76:4<520::AID-JSFA982>3.0.CO;2-I.
- [22] F. Kargi, A.R. Dincer, Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation Fikret, *Enzyme Microb. Technol.* 19 (1996) 529–537. doi:10.1016/S0141-0229(96)00070-1.
- [23] J.L. Wang, X.M. Zhan, Y.C. Feng, Y. Qian, Effect of salinity variations on the performance of activated sludge system, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005) 5–8.
- [24] A. Garrido, J.L. Cordón, L. Rejano, F. González, F. Sánchez, Elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano con reutilización de lejías y supresión de

- lavados, *Grasas Y Aceites*. 30 (1979) 227–234.
- [25] F.J. Santos Siles, Las nuevas tecnologías aplicadas al sector de la aceituna manzanilla fina sevillana, *Grasas Y Aceites*. 50 (1999) 131–140.
- [26] Propuesta de desarrollo sostenible industrial del aderezo de aceitunas. <https://guadairasostenible.wordpress.com/reutilizacion-de-lejias-de-cocado/>. Last access; November, (2015).
- [27] A. De Castro, M.C. Durán-Quintana, M.C. García-García, F. Garrido-Fernández, A. González-Cancho, L. Rejano-Navarro, F. Sánchez Roldán, et al., Processing fruits of Gordal olive variety, without washing and with reusing lye solution, as Spanish Style green olives, *Grasas Y Aceites*. 34 (1983) 162–167.
- [28] F. González-Cancho, L. Rejano-Navarro, M.C. Durán-Quintana, F. Sánchez Roldán, P. García-García, A. de Castro, et al., Influence of HCl addition on the fermentation of Spanish green olives, *Grasas Y Aceites*. 34 (1983) 375–379.
- [29] C. Romero-Barranco, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido Fernández, Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001) 237–246. doi:10.1016/S0260-8774(00)00204-1.
- [30] G. Moussavi, B. Barikbin, M. Mahmoudi, The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR, *Chem. Eng. J.* 158 (2010) 498–504. doi:10.1016/j.cej.2010.01.038.
- [31] E.L. Durkee, E. Lowe, K.A. Baker, J.W. Burgess, Field test of salt recovery system for spent pickle brine, *J. Food Sci.* 38 (1973) 507–511. doi:10.1111/j.1365-2621.1973.tb01468.x.
- [32] C. Leoni, F. Grischott, G. Fortini, Trattamento di effluenti specifici dell'industria alimentari particolarmente ricchi di sostanze organiche, *Ind. Conserv.* 56 (1981) 173–177.
- [33] M. Brenes, A. Garrido, Regeneration of Spanish Style green table olive brines with charcoal and bleaching earth, *Grasas Y Aceites*. 39 (1988) 96–101.
- [34] M. Brenes Balbuena, P. Garcia-Garcia, A. Garrido-Fernandez, Regeneration of Spanish Style green table olive brines by ultrafiltration, *J. Food Sci.* 53 (1988) 1733–1766. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07829.x.
- [35] A. Garrido, P. García, M. Brenes, The recycling of table olive brine using ultrafiltration and activated carbon adsorption, *J. Food Eng.* 17 (1992) 291–305. doi:10.1016/0260-8774(92)90046-9.
- [36] M. Brenes, P. García, C. Romero, A. Garrido, Treatment of green table olive waste waters by an activated-sludge process, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (2000) 459–463. doi:10.1002/1097-4660(200006)75:6<459::AID-JCTB234>3.0.CO;2-D.
- [37] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, O. Gimeno, P. Alvarez, Optimisation of Fenton's

- reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines, *J. Hazard. Mater. B96* (2003) 277–290. doi:10.1016/S0304-3894(02)00217-0.
- [38] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, O. Gimeno, P. Alvarez, Treatment of brines by combined Fenton ' s reagent – aerobic biodegradation II . *Process modelling*, 96 (2003) 259–276.
- [39] P. García-García, A. López-López, J.M. Moreno-Baquero, A. Garrido-Fernández, Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 59–66. doi:10.1016/j.cej.2011.03.028.
- [40] I. Fendri, M. Chamkha, M. Bouaziz, M. Labat, S. Sayadi, S. Abdelkafi, Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1–13. doi:10.1080/09593330.2012.689364.
- [41] D. Ryan, K. Robards, S. Lavee, Changes in phenolic content of olive during maturation, *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (1999) 265–274. doi:10.1046/j.1365-2621.1999.00261.x.

CAPÍTULO III

ESTUDIOS PREVIOS

III.1. PRETRATAMIENTOS	69
III.1.1. Modificación del pH y Coagulación/Floculación	72
III.1.2. Adsorción	75
<i>III.1.2.1. Carbón Activo</i>	86
<i>III.1.2.2. Recuperación de compuestos fenólicos</i>	90
III.2. TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO	95
III.2.1. Tratamiento biológico de aguas hipersalinas	95
<i>III.2.1.1. Microorganismos Halotolerantes y Halófilos</i>	96
III.2.2. Biodegradación de compuestos fenólicos	102
III.2.3. Metabolismo celular y requerimiento de nutrientes	104
III.2.4. Reactores Biológicos Secuenciales	110
III.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO CON FASES ANAEROBIAS Y AEROBIAS ALTERNAS.....	115
III.4. TRATAMIENTOS TERCIARIOS	118
III.4.1. Tratamiento con membranas	120
III.5. RESUMEN.....	124
III.6. BIBLIOGRAFÍA	127

III.1. PRETRATAMIENTOS

La primera actuación a realizar sobre cualquier agua residual es la eliminación de sólidos gruesos. En el caso de las FTOP podemos encontrar desde porciones de aceituna y de huesos, hasta residuos del proceso de relleno como anchoas, pimientos... Estos gruesos se pueden eliminar fácilmente con un filtrado convencional.

Los pretratamiento tienen como objetivo principal reducir la contaminación inicial del agua residual, para facilitar el tratamiento posterior. En el caso de las FTOP, los pretratamientos que se han considerado tienen la finalidad de disminuir la concentración de sólidos suspendidos y de materia orgánica, incluidos los compuestos fenólicos. En esta Tesis Doctoral por tanto, no se contemplan los pretratamiento como los típicos procesos de desbaste, desarenado o desengrasado que se llevan a cabo en las EDARU, sino como cualquier tratamiento que se pudiera anteponer al tratamiento biológico para facilitar el mismo. El tipo de contaminación de la que se está hablando, en el caso concreto de las FTOP, sería la siguiente:

- Los sólidos totales presentes en las aguas residuales se pueden clasificar en sólidos filtrables y no filtrables. Los no filtrables se denominan sólidos en suspensión (SS) y son aquellos que quedan retenidos en un filtro (normalmente de fibra de vidrio o policarbonato) con un tamaño nominal de poro de 1,2 μm [1]. Los filtrables corresponden a la fracción de sólidos coloidales (0,001 y 1 μm) y a los sólidos disueltos. Las FTOP tienen concentraciones elevadas de sólidos, con valores de los SS que pueden variar entre 200 y 2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [2–4]. Por otro lado, en las salmueras utilizadas en la producción de alimentos, la concentración de partículas coloidales también es elevada y en su mayoría tiene una naturaleza orgánica (pectinas, aminoácidos...) [5].
- En cuanto a la fracción orgánica de este tipo de aguas residuales, los componentes mayoritarios son: compuestos fenólicos, particularmente tirosol e hidroxitirosol [6,7], ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico,

principalmente), taninos, pectinas, carotenoides y los residuos de aceite. Además, se pueden encontrar pequeñas cantidades de azúcares y aminoácidos, que no se hayan transformado en ácido láctico durante la fermentación [8]. La DQO en las FTOP puede variar entre 10.000 y 35.000, en función del tipo de aceituna, estado de maduración, tiempo de fermentación...[5,6,9].

Existen multitud de técnicas desarrolladas para reducir la concentración de SS y de materia orgánica de las disoluciones acuosas [10], tales como las presentadas en la Figura III.1. De las posibles técnicas que se pueden ver en esta figura se seleccionaron los siguientes pretratamientos físico-químicos, para ser usados en las FTOP: adsorción, modificación del pH con posterior sedimentación y adición de coagulantes y floculantes, con y sin modificación del pH y con posterior sedimentación. Estas técnicas van a permitir la eliminación o reducción de los SS, del material coloidal y de parte de la materia orgánica, ayudando con ello a disminuir la acción inhibitoria que las FTOP pueden tener sobre los sistemas biológicos.

Los pretratamientos seleccionados presentan una serie de ventajas sobre los demás, que los hacen idóneos para este tipo de aguas residuales. En primer lugar, los tratamientos de oxidación están indicados para aguas residuales con concentraciones de DQO moderadas y volúmenes a tratar bajos [11], por lo que su aplicación para las FTOP tendría un coste muy elevado. Por otro lado, los métodos electroquímicos presentan consumos energéticos mayores que los asociados a las técnicas seleccionadas. Por último cabe mencionar las membranas, las cuales ya se han aplicado al tratamiento de aguas residuales generadas durante la producción de aceite de oliva [12–14]. El principal problema que surge de la aplicación de esta tecnología es el ensuciamiento de las membranas, debido principalmente a la materia orgánica contenida en la corriente a tratar. Es por ello que se ha considerado más apropiado utilizar membranas como tratamiento terciario del efluente del biológico, en lugar de como pretratamiento de las FTOP. En la corriente tratada en el sistema biológico, se habrá eliminado una gran cantidad de la DQO inicial y por lo

tanto, el ensuciamiento de las membranas será mucho menor que si se aplicara como pretratamiento.

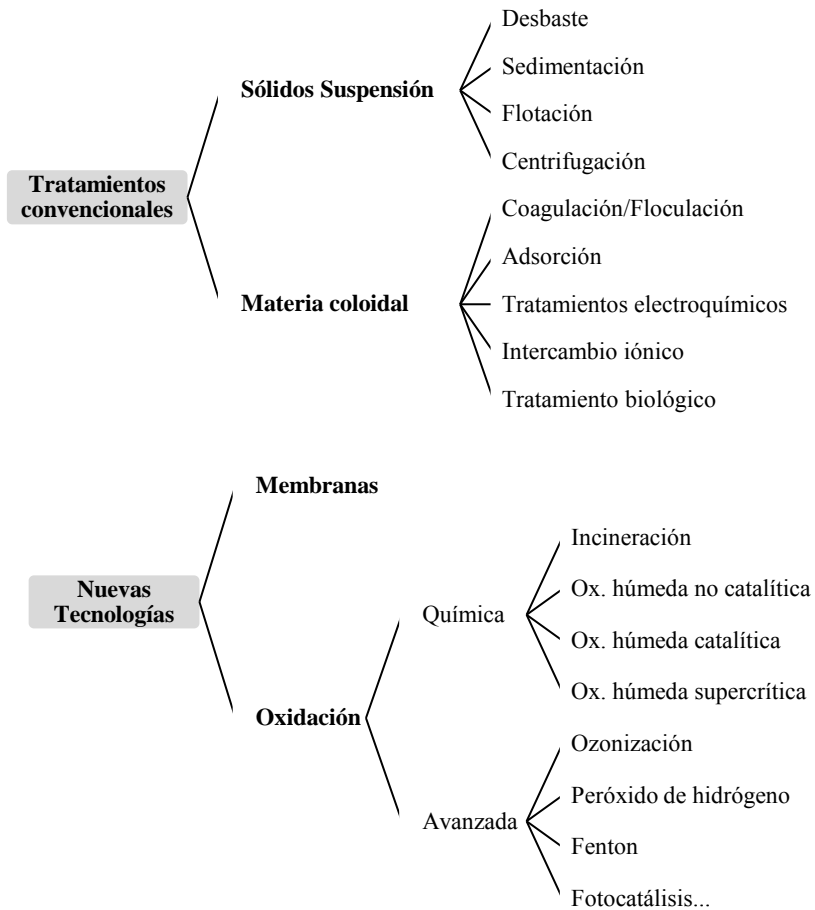


Figura III.1. Tecnologías aplicadas al tratamiento de aguas residuales [10].

III.1.1. Modificación del pH y Coagulación/Floculación

Las partículas coloidales poseen una carga eléctrica que depende principalmente de la ionización de sus grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, sulfato y grupos amino) y de la adsorción preferencial de iones presentes en la disolución sobre su superficie. La carga de los coloides en aguas residuales suele ser negativa y su magnitud está relacionada directamente con el contenido iónico y con el pH de la fase acuosa [15]. El parámetro físico que caracteriza esta carga es el potencia zeta, que para la mayoría de estas partículas en agua (donde el pH está entre 5 y 8) toma valores entre -14 y -30 mV [16,17]. Esta carga primaria se equilibra en la disolución acuosa, proporcionando una gran estabilidad a los sistemas coloidales. Este tipo de interacción descrita se explicó a partir de la teoría de la doble capa, la cual fue evolucionando desde su formulación. Helmholtz (1879) postuló que existe una capa de contraiones inmovilizados alrededor de la partícula debido a la atracción electrostática, la cual neutraliza la carga superficial de ésta. Sin embargo, Gouy y Chapman (1910-1917) indicaron que esta capa no era fija y que los contraiones estaban en continuo movimiento. Finalmente y para explicar de forma satisfactoria las características observadas en la doble capa, Stern (1924) combinó ambas teorías [15], situando una capa fija alrededor de la partícula, seguida de una capa difusa, tal y como se muestra en el esquema representativo de este modelo, que se puede observar en la Figura III.2.

Cuando se acercan dos partículas coloidales y se produce la interacción de sus capas difusas, se generan por un lado fuerzas con carácter atractivo, como las de Van der Waals y por otro, fuerzas con carácter repulsivo, como la energía potencial negativa debido a la repulsión de la doble capa eléctrica. Cuando las fuerzas de repulsión son mayores que las de atracción aparece una barrera energética que impide la aglomeración de coloides.

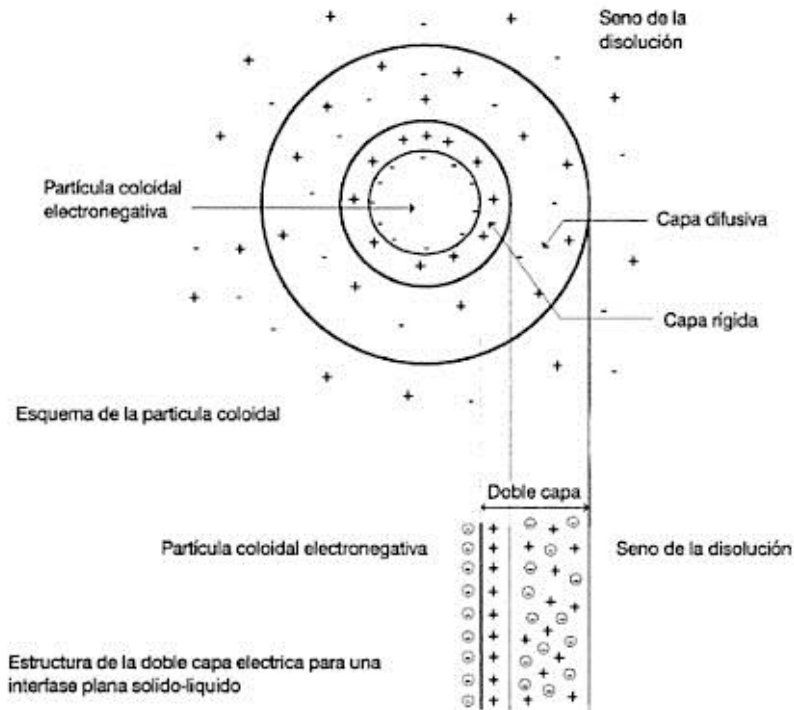


Figura III.2. Teoría de la doble capa de Stern (Aguilar et al. 2002 [15]).

La modificación del pH y la adición de coagulantes actúan sobre la carga de los coloides, haciéndola variar desde valores negativos a positivos. Cuando el potencial zeta se acerca a cero se produce la reducción de la doble capa eléctrica, dándose las condiciones óptimas para el acercamiento de las partículas. Por su parte, los floculantes facilitan la aglomeración de los coloides, para conseguir su sedimentación. Los floculantes son polímeros orgánicos que se adsorben en la partícula y forman puentes partícula-polímero-partícula [18].

Los factores que influyen sobre el proceso de coagulación/floculación son los siguientes [19,20]:

- Naturaleza del coagulante y el floculante. Los floculantes son polímeros sintéticos formados por macromoléculas de cadena larga, llamados también

polielectrolitos. Los coagulantes utilizados tradicionalmente han sido principalmente sales metálicas inorgánicas, como el sulfato de aluminio y el cloruro férrico. Actualmente, se están empleando otro tipo de reactivos más eficientes, entre los que se cuenta con sustancias tanto sintéticas como de origen natural. Entre estos dos tipos de reactivos cabe destacar que los sintéticos no son biodegradables, mientras que los de origen natural si lo son, aunque estos presentan el inconveniente de tener una vida útil más corta [21].

- Concentración de sólidos en el agua residual. Este parámetro va a determinar la concentración de coagulante que será necesaria, la cual se debe determinar de forma experimental mediante ensayos de jarras, más conocidos como Jar-test.
- Tamaño y distribución de las partículas. La coagulación es más fácil y por lo tanto requiere una menor concentración de reactivo, para sistemas coloidales con una distribución amplia de tamaños.
- pH. Es sin duda uno de los factores más importantes, ya que determina la naturaleza y solubilidad de las especies presentes. La coagulación al pH adecuado reduce la concentración de coagulante necesaria y optimiza la operación. El pH óptimo se debe determinar de forma experimental para cada coagulante y agua residual concreta.
- Temperatura. Este parámetro influye sobre la viscosidad, solubilidad, pH y cinética de las reacciones que se producen durante la coagulación. Normalmente, a menor temperatura menor es la eficiencia en la coagulación, ya que aumenta la viscosidad y se ralentizan las reacciones. También influye sobre la floculación, de forma que a menor temperatura mayor dificultad para formar flóculos.
- Agitación. Tras la adición del coagulante se requiere una agitación fuerte para destruir la estabilidad del sistema coloidal y promover las colisiones entre las partículas. Sin embargo, la floculación debe ser lenta, para evitar la rotura de los flóculos formados.

- Presencia de núcleos. La presencia de sólidos suspendidos favorece la formación inicial de flóculos y aumenta su densidad, dando lugar a una mayor velocidad de sedimentación. Por lo tanto, es aconsejable no realizar una sedimentación previa al tratamiento de coagulación.
- Salinidad. La presencia de cationes y aniones puede afectar a las propiedades superficiales de las suspensiones coloidales, dando lugar a diferencias en la coagulación respecto a las que presentaría el mismo sistema coloidal en agua dulce (diferentes pH y concentración de reactivos óptima). Duan et al. [22] compararon la eliminación de ácido húmico mediante coagulación en agua de mar, agua del grifo y agua desionizada, comprobando que la coagulación fue más rápida en agua de mar.

III.1.2. Adsorción

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material. Al material adsorbido se le denomina adsorbato o soluto y al material que lo retiene adsorbente [23].

La adsorción es una de las técnicas más utilizadas a nivel industrial para eliminar compuestos tóxicos y/o no biodegradables en corrientes líquidas [24]. Esta técnica presenta una serie de ventajas, en comparación con otras tecnologías ya mencionadas, como por ejemplo:

- Simplicidad de diseño y operación. El tratamiento de adsorción requiere de una serie de pasos muy sencillos; dosificación del adsorbente, tiempo de reacción y separación del adsorbente de la fase líquida. En función del tamaño y peso de las partículas de adsorbente, éste se podrá eliminar por sedimentación o será necesario la filtración o centrifugación del efluente.
- Bajo coste de operación. Los requerimientos de energía son inferiores a los que necesitan otras técnicas, como por ejemplo los tratamientos electroquímicos o los de oxidación avanzada. La rentabilidad del tratamiento

de adsorción pasa por la regeneración del adsorbente y su coste, en el que puede residir el factor limitante para que sea una técnica económicamente viable.

- Capacidad de adsorber múltiples compuestos contaminantes, donde no afecta la toxicidad del mismo. Por ello, se debe tener en cuenta que con esta tecnología únicamente se separa el contaminante de la corriente líquida, pero no se destruye.

Mecanismos de adsorción

Los principios teóricos y prácticos de la adsorción y la desorción están bien establecidos por diversos autores [25,26]. Para que se produzca la adsorción, el primer paso consiste en el transporte del soluto a través de la fase líquida, hasta que alcanza la interfase líquido-sólido. A continuación, tiene lugar la difusión del soluto a través del sistema de poros del adsorbente, hasta las zonas de adsorción donde se produce la fijación de las moléculas. Esta fijación o adsorción, depende de la atracción existente entre el adsorbato y el adsorbente y puede ser de tres tipos: eléctrico, físico y/o químico. En el de tipo eléctrico, llamado también adsorción por intercambio, dominan las fuerzas de atracción electrostática, de forma que los iones se concentran en las zonas cargadas de la superficie del adsorbente. Este tipo de interacción se produce con unos adsorbentes específicos que se denominan resinas de intercambio iónico, las cuales no son objeto de estudio en esta tesis doctoral.

En la Tabla III.1 se presentan las principales características de la adsorción de tipo físico, también denominada fisisorción y la de tipo químico, también conocida como quimisorción [27].

Tabla III.1. Características de la Fisorción y la Quimisorción.

FISISORCIÓN	QUIMISORCIÓN
Interacción adsorbente-adsorbato débil; Van der Waals, dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno	Enlaces fuertes
Adsorción reversible	Adsorción irreversible
Adsorción no específica	Adsorción específica
Monocapa y multicapa	Monocapa
No hay transferencia de electrones aunque si puede haber polarización	Transferencia de electrones que forman enlaces entre adsorbente- adsorbato

Tal como se aprecia en esta tabla, la quimisorción retiene el adsorbente de forma más fuerte, por lo que posteriormente será más complicada la regeneración del material. Por último se debe comentar que en la mayoría de los adsorbentes que existen se producen los dos tipos de adsorción al mismo tiempo, aunque normalmente predomina uno de ellos sobre el otro.

Equilibrio de adsorción: Isotermas

La cantidad de soluto que puede adsorber un determinado adsorbente viene determinada por una serie de factores, en los que influyen tanto las características del adsorbente y el adsorbato, como las de la fase líquida en la que se encuentran [28,29]:

- Superficie específica y porosidad del adsorbente. Dado que la adsorción es un fenómeno superficial, a mayor superficie específica y por lo tanto porosidad, mayor será la adsorción.
- Naturaleza y concentración del adsorbente. Las propiedades químicas superficiales del adsorbente, tales como los grupos funcionales, influyen

tanto en la selectividad y cantidad de soluto adsorbido, como en la velocidad de adsorción.

- Naturaleza y concentración del adsorbato en la fase líquida. La solubilidad del soluto repercute sobre la adsorción, de forma que a mayor solubilidad menor es la adsorción. De igual manera influye la estructura química, donde los grupos funcionales juegan un papel decisivo, ya que pueden facilitar la adsorción específica entre soluto-adsorbente. Por último, la naturaleza iónica también puede facilitar o no la adsorción, ya que los adsorbentes tienen una determinada carga específica. En cuanto a la concentración del soluto, cuanto mayor sea ésta en la fase líquida mayor será la cantidad adsorbida.
- Tamaño de partícula del adsorbato. En general y siempre que no se exceda el tamaño de poro del adsorbente, la adsorción se ve favorecida para las moléculas más complejas y con un peso molecular mayor.
- pH de la disolución. Este parámetro afecta por igual al adsorbente y al adsorbato. El pH determina el grado de disociación del soluto, lo que repercute en su solubilidad. Por otro lado, algunos adsorbentes presentan una elevada afinidad con los iones hidronio (H_3O^+), que competirían con el adsorbato, disminuyendo la adsorción de éste.
- Temperatura. La adsorción física es un fenómeno exotérmico, por lo que un aumento en la temperatura disminuiría la adsorción. Sin embargo, estas variaciones no suelen ser muy significativas ya que las entalpías de adsorción suelen ser muy bajas. Si pueden tener algo más de importancia en la quimisorción, donde las entalpías de adsorción son más elevadas, debido a la formación de enlaces y a que es un proceso espontáneo.
- Competencia entre solutos. Para mezclas multicomponentes la competencia afecta a la capacidad de adsorción de un soluto determinado y a la velocidad de difusión del mismo dentro del adsorbente.

En el proceso de adsorción, el soluto se ve atraído por el adsorbente y ligado a él hasta que se establece un equilibrio. En esta situación de equilibrio existe una

correlación entre la concentración de soluto adsorbida con respecto a la cantidad de adsorbente presente (q_e) y la concentración que queda en la disolución (C_e). Esta relación se expresa matemáticamente a través de las isothermas de equilibrio [30].

Brunauer et al. (1940) [31] hicieron una clasificación para los sistemas gas-sólido conocida como BDDT, que agrupa cinco tipos de isothermas. Posteriormente, se añadió una nueva y pasó a denominarse clasificación IUPAC [32], cuya representación gráfica se pueden ver en la Figura III.3.

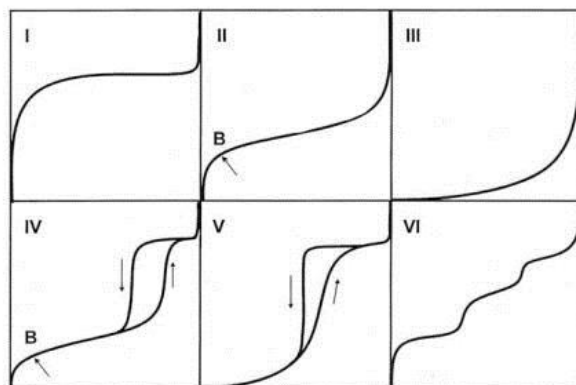


Figura III.3. Clasificación IUPAC: Isothermas de adsorción en sistemas gaseosos (Ruthven D.M. [25]).

La mayoría de las teorías de adsorción han sido desarrolladas para los sistemas gas-sólido, ya que son más sencillos de estudiar, adaptándose posteriormente a la adsorción líquido-sólido.

Para los sistemas en los que la adsorción se produce en el seno de una fase líquida, la clasificación más aceptada fue la aportada por Giles y su equipo de investigación en 1960 [33,34]. La clasificación de Giles (Figura III.4) presentó cuatro tipos de isothermas, que a su vez se subdividieron en cinco subgrupos.

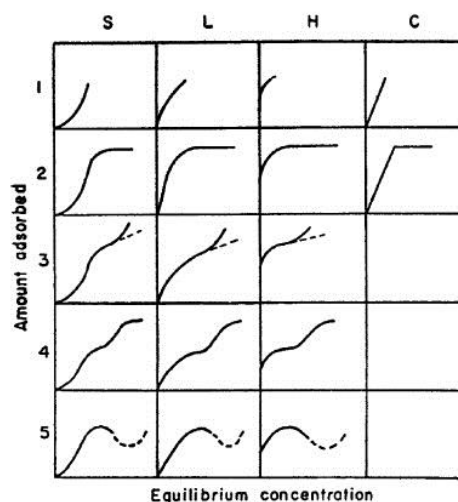


Figura III.4. Clasificación de Giles: Isotermas de adsorción en disolución (Giles et al. [33]).

Las isotermas se denominaron S, L, H y C y su clasificación se hizo en función a la forma inicial de su representación gráfica. Los subgrupos se nombraron del 1 al 5, de acuerdo al grado de recubrimiento superficial y a la forma del tramo final de las isotermas.

- Isotermas tipo S: se producen cuando la atracción soluto-adsorbente es moderada, por lo que la adsorción se ve favorecida al aumentar la concentración de soluto en la fase líquida, debido al efecto cooperativo [35].
- Isotermas tipo L: corresponden a la isoterma de Langmuir [36] y se presentan cuando existe una atracción fuerte entre las moléculas de soluto. Es por ello que en este caso, al aumentar la concentración de soluto en la disolución, la adsorción aumenta de forma más lenta a la vista en las isotermas de tipo S.

- Isotermas tipo H: estas isotermas son un caso especial de las de tipo L, en las que el soluto presenta una afinidad muy grande hacia la fase sólida. Por ello, en los primeros segundos de contacto, se produce una adsorción muy rápida.
- Isotermas tipo C: se produce un comportamiento intermedio entre las isotermas de tipo S y L.

Los subgrupos indican el grado en el que se ha producido la adsorción. En el Subgrupo 1 la saturación de la superficie no se ha completado, mientras que en el Subgrupo 2 si es completa. Para este subgrupo se observa una barrera energética, representada por la amplia meseta, que impide la adsorción en nuevos sitios. Sin embargo, en los Subgrupos 3 y 4, se presenta una segunda subida y una segunda meseta, que indican una nueva superficie de adsorción.

Para cada uno de estos comportamientos detectados durante el proceso de adsorción, se crearon modelos matemáticos que permitieron predecir las condiciones de equilibrio. En la adsorción en fase líquida, las isotermas más utilizadas son las siguientes:

Isoterma lineal. Está basada en la Ley de Henry y predice la capacidad de adsorción para bajas concentraciones de equilibrio:

$$q_e = K \cdot C_e \quad \text{Eq.(III.1)}$$

donde K es la constante de adsorción, q_e ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) es la cantidad de soluto adsorbido en el equilibrio por unidad de adsorbente y por último, C_e es la concentración del soluto en la fase líquida en el equilibrio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Isoterma de Langmuir: Esta isoterma fue formulada por Langmuir en 1918 [37] y se apoya en las siguientes suposiciones;

- a) La superficie del sólido es homogénea, por lo que la energía de adsorción es constante en todos los centros.
- b) La adsorción máxima corresponde a una monocapa saturada de moléculas de soluto sobre la superficie del adsorbente.
- c) No existe migración del adsorbato sobre la superficie del adsorbente.

La ecuación correspondiente es la siguiente:

$$q_e = \frac{q_0 \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad \text{Eq.(III.2)}$$

donde q_0 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) es la capacidad máxima de adsorción por unidad de masa de adsorbente y K_L ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$) es una constante de equilibrio que depende de la temperatura. Los parámetros q_0 y K_L se pueden obtener a partir de la ecuación linealizada de Langmuir [Eq.(III.3)] y de los datos experimentales obtenidos durante el proceso de adsorción en el equilibrio:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L \cdot q_0} + \frac{1}{q_0} \cdot C_e \quad \text{Eq.(III.3)}$$

Isoterma de Freundlich: Se desarrolló para los sistemas donde la superficie del adsorbente es heterogénea, dando lugar a la siguiente ecuación [38]:

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad \text{Eq.(III.4)}$$

que una vez linealizada queda de la siguiente manera:

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \cdot C_e \quad \text{Eq.(III.5)}$$

donde K_f ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})^{-1/n}$) indica la capacidad de adsorción y n está relacionado con la intensidad de la misma, de forma que cuando $n > 1$ las condiciones son apropiadas [39,40]. Ambos parámetros son coeficientes

empíricos característicos del sistema y se pueden obtener a partir de los datos experimentales y la ecuación Eq.(III.5).

Se han propuesto otros modelos de isothermas, como los de Langmuir-Freundlich, Temkim, Redlich–Peterson, Radke–Prausnitz y Toth, que no se van a utilizar en esta Tesis Doctoral y por lo tanto no se van a desarrollar. El motivo principal de esta decisión, es que los modelos de Langmuir y Freundlich son los más utilizados en la adsorción de materia orgánica y compuestos fenólicos en fase líquida, tanto si se utiliza como adsorbente carbón activo [28,41], como si se utilizan resinas poliméricas [42,43].

Cinética del proceso de adsorción

La velocidad a la cual se alcanza el equilibrio depende de varios factores. Tal y como se ha comentado al explicar los mecanismos de adsorción, las etapas que se suceden durante la misma son:

- 1ª Etapa. Transporte externo del soluto a través de la fase líquida, hasta alcanzar la interfase líquido-adsorbente.
- 2ª Etapa. Difusión del soluto a través del sistema de poros del adsorbente, hasta alcanzar las zonas de adsorción
- 3ª Etapa. Adsorción mediante la fijación de las moléculas a los sitios activos del adsorbente.

La etapa de adsorción es la más rápida, por lo que en sistemas bien agitados, donde la etapa de transporte externo no esté dificultada, es la difusión la etapa limitante del proceso.

Existen modelos empíricos ampliamente utilizados y modelos mucho más complejos que tienen una base física. Entre los primeros destacan los modelos de Pseudo-primero y Pseudo-segundo orden, el de Bangham, la ecuación de

Elovich y modelo de Chien-Clayton. Un caso especial dentro de los modelos empíricos es el de Difusión Intrapartícula, que conlleva la aplicación de mecanismos de adsorción [26].

Los modelos que se van a utilizar en este trabajo, son los de Pseudo-primer y Pseudo-segundo orden y el de Difusión Intrapartícula, por ser los que mejor describen los procesos de adsorción que se van a utilizar en este trabajo [44–46].

Modelo Pseudo-primer orden: Este modelo considera la adsorción como una reacción química de primer orden, donde la fuerza impulsora es la diferencia entre la concentración de soluto adsorbido en un tiempo determinado y la que tendría en el equilibrio. Esta relación viene expresada con la ecuación de Lagergren [24]:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 \cdot (q_e - q_t) \quad \text{Eq.(III.6)}$$

donde k_1 (min^{-1}) es la constante de velocidad de primer orden y q_t ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) es la cantidad de soluto adsorbido en un tiempo determinado.

Integrando la Eq.(III.6) para las condiciones límites $q_t = 0$ cuando $t = 0$ y $q_t = q_t$ cuando $t = t$, se obtiene la Eq.(III.7), que permite ajustar los datos experimentales.

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 \cdot t \quad \text{Eq.(III.7)}$$

Modelo Pseudo-segundo orden: En este caso la adsorción tiene la forma de una reacción química de segundo orden, donde la velocidad es proporcional al cuadrado de la diferencia de concentraciones entre un tiempo determinado y el equilibrio.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 \cdot (q_e - q_t)^2 \quad \text{Eq.(III.8)}$$

donde k_2 ($\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) es la constante de velocidad de segundo orden. Integrando esta ecuación, para las mismas condiciones límites que las utilizadas en el modelo de pseudo-primer orden, se obtiene la siguiente relación:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \quad \text{Eq.(III.9)}$$

Modelo de Difusión Intrapartícula: Fue desarrollado por Weber y Morris [47], teniendo en cuenta una única resistencia que se deriva de la segunda ley de Fick. En este modelo se aplican las siguientes suposiciones; la difusividad intrapartícula es constante y la cantidad de soluto retenida en el adsorbente es muy pequeña frente a la cantidad presente en la fase líquida.

$$q_t = k_{id} \cdot t^{1/2} + \theta \quad \text{Eq.(III.10)}$$

donde k_{id} ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1/2}$) es la constante de velocidad de difusión intraparticular y θ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) está relacionada con la capa límite.

La representación gráfica de los parámetros q_t frente al $t^{1/2}$ puede dar lugar a una recta, o a un sistema con varios tramos rectos. En el primer caso, si la recta pasa por el origen de coordenadas, se asume que el proceso de adsorción obedece al modelo de difusión intrapartícula. Las desviaciones que se produzcan con respecto al origen, puede ser interpretadas como diferencias entre la velocidad de transferencia de materia en las etapas iniciales y finales de la adsorción. En sistemas donde la representación gráfica presenta multilínealidad, cabe concluir que existen tantas etapas limitantes como tramos lineales presente el ajuste. Algunos autores asocian el primer tramo lineal con la resistencia ofrecida por la capa límite [48], o la debida al transporte a través de los macroporos [49].

Una vez estudiados los mecanismos, equilibrio y cinética de los procesos de adsorción, se debe tener en cuenta el tipo de material adsorbente a utilizar. Los adsorbentes más usados a nivel industrial son los carbones activos, aunque cabe

decir que existen infinidad de materiales con esta capacidad. Actualmente, se está estudiando la reconversión de materiales de desecho como materiales adsorbentes y aunque de momento no han tenido una implantación real en la industria, se están llevando a cabo investigaciones con huesos de las aceitunas [50], residuos de la industria maderera [51], lodos de las depuradoras de aguas residuales [52,53]... Otro tipo de materiales que se deben considerar son las resinas poliméricas, las cuales presentan una elevada selectividad en la adsorción de determinados contaminantes, como por ejemplo los compuestos fenólicos [54–56].

Los dos tipos de material adsorbente seleccionados en esta Tesis Doctoral han sido el carbón activo y las resinas poliméricas. A continuación se analizan las características particulares de cada uno de estos materiales y el tipo de interacción que presentan con los compuestos fenólicos.

III.1.2.1. Carbón Activo

La definición de carbón activo (CA), en el sentido más amplio, incluye todo aquel material carbonoso amorfo que presenta una elevada porosidad [23]. Sin embargo, los más adecuados en la adsorción son aquellos que presenten un alto contenido en carbono y una baja concentración de componentes inorgánicos. Los materiales más utilizados son madera, turba, lignito, carbón bituminoso, huesos de frutas...[57].

El CA presenta una superficie heterogénea, debido a las diferencias en el tamaño y forma de sus poros y a sus características químicas asociadas a sus grupos funcionales [58]. Ambos factores van a depender del tipo de material utilizado y de la activación llevada a cabo. Existen dos métodos de activación del carbón:

- Activación Física. El primer paso consiste en la pirolisis del material precursor mediante carbonización (500-800°C) en atmósfera inerte, eliminando de esta forma el carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y

azufre. Este proceso crea una estructura de poros que quedan rellenos de residuos alquitranados. El siguiente paso consiste en la activación del sólido con aire, CO₂ o vapor de agua, entre 800 y 1400°C, de forma que el gas oxida los residuos situados en la estructura del adsorbente, transformándolos en CO [23].

- Activación Química. En este procedimiento se realiza de forma simultánea la carbonización y la activación. El carbón se impregna con el agente activante y se somete a carbonización. Posteriormente se lava con agua y ácidos minerales, para eliminar el agente activante. Los agentes activantes más comunes son el ácido fosfórico (H₃PO₄) y el cloruro de cinc (ZnCl₂), aunque también se utilizan otros como H₂SO₄, KOH, K₂S y KMnO₄ [59].

Con estos procedimientos se obtienen carbones con una elevada superficie específica, donde el tipo de poros formado va a jugar un papel muy importante en la capacidad de adsorción. Los microporos (<2 nm) confieren una elevada superficie y capacidad de retención, mientras que los mesoporos (entre 2 y 50 nm) y macroporos (>50 nm) retienen moléculas de gran tamaño, como los colorantes y coloides. Además, favorecen la difusión de las moléculas hacia la superficie interna del adsorbente [23]. La activación física utilizando CO₂ consiguen estructuras microporosas, mientras que la activación con vapor de agua aumenta la cantidad de mesoporos. En el caso de la activación química, la utilización de H₃PO₄ como activante, fomenta la formación de macroporos [57]. Para la retención de compuestos fenólicos, las estructuras más adecuadas son aquellas formadas por sistemas micro-mesoporoso [60].

El tipo de activación también influye sobre la naturaleza química de la superficie del carbón, pudiéndose fomentar la creación de grupos superficiales de oxígeno (carboxilo, carbonilo, fenol, quinona, lactona... (Figura III.5)) con post-tratamientos [23,28].

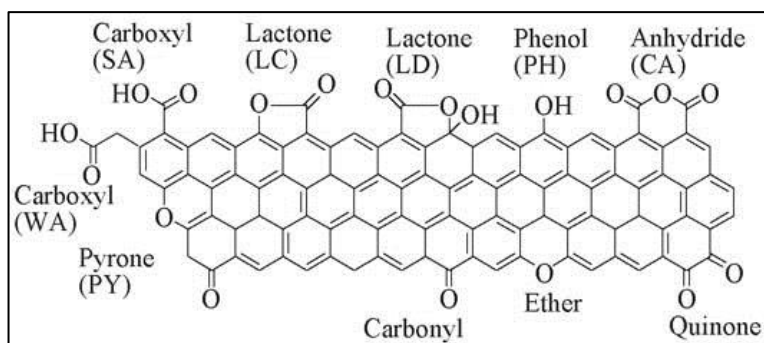


Figura III.5. Grupos superficiales presentes en el carbón activado (Na et al. [61]).

Tras la activación, quedan en la superficie átomos de carbono muy reactivos (sobre todo en la activación física), debido a que los grupos con enlaces tipo C-O y C-H se descomponen en CO_2 , CO y H_2O durante el proceso. Estos átomos de carbono tienen una tendencia muy fuerte a quimisorber oxígeno, de forma que se pueden oxidar fácilmente con aire, O_3 , NO_2 , CO_2 ... o con disoluciones de HNO_3 , NaClO , H_2O_2 ... La oxidación con gas aumenta la concentración de grupos hidroxilo y carbonilo, mientras que la oxidación con una fase líquida fomenta los ácidos carboxílicos. De acuerdo a las investigaciones de Coughlin and Ezra [62], los grupos carboxilo e hidroxilo inhiben la adsorción de los fenoles, debido a que estos grupos aumentan la afinidad del carbono hacia el agua que bloquea algunos microporos, impidiendo la adsorción de los fenoles. En cambio, los grupos quinona (o carbonilo) la favorecen mediante la formación de un electrón complejo donador-aceptor entre el anillo aromático y los grupos carbonilo de la superficie [63].

Otro factor muy importante a tener en cuenta durante la adsorción de los compuestos fenólicos es el pH de la fase líquida, que influirá en la ionización de los mismos. Para $\text{pH} > \text{pK}_a$, tanto los compuestos fenólicos como la superficie de carbón se encuentran cargados negativamente; los primeros forman fenolatos aniónicos y los grupos funcionales de la superficie de carbono se desprotonan. Ello genera una repulsión electrostática que disminuye la capacidad de

adsorción. Además, los fenolatos tienen una mayor solubilidad en el agua, lo que contribuye a dificultar aún más el proceso [28]. Para $\text{pH} < \text{pK}_a$, los compuestos fenólicos están en su forma molecular neutra y al aumentar la acidez del medio, se favorece la interacción donador-aceptor entre los electrones del anillo aromático y la superficie del carbón, aumentando la capacidad de adsorción [64–66]. El pK_a del tirosol e hidroxitirosol es 9.89 y 9.45 [67], respectivamente. Por lo tanto, si el objetivo es adsorber compuestos fenólicos, un pH ácido será el más apropiado.

Por último, cabe comentar que el CA se puede clasificar en función del tamaño y la forma de sus partículas. Aunque actualmente se han conformado nuevos formatos como pellets, fibras y telas de carbón o monolitos, los formatos más habituales son en polvo y el granular (Figura III.6).



Figura III.6. Formatos del carbón activo [68].

Según Bansal et al. [23], cuando el tamaño de partícula es superior a 100 μm se denomina carbón activo granular (GAC) y si es inferior se llama carbón activo en polvo (CAP). La superficie externa de los CAP es superior a la de los GAC, presentando por tanto mayores capacidades de adsorción. Además, ofrecen una menor resistencia a la difusión, por lo que la cinética de adsorción es más elevada.

Con todo lo expuesto, se llega a la conclusión que los carbones activos más indicados en la adsorción de materia orgánica (fenoles) en las FTOP, serán aquellos con una estructura micro-mesoporosa, con una activación que fomente la presencia de grupos carboxílicos y con un tamaño de partícula pequeño, para obtener una mayor cinética de adsorción. Por último cabría destacar que no sería necesario modificar el pH de las FTOP, ya que su carácter ácido de las mismas favorece la adsorción en este tipo de material.

III.1.2.2. Recuperación de compuestos fenólicos

Los adsorbentes poliméricos sintéticos incluyen copolímeros de poliestireno-divinilbenceno o divinilbenceno-etilvinilbenceno, el polimetacrilato y la vinilpiridina [69].

Staudinger [70] obtuvo en 1930 el primer copolímero de estireno-divinilbenceno por copolimerización térmica de monómeros. A partir de ese momento se llevaron a cabo numerosos estudios, que condujeron a una segunda generación de resinas de intercambio iónico y resinas neutras, en las que se mejoró notablemente la cinética de adsorción. Sin embargo, estos materiales seguían presentando un problema, ya que debido al alto grado de reticulación la adsorción quedaba limitada en la interfaz, por lo que la capacidad de adsorción era insuficiente. En 1970, Davankov y Tsyurupa [71], solucionaron estos problemas creando una red tridimensional con una parte homogénea, una rígida y una tercera expandida y abierta, dando lugar a una tercera generación de resinas denominadas “hypercrosslinked polystyrene”. Las marcas comerciales

más conocidas son Amberlite® (XAD-4, XAD16, XAD7...) y Purolite® (MN100, MN150, MN200, MN202 ...) [42,45,55,72,73]. La presentación de este tipo de materiales es en forma esférica (ejemplo Figura III.7).

Los materiales más utilizados en la adsorción de compuestos fenólicos se basan en adsorbentes de poliestireno reticulado con divinilbenceno (DVB). Aunque a este tipo de material se les conoce en la jerga científica como polímeros macroporosos, en realidad su estructura es principalmente mesoporosa. Cabe destacar la simplicidad que presenta su síntesis y la posibilidad de modificar su estructura física y la naturaleza química de su superficie [71].



Figura III.7. Resina MN200 de Purolite.

En la revisión llevada cabo por Lin y Juang en 2009 [74], se compararon los estudios realizados por diversos autores. En ellos se midió la capacidad de adsorción ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de diferentes compuestos fenólicos con veintiséis resinas sintéticas. La primera conclusión que se obtiene es que aunque no hay una resina específica que consiga un mejor resultado para todos los fenoles testeados, si se observa que las resinas de intercambio aniónico presentan mejores resultados. La segunda conclusión es que estos estudios fueron realizados con aguas modelo que contenían uno o dos fenoles, por lo que los resultados obtenidos no son extrapolables a aguas residuales reales. En el uso

práctico de adsorbentes poliméricos para la eliminación y/o recuperación de compuestos fenólicos en aguas residuales, se debe tener en cuenta la presencia sales inorgánicas, ya que estas pueden reducir la capacidad de adsorción de las resinas de intercambio aniónico de forma muy acusada. Kawabata y Ohira [75] estudiaron la influencia de la concentración de sal en varias resinas de tipo aniónico (Amberlite IRA-400 y la IR-45) y en otras sin grupos funcionales de intercambio iónico (Amberlite XAD-4 y XAD-2). Los resultados obtenidos confirmaron que las resinas aniónicas presentaron una mayor capacidad de adsorción en disoluciones sin sal; 405 y 272 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para la IRA-400 y la IR-45, frente a 150 y 89 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para la XAD-4 y XAD-2. Sin embargo, para disoluciones con una concentración de 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl la capacidad de adsorción de las resinas aniónicas disminuyó a 63 y 0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que para la XAD-4 se mantuvo en 155 y en la XAD-2 disminuyó un poco, hasta un valor de 58 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de seleccionar la resina más adecuada, es el pH de la disolución. Caetano et al. [42] estudiaron la adsorción de fenol a pH =11 y a pH =3, con una resina de intercambio aniónico fuerte (Dowex XZ), una de intercambio aniónico débil (AuRIX 100) y una sin grupos funcionales (MN200). Los resultados demostraron que las resinas aniónicas potenciaron su efecto de adsorción a pH alcalinos y la resina MN200 a pH ácidos. Por lo tanto, cabe pensar que las resinas sin grupos funcionales son las más adecuadas en la adsorción de compuestos fenólicos en las FTOP, ya que no se verán afectadas por la elevada salinidad del medio y además, no habrá necesidad de modificar el pH.

Existen numerosos trabajos de investigación que ponen de manifiesto los beneficios que aportan las aceitunas y sus derivados, como por ejemplo el aceite de oliva, en la salud [2,76,77]. Estos beneficios tienen su base en las propiedades antioxidantes que poseen los compuestos fenólicos que contienen estos frutos. El hidroxitirosol (HTY) es el principal fenol en las FTOP, representando porcentajes alrededor del 70% sobre el contenido fenólico total. El segundo en importancia es el tirosol (TY), aunque éste se encuentra en

concentraciones mucho más pequeñas [6,7,78]. Debido al poder antioxidante que presenta, cabe destacar el HTY por encima de cualquiera de los fenoles que se encuentran en las aceitunas, el cual incluso supera a otros antioxidantes naturales como la vitamina C, la vitamina E o el resveratrol [79]. Otras cualidades que presenta este polifenol, es la de inhibir la agregación plaquetaria y la de estabilizar las fibras de colágeno de las paredes arteriales.

Los antioxidantes naturales tienen aplicaciones contra especies reactivas implicadas en el envejecimiento celular, en procesos inflamatorios y en enfermedades coronarias y degenerativas [80,81]. Es por ello que presentan gran interés en la industria farmacéutica y cosmética. Otra de las aplicaciones destinadas a este tipo de sustancias, es en la industria alimentaria, donde se utilizan antioxidantes sintéticos y naturales para conservar los alimentos. Sin embargo, se ha demostrado que algunos de los compuestos sintéticos utilizados hasta el momento, pueden afectar al hígado, pulmones, mucosa gastrointestinal... por lo que la tendencia actual es a sustituir o minimizar el consumo de estos antioxidantes sintéticos frente a los naturales [82].

Debido a esta demanda de compuestos fenólicos de origen natural, la recuperación de los fenoles presentes en las FTOP puede suponer la revalorización de estos subproductos. Para ello, es necesario llevar a cabo un estudio que permita determinar las condiciones óptimas de trabajo, con las que se podría evaluar la viabilidad de la recuperación.

Los adsorbentes considerados van a ser el carbón activo y las resinas poliméricas. Aunque la eficacia de los CA en la eliminación de materia orgánica es de sobra conocida, también se sabe que algunos de estos compuestos se adsorben de forma irreversible sobre este tipo de adsorbentes [62][63]. Magne y Walker [83] indicaron que los fenoles se adsorben sobre el CA por medios físicos y químicos. Además, la fracción fisisorbida va pasando a quimisorbida a lo largo del tiempo, dando lugar a la polimerización de los compuestos fenólicos sobre la superficie del carbón, lo cual dificulta la recuperación de los fenoles. Otro inconveniente que presenta la regeneración de los CA, es que se

generan fracciones finas de carbón, debido a la naturaleza frágil de los mismos [84].

Es por ello que cuando la finalidad de la adsorción no es sólo la eliminación de la materia orgánica de la corriente líquida, sino que se busca la recuperación de compuestos con alto valor añadido, es conveniente utilizar otro tipo de material, como las resinas poliméricas. Las fuerzas de enlace entre el adsorbente y el adsorbato, en este tipo de materiales, son generalmente más débiles que las que existen con el CA. Además, la regeneración de las resinas pueda llevarse a cabo por medios sencillos y no destructivos, utilizando disolventes orgánicos que permiten la recuperación de soluto [11][42]. Otra de las ventajas es que la resistencia mecánica de estos materiales es muy superior a la del CA, por lo que tienen una vida útil más larga. Por el contrario cabe decir que la porosidad es más pequeña, por lo que tienen una menor capacidad de adsorción.

La recuperación de los compuestos fenólicos adsorbidos en resinas poliméricas no iónicas (XAD-4, XAD-16, MN200...), ha sido estudiado por diversos autores en los últimos años [42,56,85]. En estos trabajos se utilizaron disolventes orgánicos (metanol, etanol y acetona), para desorber los fenoles retenidos. Elena de Marco et al. [86] utilizaron la resina MN202 para adsorber los compuestos fenólicos contenidos en un agua residual generada en la producción del aceite de oliva. Posteriormente, llevaron a cabo la desorción con metanol, etanol y acetato de etilo, obteniendo muy buenos resultados de recuperación para los dos primeros disolventes (79 y 73%, respectivamente). Otro ejemplo es el aportado por Zagklis et al. [87], que usaron la resina XAD-4 en un agua residual de características similares a la anterior y agua triplemente destilada, etanol y acetona y la desorción. Con el etanol y la acetona se obtuvieron resultados muy similares (recuperaciones cercanas al 80%) y el agua no consiguió recuperaciones significativas.

III.2. TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO

III.2.1. Tratamiento biológico de aguas hipersalinas

La elevada conductividad de las FTOP viene dada por la concentración de NaCl que se encuentra en torno al 8% (aproximadamente $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl). Esta característica impide teóricamente el tratamiento biológico mediante consorcios microbianos convencionales ya que afectan al medio receptor de la siguiente forma:

- Dado que la densidad del agua con sal es más alta que la del agua dulce, se crea una mayor resistencia a la decantación. Además, la salinidad afecta significativamente a las propiedades físicas y bioquímicas de los lodos activados, modificando su hidrofobicidad, filtrabilidad y biofloculación [88], provocando una deficiente sedimentación del fango.
- Otra consecuencia es la plasmólisis y/o pérdida de la actividad de las células [89,90], que tiene como resultado una disminución de la eficiencia en la eliminación de la materia orgánica. La plasmólisis produce la deshidratación de la célula, debido al flujo de salida del agua a través de la pared celular, como consecuencia de la diferencia osmótica que hay a ambos lados de la misma. La respuesta de los microorganismos al choque osmótico va acompañada de un aumento en la liberación de los constituyentes celulares orgánicos; productos microbianos solubles (SMP) y sustancias poliméricas extracelulares solubles (EPS). Este efecto debido a la secreción de las células y la autólisis [91], causa un aumento de turbidez en el efluente.
- Por último cabe destacar que la hipersalinidad reduce la cantidad de bacterias filamentosas, las cuales juegan un papel fundamental en la integridad mecánica y en la estructura de los flóculos.

Varios autores aportan investigaciones en las que se ha conseguido adaptar la biomasa procedente de las estaciones depuradoras de agua residual urbana

(EDARU) a condiciones salinas superiores al 1-2%; Hamoda y Al-Attar [92] trabajaron con concentraciones salinas de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y Tokuz y Eckenfelder [93] llegaron hasta $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, estos valores siguen estando muy por debajo de los $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl de las FTOP. Para este tipo de aguas hipersalinas, la mayoría de los investigadores están de acuerdo en la necesidad de trabajar con cultivos específicos, que contengan microorganismos halotolerantes y halófilos [94–96] capaces de vivir en estas condiciones de extrema salinidad.

III.2.1.1. Microorganismos Halotolerantes y Halófilos

Se considera que un medio es hipersalino cuando su concentración en NaCl (u otra sal), es superior a la del agua de mar, que normalmente se suele estimar en $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La filogenética de los microorganismos capaces de crecer en estos medios se encuentran dentro de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya, aunque cabe destacar que la diversidad de los mismos disminuye al aumentar la concentración salina [97].

Las comunidades bacterianas en medios salinos naturales, tales como lagos hipersalinos y salinas, pueden incluir bacterias extremas y bacterias facultativas. Las bacterias extremas, llamadas halófilas, necesitan de condiciones de extrema salinidad para llevar a cabo su ciclo vital. En cambio las facultativas, que también se conocen como halotolerantes, pueden vivir en altas concentraciones salinas, aunque su crecimiento óptimo se produce en condiciones normales [98]. Otra diferencia significativa es el rango de tolerancia a la concentración salina; las comunidades halotolerantes normalmente quedan inactivas para concentraciones de NaCl por encima de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (salinidad del mar), mientras que las extremófilas pueden soportar concentraciones de hasta $300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [99].

Existen múltiples clasificaciones de los microorganismos halófilos llevadas a cabo por diferentes investigadores, la mayoría de ellas divide a estos microorganismos en función de la concentración salina del medio en el que

desarrollaban sus funciones metabólicas de forma óptima. La más utilizada en los textos científicos es la realizada por Larsen en 1962 [100], que cabe destacar que fue una de las primeras. Este investigador clasificó los halófilos en leves (2-5%), moderados (5-20%) y extremos (20-30%). Los microorganismos halófilos presentan dos estrategias metabólicas diferenciadas para conseguir anular las condiciones de estrés osmótico [101]:

a) Estrategia “salt-in”. El organismo mantiene un nivel de concentración de sal en su interior similar al exterior. La composición iónica del citoplasma de los microorganismos que utilizan esta estrategia, está compuesta principalmente por KCl y no por NaCl, que suele ser la sal predominante en los medios salinos.

b) Estrategia “compatible-solute”. El organismo mantiene bajas concentraciones internas de sal, gracias a la producción de sustancias orgánicas osmorreguladoras, como por ejemplo polioles (glicerol y arabinitol), azúcares (sacarosa, trehalosa...), aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias como la glicina betaína.

Debido a la gran diversidad de organismos vivos que existen, es conveniente tener una clasificación jerárquica de los mismos. A esta clasificación se la conoce como taxonomía. La categoría taxonómica más general es el dominio, que va seguido del reino, los filos, las clases, los órdenes, las familias, los géneros y las especies. En los ambientes hipersalinos se distinguen dos dominios de microorganismos halófilos; las Archaea y las Bacterias [102]. En 2012, Ventosa et al. [103] presentaron la taxonomía de estos dos dominios, recopilando la información publicada hasta el momento y siguiendo los estándares aceptados en la actualidad, los cuales se encuentran en el “Approved Lists of Bacterial Names” editado por Skerman et al. en 1980 [104].

Las Archaea halófilas

Crecen con facilidad en medios a concentraciones salinas del 20-25%. Debido a la presencia de C₅₀-carotenoides dan lugar a colonias de color rosa típico de las aguas rosadas de los lagos “Lac Retba” en Cabo Verde o el “Hillier” en Australia. En la Tabla III.2 se presenta la taxonomía de las Archaea, en las que se distinguen dos clases: las Archaea halófilas aerobias, que pertenecen a la clase *Halobacteria* y las Archaea halófilas metanogénicas, que son estrictamente anaerobias y pertenecen a la clase *Methanomicrobial*.

Tabla III.2. Taxonomía de las Archaea Halófilas (Skerman et al. [104]).

TAXON	GÉNERO
Filo Euryarchaeota	
Clase <i>Halobacteria</i>	<i>Halobacterium, Haladaptatus, Halalkalicoccus, Halarchaeum, Haloarcula, Halobaculum, Halobiforma, Halococcus, Haloferax, Halogeometricum, Halogranum, Halomicrobium, Halonotius, Halopelagius, Halopiger, Haloplanus, Haloquadratum, Halorhabdus, Halorubrum, Halorussus, Halosarcina, Halosimplex, Halostagnicola, Haloterrigena, Halovivax, Natrialba, Natrinema, Natronoarchaeum, Natronobacterium, Natronococcus, Natronolimnobius, Natronomonas, Natronorubrum, Salarchaeum</i>
Clase <i>Methanomicrobial</i>	<i>Methanohalobium, Methanocalculus, Methanohalophilus, Methanosalsum</i>

Las Bacterias halófilas

A diferencia de las Haloarchaea, las bacterias halófilas abarcan diferentes filos que comprenden bacterias halófilas leves, moderadas y extremófilas. La mayoría de ellas han sido aisladas de hábitats hipersalinos en lagos, salinas y suelos, así como en salazones alimentarios, cueros salados... Se trata de un grupo heterogéneo que abarca desde Gram-positiva a Gram-negativas, cocos, células en espiral... así como bacterias halófilas aerobias y anaerobias. Se clasifican en ocho filos, tal y como se observa en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Taxonomía de las Bacterias Halófilas (Skerman et al. [104]).

TAXON	GÉNERO
Filo Actinobacteria	
Clase <i>Actinobacteria</i>	<i>Actinopolyspora, Amycolatopsis, Georgania, Corynebacterium, Haloactinobacterium, Haloactinopolyspora, Haloechinothrix, Haloglycomyces, Nesterenkonia, Nocardioptis, Haloactinospora, Streptomonospora, Isoptericola, Prauserella, Saccharomonospora, Saccharopolyspora</i>
Filo Bacteroidetes	
Clase <i>Bacteroidia</i>	<i>Anaerophaga</i>
Clase <i>Flavobacteria</i>	<i>Gramella, Psychroflexus</i>
Clase <i>Sphingobacteria</i>	<i>Salinibacter, Salisaeta</i>

TAXON	GÉNERO
Filo Cyanobacteria	
Clase <i>Cyanobacteria</i>	<i>Rubidibacter, Prochlorococcus, Halospirulina</i>
Filo Firmicutes	
Clase <i>Bacilli</i>	<i>Alkalibacillus, Aquisalibacillus, Bacillus, Filobacillus, Gracilibacillus, Halalkalibacillus, Halolactibacillus, Halobacillus, Jeotgalibacillus, Lentibacillus, Oceanobacillus, Ornithinibacillus, Paraliobacillus, Piscibacillus, Pontibacillus, Salimicrobium, Salinibacillus, Salirhabdus, Salsuginibacillus, Sediminibacillus, Salinicoccus, Tenuibacillus, Thalassobacillus, Virgibacillus</i>
Clase <i>Clostridia</i>	<i>Acetohalobium, Halanaerobacter, Halanaerobium, Halobacteroides, Halocella, Halonatronum, Halothermothrix, Natranaerobius, Natrionella, Natronovirga, Orenia, Selenihalanaerobacter, Sporohalobacter</i>
Filo Spirochaetes	
Clase <i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaeta</i>
Filo Tenericutes	
Clase <i>Mollicutes</i>	<i>Haloplasma</i>
Filo Thermotogae	
Clase <i>Thermotogae</i>	<i>Petrotoga</i>

TAXON	GÉNERO
Filo Proteobacteria	
Clase α-Proteobacteria	<i>Antarctobacter, Citreimonas, Dichotomicrobium, Fodinicurvata, Hwanghaeicola, Hyphomonas, Jannaschia, Maribaculum, Maribius, Marispirillum, Marivita, Maricaulis, Methylococcus, Oceanibulbus, Oceanicola, Palleronia, Paracoccus, Ponticoccus, Rhodobium, Rhodothalassium, Rhodovibrio, Rhodovulum, Roseicitreum, Roseinatronobacter, Roseisalinus, Roseospira, Roseovarius, Salinihabitans, Salipiger, Sediminimonas, Shimia, Sulfitobacter, Tropicibacter, Woodsholea, Yangia</i>
Clase γ-Proteobacteria	<i>Aidingimonas, Alcanivorax, Alkalilimnicola, Alteromonas, Aestuariibacter, Aquisalimonas, Arhodomonas, Carnimonas, Chromohalobacter, Cobetia, Ectothiorhodospira, Ectothiorhodosinus, Glaciecola, Gilvimarinus, Haliea, Halochromatium, Halomonas, Halorhodospira, Halospina, Halothiobacillus, Idiomarina, Kushneria, Marichromatium, Marinobacter, Marinobacterium, Melitea, Methylohalomonas, Microbulbifer, Modicisalibacter, Nitrincola, Oleispira, Pseudidiomarina, Pseudoalteromonas, Psychromonas, Pseudomonas, Saccharospirillum, Salicola, Salinicola, Salinisphaera, Salinivibrio, Thioalkalibacter, Thioalkalivibrio, Thiohalobacter, Thiohalorhabdus, Thiohalocapsa, Thiohalomonas, Thiohalophilus, Thiohalospira, Thiomicrospira</i>
Clase β-Proteobacteria	<i>Desulfocella, Desulfohalobium, Desulfonatronospira, Desulfosalsimonas, Desulfovermiculus, Desulfovibrio, Desulfurivibrio</i>
Clase <i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Arcobacter, Sulfurimonas, Sulfurovum</i>

La mayor parte de las bacterias halófilas existentes se agrupan dentro de los filos de las Proteobacteria (clase α y clase γ), Firmicutes y Actinobacteria.

En la Tabla III.3 se ha querido destacar el género *Salinicola* dentro de las γ -Proteobacterias, por la relevancia que tendrán estos microorganismos en el tratamiento biológico llevado a cabo en esta tesis doctoral. La taxonomía completa para este género sería la siguiente: dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase γ -*Proteobacteria*, orden *Oceanospirillales*, familia *Halomonadaceae* y género *Salinicola*.

III.2.2. Biodegradación de compuestos fenólicos

Muchos de los estudios realizados para eliminar fenoles con microorganismos halófilos se han llevado a cabo con cepas aisladas y aguas sintéticas. Por citar algunos, se pueden destacar los trabajos de Woolard e Irvine [105], Peyton et al. [106] y Ramos et al. [107]. Aunque en estos estudios se consiguen muy buenos resultados de depuración, están limitados por su propia metodología de actuación, ya que las aguas residuales normalmente contienen diferentes tipos de compuestos fenólicos, junto con otras sustancias contaminantes, que dificultan enormemente el proceso.

En aguas reales es más interesante utilizar consorcios bacterianos en los sistemas de fangos activos, en lugar de cepas aisladas, ya que resultan más efectivos en el tratamiento de aguas residuales industriales que contienen diferentes sustancias contaminantes. Arulazhagan y Vasudevan [108] utilizaron un consorcio bacteriano moderadamente halófilo para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) presentes en las aguas residuales salinas contaminadas con petróleo, consiguiendo eliminar el 80% de los HAP de alto peso molecular y el 100% de los de bajo peso molecular. Lefebvre et al. [94] depuraron un agua residual de la industria de curtidos mediante bacterias halófilas, registrando porcentajes de eliminación de DQO de entre el 81% y el 95%, en función del tiempo de retención hidráulico aplicado. Otro ejemplo de

aplicación de consorcios bacterianos halófilos sería la depuración de aguas residuales textiles, que contienen tintes azoicos y un 20% de NaCl, llevada cabo por Asad et al. [109].

Por otro lado, en general se considera que las bacterias halófilas moderadas y más en concreto las *Proteobacterias*, son el grupo más versátil en la degradación de compuestos aromáticos [110]. Tal y como se ha visto en la Tabla III.3, este filo de las *Proteobacterias* está compuesto por cuatro diferentes clases de Gram-negativa bacterias, las cuales utilizan la estrategia “compatible-solute” para conseguir su tolerancia a los medios salinos [111]. De estas cuatro clases, la mayor parte de los artículos científicos que tratan la degradación de compuestos fenólicos en medios salinos, incluyen la clase γ -*Proteobacteria*, como por ejemplo los siguientes:

- Wang et al. [112] estudiaron la biodegradación del fenol como único sustrato de un sistema SBR, en concentraciones variables entre 400 y 1200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en una disolución con una 80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl. Estos autores utilizaron *Pseudomonas* (γ -*Proteobacteria*) y *Alcaligenes* (β -*Proteobacteria*), comprobando que las bacterias más efectivas fueron las *Pseudomonas*.
- Afzal et al. [113] también utilizaron *Pseudomonas* del género *aeruginosa* y *pseudomallei*, para un agua sintética preparada con 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol y diferentes sales (NaCl; 2.54 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl; 3.23 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2SO_4 ; 6.12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y K_2SO_4 ; 3.77 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La cepa de *P. aeruginosa* consiguió mejores resultados, degradando el fenol presente en 48 horas.
- Praveen et al. [114] llevaron a cabo la biodegradación con *Pseudomonas putida* de una disolución con una concentración creciente de NaCl (desde 0.1 a 0.7 M) y 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol. Observaron que concentraciones superiores a 0.1 M de NaCl afectaron al crecimiento de las bacterias y a partir de 0.6 M el crecimiento se detuvo.
- Dosta et al. [115] trataron aguas residuales hipersalinas con una conductividad de 160 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ y una concentración fenólica de 16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,

mediante un sistema MBR. En los ensayos realizados se identificaron como predominantes los géneros *Halomonas* y *Marinobacter*, ambos pertenecientes a las γ -*Proteobacteria*.

- Haddadi y Shavandi [95] utilizaron bacterias del género *Halomonas* (γ -*Proteobacteria*), consiguiendo degradar hasta $1100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol y p-cresol como única fuente de carbono, en un medio con un 7% de NaCl.

Para concentraciones salinas muy elevadas (por encima de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), las halófilas moderadas no son aptas para la degradación aerobia de los compuestos orgánicos. En estas condiciones, los grupos de procariotas aptos serían *Halobacteriaceae* (archaea) y *Salinibacter* (bacterias) [111].

III.2.3. Metabolismo celular y requerimiento de nutrientes

Los procesos bioquímicos que tienen lugar en las células se denominan metabolismo celular, e incluye el anabolismo y el catabolismo [116].

Los procesos bioquímicos que implican la descomposición de la materia orgánica e inorgánica compleja en estructuras más sencillas, se conocen como catabolismo. Estas moléculas complejas pueden provenir del entorno que rodea a las células o de sus depósitos de reserva. Las reacciones catabólicas son en su mayoría reacciones de oxidación y reducción, en las que intervienen enzimas del grupo de las deshidrogenasas que utilizan como coenzimas el NAD (nicotinamida-adenín-dinucleótido), NADP (nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato) y el FAD (flavín-adenín-dinucleótido). Los compuestos que se oxidan ceden átomos de hidrógeno a estas coenzimas, cuya forma reducida es NADH, NADPH y FADH₂. La oxidación de estas moléculas transportadoras de hidrógeno, libera más energía de la que se necesita para la siguiente reducción y este excedente se acumula en el adenosin trifosfato, conocido por sus siglas en inglés como ATP (adenosine triphosphate) y el adenosin difosfato o ADP

(adenosine diphosphate). Estos compuestos tienen la capacidad de almacenar la energía en forma de enlaces fosfato de alta energía.

El anabolismo o biosíntesis, es el proceso por el cual las células obtienen nutrientes del medio que las rodea y los convierten en constituyentes celulares. Se trata de un proceso constructivo, en el que a partir de moléculas sencillas se obtiene componentes más complejos. En este proceso, a partir de la biosíntesis de los carbohidratos se obtienen polisacáridos, con los ácidos grasos se consigue la formación de lípidos, los aminoácidos proporcionan proteínas y por último, los nucleótidos con base nitrogenada son los promotores de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Para llevar a cabo esta transformación se necesita la energía liberada por el ATP, generado durante el catabolismo.

En la Figura III.8 se puede observar un esquema representativo de la relación existente entre ambas funciones metabólicas.

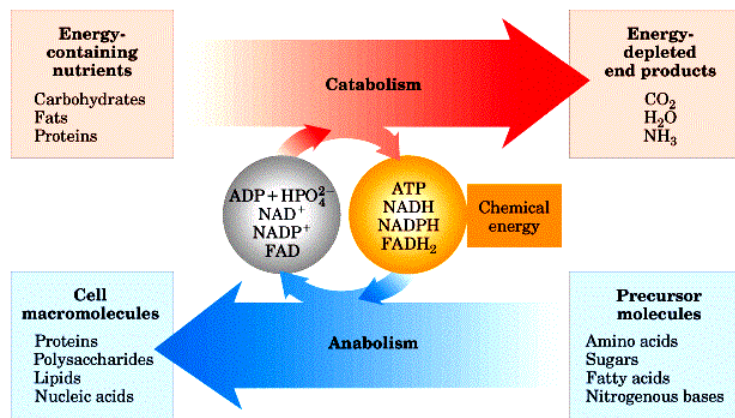


Figura III.8. Relación entre los procesos anabólicos y catabólicos [117].

Tal y como se ha explicado, las células requieren de una serie de nutrientes esenciales, que pueden ser utilizados para la creación de material celular nuevo

y como fuente de energía. Según la cantidad requerida, se pueden diferenciar entre macronutrientes y micronutrientes [118]. Los que tienen una mayor importancia para el desarrollo metabólico de las bacterias son los siguientes:

- **Agua:** Las bacterias necesitan del agua para crecer, la cual puede proceder del medio (fuente exógena) o de procesos de oxidación-reducción (fuente endógena).
- **Carbono:** El carbono es el compuesto más abundante en las estructuras de la materia viva y por ello es el que se requiere en mayor cantidad. El carbono necesario puede provenir de dos fuentes de energía diferentes; a) del dióxido de carbono, utilizado por los organismos autótrofos y b) de la materia orgánica, utilizada por los organismos heterótrofos, entre los que se encuentran la mayoría de los microorganismos.
- **Nitrógeno** El nitrógeno se metaboliza para formar las proteínas, los ácidos nucleicos y los polímeros de la pared celular. El nitrógeno se requiere en mayor cantidad ya que constituye entre el 12-15% del material celular. Las formas en las que se puede encontrar este elemento se pueden ver en la Figura III.9:

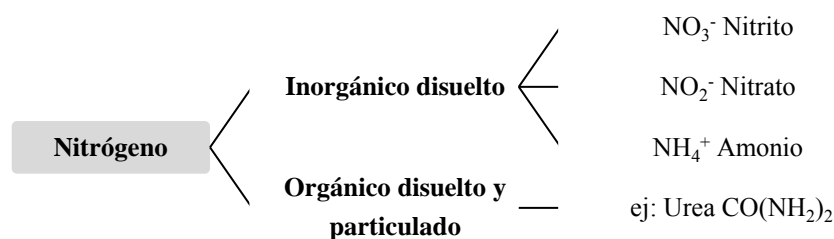


Figura III.9. Compuestos en los que se puede encontrar el nitrógeno.

Las bacterias prefieren consumir el nitrógeno en forma de amonio o nitrato, siendo más rápida la eliminación de la materia orgánica cuando la fuente de nitrógeno procede del amonio [119]. Para poder consumir el nitrógeno orgánico contenido en proteínas y aminoácidos, las bacterias tienen que hidrolizarlo para liberar el amonio. Si hay un déficit de nitrógeno, se produce el aumento de material celular sintetizado por unidad de materia orgánica eliminada, debido a la acumulación de polisacáridos [120]. Además, también puede conllevar una estimulación del crecimiento de filamentosas.

- **Fósforo:** El fósforo es esencial para la síntesis de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP. Las formas en las que se puede encontrar este elemento se presentan en la Figura III.10:

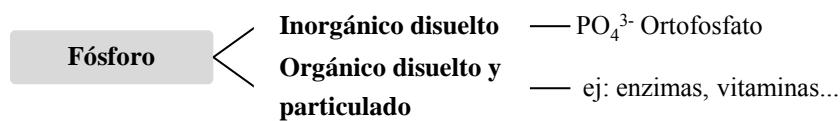


Figura III.10. Compuestos en los que se puede encontrar el fósforo.

El fósforo debe estar como ortofosfato para poder ser asimilado por la biomasa. Otras formas más complejas del fósforo inorgánico y orgánico, tienen que ser hidrolizados a fosfatos para ser consumidos.

- **Otros elementos:** Son también necesarios, aunque en menor cantidad, sales minerales que suministren aniones y cationes, como K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros

iones como hierro, cobre, molibdeno y zinc, denominados habitualmente “elementos traza”. Todos estos componentes suelen estar presentes en cantidades suficientes en el agua, por lo que no se suele controlar su concentración. En la preparación de aguas sintéticas, en las que se utiliza agua osmotizada o desionizada, sí es necesario añadir estos nutrientes.

En un sistema biológico de tratamiento de aguas, la fuente de carbono y nutrientes para las bacterias está en la propia agua residual. Las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo en el agua a tratar, deben mantenerse en una relación equilibrada que cubra las necesidades de las bacterias presentes en el lodo activo. Universalmente se ha aceptado que la biomasa se puede sintetizar en la fórmula química $C_5H_7NO_2$, donde un 12.4% es N. Además, se asume que las necesidades de P son una quinta parte de las del N [121]. Por otro lado, la relación mínima necesaria entre el carbono (asociado a la materia orgánica) y el nitrógeno y el fósforo, presentes en un agua residual, debe ser la siguiente [1][122]:

$$C:N:P \rightarrow 100:5:1$$

La mayoría de los textos científicos consultados asimilan directamente la cantidad de carbono con la demanda biológica de oxígeno (DBO), ya que atribuyen todo el carbono utilizado por las células a la materia biodegradable. Aceptando esta premisa, dan como válida la relación DBO:N:P en la proporción 100:5:1 [123,124]. También hay investigadores que establecen esta relación con la demanda química de oxígeno (DQO), es decir, DQO:N:P en la proporción 100:5:1 [125,126]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no toda la DQO presente en un agua residual es biodegradable y sólo sería “correcto” hacer esta aproximación, cuando se utilizan aguas sintéticas preparadas con sustancias muy biodegradables, como acetato de sodio, glucosa... En aguas residuales urbanas e industriales no es válido equiparar la DQO con la DBO, ya que estos

valores pueden ser muy diferentes: a) para aguas urbanas la DBO representa aproximadamente un 60% de la DQO, b) para aguas residuales industriales podemos encontrar desde efluentes muy biodegradables, como los generados en la industria de los zumos (con porcentajes de DBO alrededor del 80%), hasta muy poco biodegradables, como los procedentes de la industria metalúrgica (con apenas un 30%) [121].

La necesidad de utilizar la DQO en lugar de la DBO, sobre todo en aguas hipersalinas, viene generada principalmente por dos circunstancias:

- Para obtener la DBO se requiere un ensayo que tiene una duración de 5 días (DBO_5), frente a las 2-3 horas necesarias para tener la DQO.
- El protocolo de obtención de la DBO aplicable al agua potable y residual está bien definido por las normas internacionales [127], sin embargo, no es adecuado para efluentes hipersalinos.

Por ello, sobre todo en el tratamiento de aguas hipersalinas, en los trabajos de investigación utilizan la DQO como parámetro de control para determinar la eliminación de materia orgánica. Ello conlleva definir de forma clara la relación de esta variable con la cantidad de nutrientes. Tal y como ya se ha comentado en varias ocasiones, en la mayor parte de los textos científicos que llevan a cabo tratamientos biológicos de aguas hipersalinas utilizan aguas sintéticas, donde la única fuente de carbono es un compuesto fenólico y/o compuestos muy biodegradables. Moussavi et al. [128] utilizaron la proporción DQO:N:P en las proporciones de 150:5:1, para depurar un agua sintética con un contenido en fenol de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una salinidad del 8%. Dinçer y Kargi [129] utilizaron una cantidad de nitrógeno mayor, con una relación 100:10:1, para preparar un agua sintética con una concentración salina que varió entre un 0 % y un 10 %. Esta misma relación fue utilizada en trabajos similares realizados por el mismo grupo de investigadores [89,130].

Para poder establecer una relación directa entre la DQO y la concentración de nutrientes en un agua residual industrial como la FTOP, se ha tenido en cuenta la siguiente consideración en el desarrollo de esta tesis doctoral:

Para aguas residuales de origen urbano e industrial, la relación DBO_5/DQO suele estar entre 0,4 y 0,8, en función del grado de biodegradabilidad de la materia orgánica que contengan [1]. A partir de los datos de la Tabla II.3 y la Tabla II.4 del capítulo anterior, se obtiene un valor aproximado para esta relación de 0,4. Con ello se tendría que $DQO = 2,5 \cdot DBO$, y la relación quedaría de la siguiente forma:

$$DQO:N:P \rightarrow 250:5:1$$

Esta misma equivalencia fue utilizada por Gonçalves et al. [131] en el tratamiento biológico de una agua residual de origen textil, como la relación más equilibrada para el sistema.

III.2.4. Reactores Biológicos Secuenciales

Un último aspecto a considerar para llevar a cabo el tratamiento biológico de las FTOP es el tipo de reactor a utilizar. En la bibliografía consultada se ha observado que en la depuración de aguas residuales y aguas sintéticas, a escala piloto, con elevada salinidad y/o presencia de compuestos fenólicos, se utilizan diferentes tipos de reactores.

Reid et al. [91], Sharrer et al. [132], Huang et al. [133] y Remy et al. [134], utilizaron biorreactores de membranas (MBR; membrane bioreactor) para tratar aguas residuales y aguas sintéticas con elevada salinidad. Este tipo de reactor es

uno de los más utilizados en aguas hipersalinas, debido a que las membranas aseguran una mejor calidad del efluente. Con ellos se puede trabajar con una concentración de biomasa muy superior a la de cualquier otro reactor, lo que permite tratar cargas contaminantes superiores. Además, el sistema de membranas contribuye a reducir la DQO residual (recalcitrante) que quede tras el tratamiento biológico y asegura un efluente libre de turbidez. En principio estos sistemas solucionan la mayor parte de los problemas que se presentan en el tratamiento de aguas salinas, como son la desfloculación del fango activo y el aumento en la producción de SMP y EPS, que incrementan la turbidez. Sin embargo, los MBR tienen muchos problemas derivados del ensuciamiento de las membranas, que continúa siendo un problema sin resolver.

Otro tipo de reactor utilizado para el tratamiento de aguas salinas es el contactor biológico rotativo (RBC; rotating biodisc contactor), descrito en varios trabajos llevados a cabo por el equipo de investigación de Dinçer y Kargi [129,130].

Por último, se quieren destacar los reactores biológicos secuenciales, más conocidos por sus siglas en inglés como SBR (“sequencing batch reactor”). El SBR fue el elegido por Lefebvre et al. [135], Uygur y Kargi [136], Woolard e Irvin [105], Wang et al. [112], Chiavola et al. [125] y Moussavi et al. [128], entre muchos otros, para el tratamiento de aguas hipersalinas y/o con presencia de compuestos fenólicos. Todas estas investigaciones, junto a las ventajas que presentan estos sistemas de tratamiento, confieren a los SBR una particular idoneidad para llevar a cabo la depuración de las FTOP. Los procesos unitarios llevados a cabo en un SBR y en un sistema convencional de fangos activos son los mismos y según un informe realizado por la US EPA [137], la única diferencia es que en un SBR las operaciones se llevan a cabo en un sólo espacio físico. En la Figura III.11, se puede observar en la parte superior una representación esquemática del sistema convencional de fangos activos y en la parte inferior la correspondiente a un SBR.

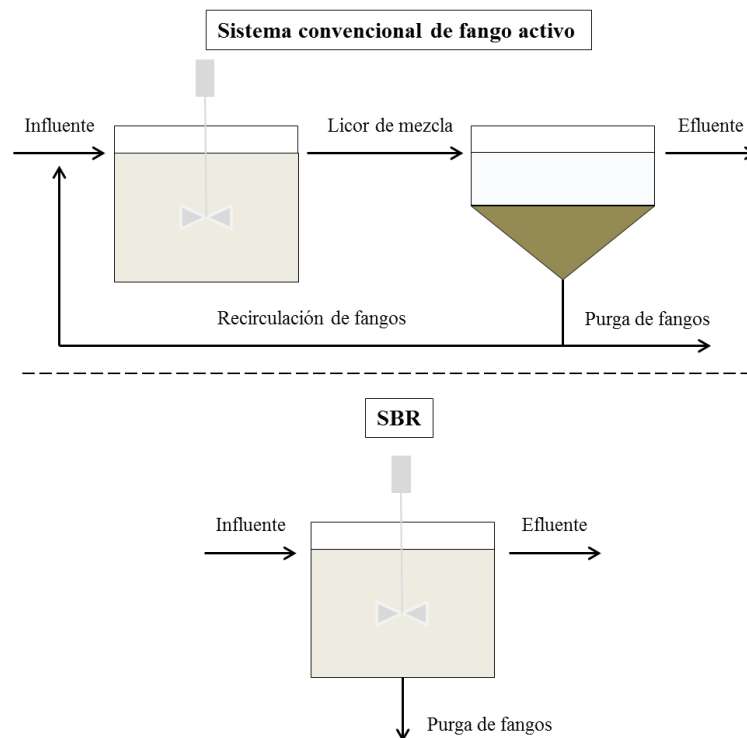


Figura III.11. Esquema de un sistema de fangos activos y de un SBR.

El sistema convencional funciona en continuo y está formado por dos unidades; el reactor biológico, donde se encuentra el fango activo y un decantador, donde se separa el agua depurada del fango. Parte de este fango retorna al reactor y la otra parte se purga para mantener la concentración dentro del reactor constante.

En los reactores SBR la depuración se lleva a cabo por cargas. En cada carga o ciclo, se realizan las siguientes etapas: llenado, reacción, sedimentación y vaciado [138]. También se suele incluir una etapa de espera antes de comenzar un nuevo ciclo. Todas estas etapas tienen lugar en una sola unidad, tal y como se muestra en la Figura III.12.

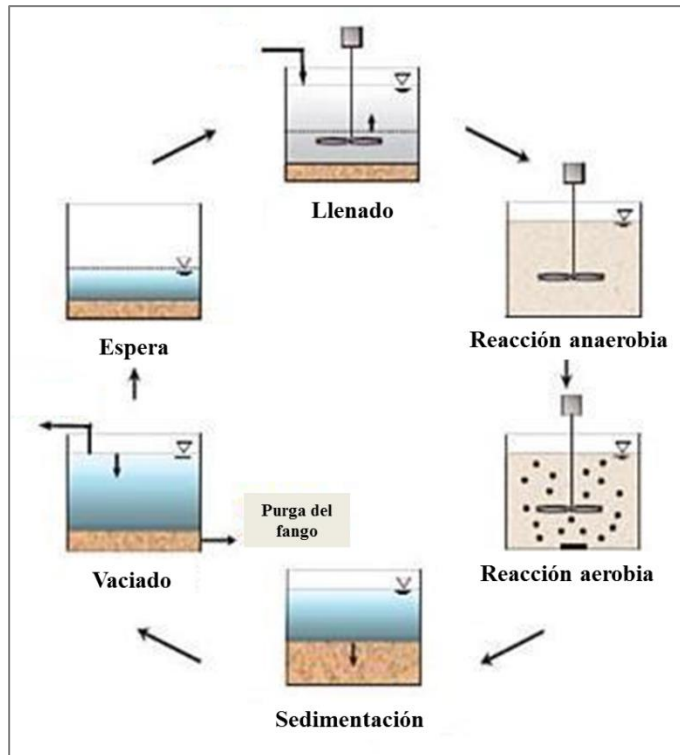


Figura III.12. Esquema representativo de un ciclo de funcionamiento de un SBR.

- **Etapas de llenado:** En esta operación se introduce el agua residual en el reactor. El llenado se puede realizar de varias formas;
 - Llenado estático. El influente se introduce en ausencia de agitación y aireación.
 - Llenado mixto. El influente se introduce con agitación y en ausencia de aireación. Esta es la forma habitual de alimentación en las plantas donde se requiere la eliminación de nutrientes, de esta forma los microorganismos pueden acceder fácilmente al sustrato en condiciones anóxicas.

- Llenado con reacción. El influente se introduce con los sistemas de agitación y aireación conectados, de forma que con el llenado comienza la etapa de reacción.
- **Etapa de reacción:** Esta operación puede darse en presencia o ausencia de oxígeno. Otro modo de operación sería alternar tiempos de reacción anóxico y aerobio. En cualquiera de los casos la etapa de reacción se produce con mezcla completa, para facilitar que los microorganismos tengan el sustrato a degradar a su alcance.
- **Etapa de sedimentación:** Durante esta operación se detiene la agitación y la aireación, para permitir la separación de las fases sólidas y líquidas. Los sólidos decantan y el agua tratada queda clarificada. En los SBR se obtiene una mejor separación, en comparación a los sistemas convencionales, ya que al ser un proceso estático la eficiencia en la decantación es superior.
- **Etapa de vaciado:** En esta operación se extrae el agua tratada.
- **Etapa de espera:** A escala industrial, esta etapa se suele utilizar para realizar las purgas de fango con el objetivo de mantener la concentración de biomasa en el nivel establecido.

Las ventajas que presentan estos sistemas de tratamiento de aguas residuales frente a los tratamientos convencionales, son las siguientes [138]:

- Ahorro de espacio, tal y como ya se ha comentado.
- Mayor flexibilidad de operación a la hora de realizar cualquier modificación del proceso.
- Debido a que la decantación es estática, hay una mayor eficiencia en la clarificación del agua tratada. Ello supone un potencial ahorro ya que hay sistemas que necesitan de tratamientos de filtración terciaria para alcanzar el nivel de turbidez correcto.

En cuanto a las desventajas:

- Se requiere un mayor nivel de sofisticación que en los sistemas convencionales; equipos de control, válvulas automatizadas...
- Mayores costes de mantenimiento, debido al mayor nivel de automatización.

III.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO CON FASES ANAEROBIAS Y AEROBIAS ALTERNAS

Los tratamientos biológicos aerobios tienen su eficacia demostrada en la eliminación de materia orgánica, tanto en aguas residuales urbanas como en industriales. Sin embargo, diversos autores [139,140] limitan su aplicación a aguas residuales con cargas contaminantes bajas, donde la DQO biodegradable no supere los $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para aguas residuales con contenidos mayores, estos investigadores recomiendan utilizar tratamientos anaerobios, que tienen un menor consumo de energía y una menor producción de lodos. Además, estos sistemas presentan la ventaja adicional de generar biogás durante la digestión anaerobia, lo que supone una potencial fuente de energía. Existen diversos trabajos, donde se utilizan sistemas SBR de forma efectiva, para el tratamiento anaerobio de aguas residuales procedentes de la industria textil, papelera, petroquímica y de curtidurías [141,142]. Sin embargo, a pesar de las ventajas citadas, el efluente de los sistemas biológicos anaerobios suele necesitar un tratamiento posterior, debido a la presencia de materia orgánica disuelta no degradada y a la presencia de sustancias nocivas como el ion amonio (NH_4^+) y sulfuro de hidrógeno (HS^-) [143].

Otra de las posibilidades contempladas para aguas residuales con una carga contaminante muy elevada, es la combinación de etapas anaerobias y aerobias

durante el tratamiento biológico. Cervantes et al. [116] y Frostell [144] destacaron en sus trabajos la efectividad de este tipo de procesos anaerobios-aerobios, para el tratamiento de aguas residuales industriales. Con esta metodología se suman las ventajas de los sistemas anaerobios, ya comentados, con las de los aerobios, que permiten aumentar la eficiencia global del tratamiento de eliminación de materia orgánica residual, mejorando la sedimentabilidad del fango activo. Este tipo de sistemas combinados se ha utilizado en la depuración de aguas contaminadas con tricloroetano [145], clorofenol [146], lixiviados de vertederos [147] o aguas procedentes de la industria textil [148], obteniendo resultados muy satisfactorios.

En la Figura III.13 se pueden observar los diferentes tipos de sistemas anaerobio-aerobio que podemos encontrar, según Chan et al. [140].

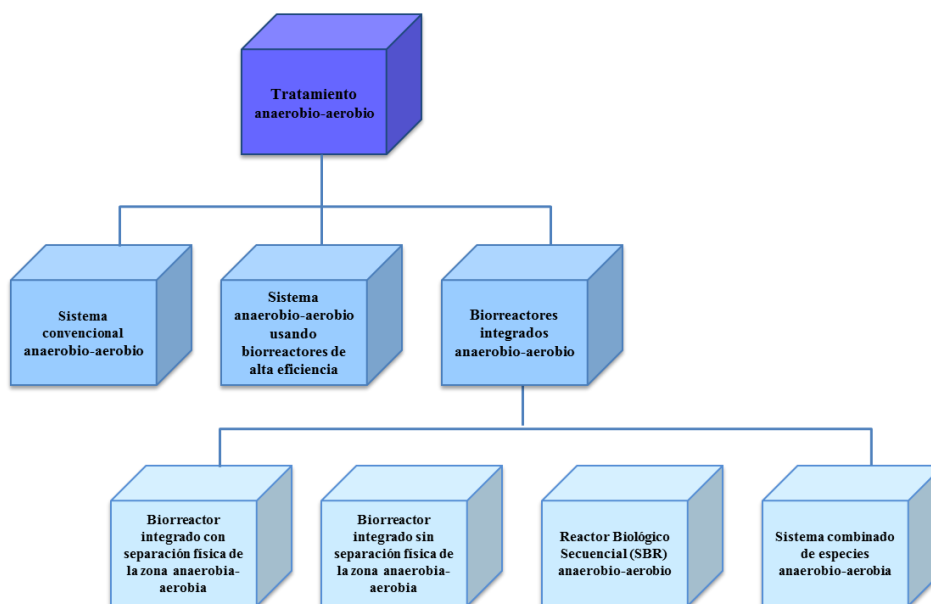


Figura III.13. Tipos de sistemas combinados anaerobio-aerobio.

De entre ellos se quiere destacar el tratamiento integrado con reactores SBR. Cabe destacar que para llevar a cabo de forma efectiva este tipo de tratamiento, con fases anaerobias-aerobias en un mismo reactor, es necesario contar con bacterias facultativas dentro del cultivo microbiano utilizado. Este tipo de bacterias, tal y como se ha comentado en la sección II.2.1.1, tienen la capacidad de llevar a cabo sus funciones metabólicas en condiciones anaerobias y en condiciones aerobias, aunque no siempre con la misma efectividad. Cabe destacar que hay variedades de procariotas halófilas y halotolerantes, que puede utilizar el nitrato como aceptor de electrones para la respiración en condiciones anaerobias. En concreto, muchos miembros del grupo de las halófilas moderadas de las *Halomonadaceae* (al que corresponde la *Salinicola*), son capaces de reducir el nitrato a nitrito y de llevar cabo la desnitrificación de nitrato a nitrógeno gaseoso [103].

Los SBR con fases anaerobia-aerobia se utilizan sobre todo en el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria textil, con el objetivo de aumentar la eliminación de color y DQO [149–151]. Pasukphun et al. [152] comprobaron que la eliminación de color y materia orgánica para dos ciclos anaerobio-aerobio de 17,5/2,5 horas y 14/6 horas, fue algo superior en el ciclo con un mayor tiempo anaerobio (eliminación de DQO del 90% frente al 87%). Kapdan and Oztekin [148] observaron el mismo comportamiento y lo asociaron con los efectos nocivos que los productos finales de la biodegradación anaerobia de los colorantes (aminas aromáticas tóxicas), tenían sobre los microorganismos aerobios. Sin embargo, Gonçaves et al. [131] obtuvieron mejores resultados con periodos aerobios más largos, con un 85% de la eliminación de DQO para un ciclo de 8/12 horas. En cualquiera de estos casos, la combinación dentro del ciclo de reacción de fases anaerobias y fases aerobias, redujo los costes de operación asociados. Según Vera et al. [153] estos costes se pueden reducir hasta en una tercera parte comparado con un tratamiento aerobio único.

III.4. TRATAMIENTOS TERCIARIOS

El objetivo final perseguido en este trabajo es la reutilización de las FTOP, bien como salmuera fresca para un nuevo ciclo de fermentación, o bien como líquido de gobierno para el envasado. Ello conlleva el cumplimiento de especificaciones que garanticen la inocuidad para los alimentos a los que afecte. La “Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa” adoptada por el Consejo Oleícola Internacional en la Resolución nº RES-2/91-IV/04, dice lo siguiente con respecto a las salmueras de acondicionamiento:

3. Factores esenciales de composición y calidad

3.1.2. Salmueras de acondicionamiento

La salmuera deberá estar limpia y exenta de materias extrañas no autorizadas y ajustarse a las normas de higiene definidas en el punto 6.

6. Higiene

6.1. Se recomienda que las aceitunas de mesa se preparen y manipulen de conformidad con las secciones pertinentes del Código Internacional de Prácticas Recomendado–Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997, enmendado en 1999), con el Código de Prácticas de Higiene para Alimentos poco Ácidos y Alimentos poco Acidificados Envasados (CAC/RCP 23-1979, Rev.2-1993) y con los demás documentos Codex pertinentes, como los códigos de prácticas de higiene y demás códigos de prácticas.

6.2. Los productos deberán ajustarse a todo criterio microbiológico establecido de conformidad con los Principios

para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos (CAC/GL 21-1997).

El contenido de los documentos mencionados (CAC/RCP 1-1969, CAC/RCP 23-1979 y CAC/GL 21-1997) con respecto al tema tratado, vienen a resumirse en las siguientes frases:

“No se deberá aceptar ninguna materia prima o ingrediente si se sabe que contiene parásitos, microorganismos indeseables, plaguicidas, medicamentos veterinarios, o sustancias tóxicas”

“Solamente se utilizarán materias primas o ingredientes sanos y adecuados”

Por otro lado, en el Real Decreto 1230/2001 del 8 de noviembre, por cual se aprueba la “Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de aceitunas de mesa”, se establecen los componentes que pueden ser utilizados en la preparación de las aceitunas de mesa, entre los que se nombra el agua y la sal. Aunque en ningún momento se especifica si se puede o no utilizar agua regenerada, si se dice que los componentes utilizados “deberán cumplir los requisitos que les exijan, en su caso, sus Reglamentaciones específicas”.

Con todo lo comentado y teniendo en cuenta que no se ha encontrado una tabla con las especificaciones que debe tener el agua a utilizar, se decide buscar la máxima depuración de las FTOP, para asegurar la calidad del producto final y la seguridad del consumidor. Por ello vamos a exigir que la salmuera regenerada cumpla con los siguientes requisitos; que no tenga color, que esté libre de sólidos suspendidos, patógenos y microorganismos y que tenga una concentración de DQO y de fenoles lo más baja posible.

Debido a la elevada carga contaminante inicial de las FTOP y a que parte de la misma no es biodegradable, es necesario contar con un tratamiento terciario, que proporcione la calidad necesaria al efluente final. Para ello se cuenta con diferentes técnicas ya comentadas en otros apartados, como la adsorción [154,155], el intercambio iónico [156], la oxidación química [157] o el tratamiento con membranas [158,159], entre otros. De entre ellos se seleccionaron el tratamiento con membranas.

III.4.1. Tratamiento con membranas

Las primeras membranas asimétricas de acetato de celulosa fueron desarrolladas por Loeb y Sourirajan en 1962 [160]. A partir de ese momento y tras mucho trabajo de investigación, se consiguió desarrollar una nueva generación de membranas, capaces de ofrecer prestaciones técnicas y económicas más altas. Esta evolución ha conseguido que en la actualidad, la tecnología de membranas gane terreno a los procesos de separación clásicos.

Las membranas son barreras físicas que permiten separar diferentes sustancias en dos corrientes; la que atraviesa la membrana se denomina permeado y la que no lo hace rechazo. Esta separación tiene lugar gracias a las características de las sustancias tratadas, como por ejemplo el tamaño de partícula y a las características de la membrana utilizada, como por ejemplo el tamaño de poro o el material del que estén hechas. Los procesos de membrana más utilizados en el tratamiento de aguas residuales, son los que utilizan la diferencia de presión a ambos lados de la membrana como fuerza impulsora [14,132,161], cuya clasificación se puede observar en la Figura III.14.

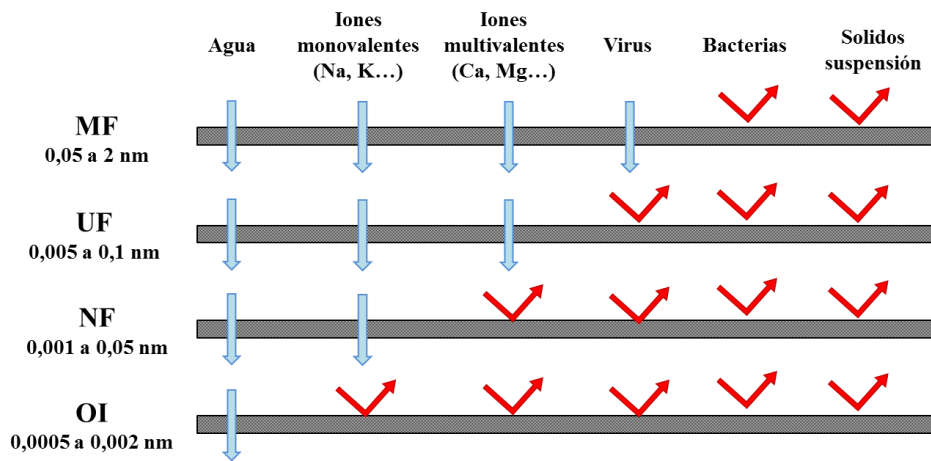


Figura III.14. Procesos de membranas basados en el gradiente de presión.

De entre ellos, la microfiltración (MF) y la ultrafiltración (UF) se utilizan principalmente como tratamientos secundarios para la eliminación de microorganismos, contaminantes orgánicos de alto peso molecular y macromoléculas. La nanofiltración (NF) y la ósmosis inversa (OI) se utilizan para reducir la concentración de microcontaminantes, de materia orgánica de bajo peso molecular y de compuestos inorgánicos disueltos [160].

Uno de los mayores problemas que plantea la utilización de membranas es el ensuciamiento de las mismas, especialmente en los procesos de separación líquido-líquido [162,163]. Debido a ello se presentan los siguientes problemas:

- A medida que la membrana se va ensuciendo durante el tratamiento, se debe incrementar la presión para mantener el flujo de permeado durante el proceso.
- Es necesario realizar paradas para llevar a cabo la limpieza de las membranas.

- La vida de las membranas se acorta debido al ensuciamiento irreversible, haciendo necesaria su sustitución.

Todos estos problemas repercuten directamente sobre los costes del proceso (energía, mano de obra...) y por lo tanto sobre la viabilidad económica del proceso.

La decisión de utilizar el tratamiento con membranas como terciario a un tratamiento biológico en lugar de como pretratamiento de las FTOP, asegura un menor ensuciamiento de las membranas. Tras el tratamiento biológico la materia orgánica se reduce de forma considerable, por lo que tanto el ensuciamiento general como el ensuciamiento irreversible deben ser menores, aumentando con ello la viabilidad económica del proceso. Con ello se minimiza el mayor problema asociado a este tipo de tecnología, aumentan con ello las ventajas que presentan las membranas frente a otros posibles tratamientos.

La forma habitual de trabajo es utilizar sistemas integrados de membranas, en los que según las necesidades se combinan las membranas de MF, UF, NF y OI. Como ejemplo se tiene el tratamiento de aguas residuales generadas durante la producción de aceite de oliva, donde se pueden encontrar diversas configuraciones: Garcia-Castello et al. [164] utilizaron la MF + NF, Cassano et al. [13] la UF + NF y Zagklis et al. [87] y Paraskeva et al. [165] usaron la UF + NF + OI.

Dadas las prestaciones de las membranas disponibles, el efluente a tratar y las necesidades perseguidas con este tratamiento terciario, las membranas más recomendables serían las de UF y NF, trabajando en serie. De esta forma, con la UF se consigue eliminar los compuestos de mayor tamaño, con una menor presión de trabajo, que podrían reducir la efectividad de las membranas de NF. Este sistema integrado asegura por un lado, la eliminación total de sólidos en suspensión y de color y la reducción de la DQO recalcitrante que pueda quedar tras el biológico y por otro, una mínima reducción de la concentración salina inicial. Además, el permeado queda libre de microorganismos y patógenos [166,167], consiguiendo de esta forma la desinfección del efluente.

En esta Tesis Doctoral no se va a profundizar más sobre los fundamentos teóricos de la tecnología de membranas, puesto que no es el objeto de estudio de la misma. Simplemente se aplicará como tratamiento terciario al efluente de salida del tratamiento biológico y se evaluarán los resultados obtenidos.

III.5. RESUMEN

Con esta introducción se ha mostrado la importancia económica que tiene el sector dedicado a la transformación de las aceitunas en España, destacando el de la producción de aceitunas de mesa.

Tras detallar los diferentes pasos del proceso productivo de las aceitunas de mesa al “*Estilo Español*” (cocido, lavado y fermentación), se han identificado y caracterizado las corrientes de agua residual que se generan en cada uno de ellos. También se han expuesto las actuaciones llevadas a cabo en el sector, con vistas a reducir al máximo el volumen de agua residual, centradas en:

- Reducir el consumo de agua durante el proceso. Un ejemplo sería la eliminación de uno de los lavados.
- La reutilización directa de efluentes. Las aguas de cocido se pueden reutilizar durante unas 15 etapas, sin embargo, no es posible hacer lo mismo con las aguas de lavado y fermentación, ya que afecta a la calidad del producto final.

Se han descrito los tratamientos que tradicionalmente se han realizado a este tipo de aguas, exponiendo los problemas que han generado. Debido a ello y a normativas ambientales más estrictas, ha surgido la necesidad de buscar tratamientos alternativos más eficaces y respetuosos con el medioambiente.

Se ha realizado un estado del arte sobre los tratamientos aplicados, en el que se constata que el número de investigaciones sobre las aguas residuales de la producción de aceitunas de mesa, es muy escaso. Por otro lado se llega a la conclusión de que, debido a las características de las corrientes generadas durante el proceso, una segregación y tratamiento por separado de estos efluentes podría mejorar la depuración global.

Con esto se justifica la investigación realizada en esta tesis doctoral, en la que se expone el tratamiento integral del agua residual procedente de la etapa de

fermentación y de envasado, dando solución a un problema no resuelto en la actualidad. En este tratamiento integral se contemplan los siguientes puntos:

- Los **pretratamientos** más adecuados, justificando su selección frente a otras posibles técnicas aplicables. Se han seleccionado tres tratamientos físico-químicos; la adsorción, con carbón activo y resinas poliméricas, el ajuste de pH y la adición de coagulantes y floculantes, ambos con posterior sedimentación. Con estos pretratamientos se pretende reducir la concentración de sólidos y de materia orgánica. En particular, se estudia la eliminación de compuestos fenólicos, que tienen un efecto inhibitorio sobre la biomasa del tratamiento biológico que debe llevarse a cabo posteriormente. En paralelo y debido a la demanda de compuestos fenólicos de origen natural que existe por parte de la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, se realiza un estudio completo sobre la recuperación de los fenoles contenidos en el agua residual tratada, persiguiendo la revalorización de este subproducto.
- **Tratamiento biológico.** Este tipo de tratamiento es el más utilizado en la depuración de aguas residuales, por su efectividad, sencillez, capacidad de trabajar con grandes volúmenes de agua residual y por resultar más rentable y respetuoso con el medio ambiente, que otras técnicas existentes. Es por ello que, a pesar de las dificultades que presenta el tratamiento biológico de aguas hipersalinas que contienen compuestos fenólicos, expuestas a lo largo de esta introducción, se decide abordar este reto. En esta introducción se ha establecida la necesidad de trabajar con cultivos que incluyan bacterias halófilas y las necesidades de nutrientes requeridas por la biomasa para poder acometer la depuración de las FTOP. Además, se ha planteado la posibilidad y ventajas que puede tener un tratamiento biológico con alternancia de etapas anaerobias y aerobias, frente a uno aerobio.
- Por último y teniendo en cuenta que las FTOP tienen un porcentaje de materia orgánica recalcitrante que no se puede eliminar por medios biológicos, se selecciona un **tratamiento terciario** que de la calidad final requerida a la salmuera regenerada. De entre las posibles técnicas se eligen

las membranas. En concreto se selecciona un proceso integrado en el que se utilizan membranas de UF y NF dispuestas en serie.

Este tratamiento integral debe cumplir con el objetivo marcado en esta tesis doctoral, el cual persigue la depuración de las FTOP con una mínima generación de residuos. La verificación de este planteamiento teórico se evaluará a partir de la experimentación y de los datos presentados en la sección de resultados, que quedan sintetizados en las conclusiones finales de este trabajo de investigación.

III.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Metcalf, Eddy, *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse.*, 4th ed., New York, 2002.
- [2] M.J. Garrido-Fernández, A. Fernández-Díez, M.R. Adams, *Table olives: production and processing*, Published by Chapman and Hall, London, 1997.
- [3] A. Garrido, P. García, M. Brenes, The recycling of table olive brine using ultrafiltration and activated carbon adsorption, *J. Food Eng.* 17 (1992) 291–305. doi:10.1016/0260-8774(92)90046-9.
- [4] M. Niaounakis, *Olive processing waste management: literature review and patent survey*, Second ed., 2006.
- [5] C. Romero-Barranco, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido Fernández, Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001) 237–246. doi:10.1016/S0260-8774(00)00204-1.
- [6] I. Fendri, M. Chamkha, M. Bouaziz, M. Labat, S. Sayadi, S. Abdelkafi, Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1–13. doi:10.1080/09593330.2012.689364.
- [7] M. Brenes, L. Rejano, P. Garcia, A. Sanchez, A. Garrido, Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2702–2706. doi:10.1021/jf00058a028.
- [8] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, T.S. Giannopoulos, G.A. Pilidis, Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 339–343. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.061.
- [9] M. Brenes Balbuena, P. Garcia-Garcia, A. Garrido-Fernandez, Regeneration of Spanish Style green table olive brines by ultrafiltration, *J. Food Sci.* 53 (1988) 1733–1766. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07829.x.
- [10] A. Rodríguez-Fernández-Alba, P. Letón-Gracia, R. Rosal-García, M. Dorado-Valiño, S. Villar-Fernández, J.M. Sanz-García, *Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales*, F.p.e.c.m.d. CEIM, Madrid, n.d.
- [11] G. Busca, S. Berardinelli, C. Resini, L. Arrighi, Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments, *J. Hazard. Mater.* 160 (2008) 265–288. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.045.
- [12] A. Zirehpour, M. Jahanshahi, A. Rahimpour, Unique membrane process integration for olive oil mill wastewater purification, *Sep. Purif. Technol.* 96 (2012) 124–131. doi:10.1016/j.seppur.2012.05.028.

- [13] A. Cassano, C. Conidi, L. Giorno, E. Drioli, Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques, *J. Hazard. Mater.* 248-249 (2013) 185–193. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.01.006.
- [14] A. El-Abbassi, H. Kiai, J. Raiti, A. Hafidi, Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment, *J. Clean. Prod.* 65 (2014) 432–438. doi:10.1016/j.jclepro.2013.08.016.
- [15] M.I. Aguilar, J. Sáenz, M. Lloréns, A. Soler, J.F. Ortuño, Tratamiento físico-químico de aguas residuales: coagulación-floculación, EDITUM, Murcia (Spain), 2002.
- [16] J. Lyklema, Water at interfaces: a colloid-chemical approach, in: *Plenary Invit. Lect.*, Elsevier, 1977: pp. 257–265. doi:10.1016/B978-0-12-404501-9.50027-4.
- [17] J. Gregory, Effect of dosing and mixing conditions on flocculation by polymers, in: *Adv. Meas. Control Colloid. Process.*, Elsevier, 1991: pp. 3–17. doi:10.1016/B978-0-7506-1106-0.50005-9.
- [18] V.K. La Mer, Coagulation symposium introduction, *J. Colloid Sci.* 19 (1964) 291–293. doi:10.1016/0095-8522(64)90030-3.
- [19] J. Walter, J. Weber, *Physicochemical processes for water quality control*, Wiley-Interscience, New York, 1972.
- [20] L. Gillberg, L. Eger, S.E. Jepsen, The effect of five coagulants on the concentrations and distribution of small particles in sewage water, in: H.H. Hahn, R. Klute (Eds.), *Chem. Water Wastewater Treat. Proc. 4th Gothenbg. Symp.*, Springer Science & Business Media, 1990: pp. 243–256.
- [21] C.S. Lee, J. Robinson, M.F. Chong, A review on application of flocculants in wastewater treatment, *Process Saf. Environ. Prot.* 92 (2014) 489–508. doi:10.1016/j.psep.2014.04.010.
- [22] J. Duan, J. Wang, N. Graham, F. Wilson, Coagulation of humic acid by aluminium sulphate in saline water conditions, *Desalination.* 150 (2002) 1–14. doi:10.1016/S0011-9164(02)00925-6.
- [23] R.C. Bansal, M. Goyal, *Activated carbon adsorption*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [24] S. Lagergren, About the theory of so called adsorption of solute substances., *Ksver Vetenskapsakad Handl.* 24 (1898) 1–6.
- [25] D.M. Ruthven, *Principles of adsorption and adsorption processes*, Canada, John Wiley and Sons, 1984.
- [26] D. Duong, *Adsorption analysis: equilibria and kinetics*, Imperial College Press, Singapore, 1998.
- [27] H. Marsh, F. Rodriguez-Reinosos, *Activated Carbon*, Elsevier Ltd, 2006.

- [28] A. Dąbrowski, P. Podkościelny, Z. Hubicki, M. Barczak, Adsorption of phenolic compounds by activated carbon - A critical review, *Chemosphere*. 58 (2005) 1049–1070. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.067.
- [29] J.P. Izquierdo, F. Cunill, J. Tejero, M. Iborra, C. Fité, *Cinética de las reacciones químicas*, Barcelona, 2004.
- [30] K. Waldrom, *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*, CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [31] S. Brunauer, L.S. Deming, W.E. Deming, E. Teller, On a theory of the van der Waals adsorption of gases, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 1723–1732. doi:10.1021/ja01864a025.
- [32] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, Reporting physical adsorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603–619.
- [33] C.H. Giles, D. Smith, A. Huitson, A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical, *J. Colloid Interface Sci.* 47 (1974) 755–765. doi:10.1016/0021-9797(74)90252-5.
- [34] C.H. Giles, A.P. D’Silva, I.A. Easton, A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm part. II. Experimental interpretation, *J. Colloid Interface Sci.* 47 (1974) 766–778. doi:10.1016/0021-9797(74)90253-7.
- [35] W. West, B.H. Carroll, D.H. Whitcomb, The Adsorption of Sensitizing Dyes in Photographic Emulsions, *J. Phys. Chem.* 56 (1952) 1054–1067. doi:10.1021/j150501a007.
- [36] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. doi:10.1021/ja02268a002.
- [37] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass silica, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361–1403. doi:10.1021/ja02242a004.
- [38] H. Freundlich, *New conception in colloidal chemistry, colloid and capillary chemistry*, Methuen, London, 1926.
- [39] G. McKay, H.S. Blair, J.R. Garner, Adsorption of dyes on chitin. I. equilibrium, *J. Appl. Polym. Sci.* 27 (2003) 3043–3057.
- [40] T.K. Saha, N.C. Boumik, S. Karmaker, M.G. Ahmed, H. Ichikawa, Y. Fukumori, Adsorption characteristics of reactive black 5 from aqueous solution onto chitosan, *Clean-Soil Air Water.* 39 (2011) 984–993.
- [41] G.G. Stavropoulos, P. Samaras, G.P. Sakellariopoulos, Effect of activated carbons modification on porosity, surface structure and phenol adsorption, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 414–421. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.005.

- [42] M. Caetano, C. Valderrama, A. Farran, J.L. Cortina, Phenol removal from aqueous solution by adsorption and ion exchange mechanisms onto polymeric resins, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 402–409. doi:10.1016/j.jcis.2009.06.062.
- [43] J. Yin, R. Chen, Y. Ji, C. Zhao, G. Zhao, H. Zhang, Adsorption of phenols by magnetic polysulfone microcapsules containing tributyl phosphate, *Chem. Eng. J.* 157 (2010) 466–474. doi:10.1016/j.cej.2009.12.008.
- [44] V. Fierro, V. Torné-Fernández, D. Montané, A. Celzard, Adsorption of phenol onto activated carbons having different textural and surface properties, *Microporous Mesoporous Mater.* 111 (2008) 276–284. doi:10.1016/j.micromeso.2007.08.002.
- [45] C. Valderrama, J.I. Barios, M. Caetano, A. Farran, J.L. Cortina, Kinetic evaluation of phenol/aniline mixtures adsorption from aqueous solutions onto activated carbon and hypercrosslinked polymeric resin (MN200), *React. Funct. Polym.* 70 (2010) 142–150. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2009.11.003.
- [46] C. Păcurariu, G. Mihoc, A. Popa, S.G. Muntean, R. Ianoș, Adsorption of phenol and p-chlorophenol from aqueous solutions on poly (styrene-co-divinylbenzene) functionalized materials, *Chem. Eng. J.* 222 (2013) 218–227. doi:10.1016/j.cej.2013.02.060.
- [47] W.J. Weber Jr., J.C. Morris, Kinetics of adsorption on carbon from solution, *J. Sanit. Eng. Div. ASCE* 89 (1963) 31–60.
- [48] S. Kumar, M. Zafar, J.K. Prajapati, S. Kumar, S. Kannepalli, Modeling studies on simultaneous adsorption of phenol and resorcinol onto granular activated carbon from simulated aqueous solution, *J. Hazard. Mater.* 185 (2011) 287–294. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.032.
- [49] M. Doğan, Y. Özdemir, M. Alkan, Adsorption kinetics and mechanism of cationic methyl violet and methylene blue dyes onto sepiolite, *Dye. Pigment.* 75 (2007) 701–713. doi:10.1016/j.dyepig.2006.07.023.
- [50] C. Michailof, G.G. Stavropoulos, C. Panayiotou, Enhanced adsorption of phenolic compounds, commonly encountered in olive mill wastewaters, on olive husk derived activated carbons, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 6400–6408. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.057.
- [51] P. Girods, a. Dufour, V. Fierro, Y. Rogaume, C. Rogaume, a. Zoulalian, et al., Activated carbons prepared from wood particleboard wastes: Characterisation and phenol adsorption capacities, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 491–501. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.11.047.
- [52] U. Thawornchaisit, K. Pakulanon, Application of dried sewage sludge as phenol biosorbent, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 140–144. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.004.
- [53] K.M. Smith, G.D. Fowler, S. Pullket, N.J.D. Graham, Sewage sludge-based

- adsorbents: A review of their production, properties and use in water treatment applications, *Water Res.* 43 (2009) 2569–2594. doi:10.1016/j.watres.2009.02.038.
- [54] J. Pletrzyk, J. Stodola, Characterization and applications of Amberlite XAD-4 in preparative liquid chromatography, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1822–1828. doi:10.1021/ac00235a025.
- [55] A. Li, Q. Zhang, J. Chen, Z. Fei, C. Long, W. Li, Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4, *React. Funct. Polym.* 49 (2001) 225–233. doi:10.1016/S1381-5148(01)00080-3.
- [56] I.Y. Ipek, N. Kabay, M. Yüksel, D. Yapici, Ü. Yüksel, Application of adsorption-ultrafiltration hybrid method for removal of phenol from water by hypercrosslinked polymer adsorbents, *Desalination*. 306 (2012) 24–28. doi:10.1016/j.desal.2012.08.033.
- [57] F. Rodríguez-Reinoso, M. Molina-Sabio, M.T. González, The use of steam and CO₂ as activating agents in the preparation of activated carbons, *Carbon N. Y.* 33 (1995) 15–23. doi:10.1016/0008-6223(94)00100-E.
- [58] K. László, P. Podkościelny, A. Dąbrowski, Heterogeneity of polymer-based active carbons in adsorption of aqueous solutions of phenol and 2,3,4-Trichlorophenol, *Langmuir*. 19 (2003) 5287–5294. doi:10.1021/la026761s.
- [59] T. Wigmans, Industrial aspects of production and use of activated carbons, *Carbon N. Y.* 27 (1989) 13–22. doi:10.1016/0008-6223(89)90152-8.
- [60] R. Reinoso, M. Sabio, El carbón activado en procesos de descontaminacion, *Dep. Química Inorgánica*. (2002) 163–168.
- [61] L. Na, Z. Jian, Z. Qing-Fang, Quantitative and qualitative analyses of oxygen-containing surface functional groups on activated carbon, *Chem. J. Chinese Univ.* 33 (2012) 548–554.
- [62] R.W. Coughlin, F.S. Ezra, Role of surface acidity in the adsorption of organic pollutants on the surface of carbon, *Environ. Sci. Technol.* 2 (1968) 291–297. doi:10.1021/es60016a002.
- [63] J.A. Mattson, H.B. Mark, M.D. Malbin, W.J. Weber, J.C. Crittenden, Surface chemistry of active carbon: Specific adsorption of phenols, *J. Colloid Interface Sci.* 31 (1969) 116–130. doi:10.1016/0021-9797(69)90089-7.
- [64] J.F. García-Araya, F.J. Beltrán, P. Álvarez, F.J. Masa, Activated carbon adsorption of some phenolic compounds present in agroindustrial wastewater, *Adsorption*. 9 (2003) 107–115. doi:10.1023/A:1024228708675.
- [65] K. Mohanty, M. Jha, B.C. Meikap, M.N. Biswas, Preparation and characterization of activated carbons from Terminalia Arjuna nut with zinc chloride activation for the removal of phenol from wastewater, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 4128–4138. doi:10.1021/ie050162.

- [66] D. Richard, M.D.L. Delgado Núñez, D. Schweich, Adsorption of complex phenolic compounds on active charcoal: Adsorption capacity and isotherms, *Chem. Eng. J.* 148 (2009) 1–7. doi:10.1016/j.cej.2009.12.044.
- [67] C.A.P. Câmara, J. Bortoloti, I.S. Scarminio, C.A. Ballus, A.D. Meinhart, H.T. Godoy, et al., Optimization of electrophoretic separations of thirteen phenolic compounds using single peak responses and an interactive computer technique, *J. Braz. Chem. Soc.* (2013). doi:10.5935/0103-5053.20130219.
- [68] Carbón activado. <http://carbact.blogspot.com.es/>. Last access; January, (2016).
- [69] M.L. Soto, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *J. Food Eng.* 105 (2011) 1–27. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010.
- [70] H. Staudinger, W. Heuer, Highly polymerized compounds. XXXIII. A relation between the viscosity and the molecular weight of polystyrenes, *Ber.* 63 (1930) 222–234.
- [71] V. Davankov, M.P. Tsyurupa, Hypercrosslinked polymeric networks and adsorbing materials: synthesis, properties, structure, and applications, *Comprehensive Analytical Chemistry Vol.56*, Elsevier, 2010.
- [72] Y. Ku, K.C. Lee, Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin, *J. Hazard. Mater. B80* (2000) 59–68. doi:10.1016/S0304-3894(00)00275-2.
- [73] K.B. Petrotos, P.E. Gkoutosidis, M.I. Kokkora, K.G. Giankidou, A.G. Tsagkarelis, A study on the kinetics of olive mill wastewater (OMWW) polyphenols adsorption on the commercial XAD4 macroporous resin, *Desalin. Water Treat.* 51 (2013) 2021–2029. doi:10.1080/19443994.2013.734479.
- [74] S.H. Lin, R.S. Juang, Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review, *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 1336–1349. doi:10.1016/j.jenvman.2008.09.003.
- [75] N. Kawabata, K. Ohira, Removal and recovery of organic pollutants from aquatic environment . Vinylpyridine-divinylbenzene copolymer as a polymeric adsorbent for removal and recovery of phenol from aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1979) 1396–1402.
- [76] K.L. Tuck, P.J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 636–644. doi:10.1016/S0955-2863(02)00229-2.
- [77] S. Işık, A. Karagöz, Ş. Karaman, C. Nergiz, Proliferative and apoptotic effects of olive extracts on cell lines and healthy human cells, *Food Chem.* 134 (2012) 29–36. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.020.
- [78] M. Araújo, F. Pimentel, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.* 45 (2015) 200–211.

- doi:10.1016/j.tifs.2015.06.010.
- [79] P. Miralles, A. Chisvert, A. Salvador, Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 157–161. doi:10.1016/j.jpba.2014.09.016.
- [80] R.M. Odeh, L.A. Cornish, Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis., *Pharmacotherapy.* 15 (1995) 648–659.
- [81] E.H. Seifried, D.E. Anderson, E.I. Fisher, J.A. Milner, A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species., *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 567–579.
- [82] R. Maestro Durán, R. Borja Padilla, Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, *Grasas Y Aceites.* 44 (1993) 101–106. doi:10.3989/gya.1993.v44.i2.1105.
- [83] P. Magne, P.L. Walker, Phenol adsorption on activated carbons: Application to the regeneration of activated carbons polluted with phenol, *Carbon N. Y.* 24 (1986) 101–107. doi:10.1016/0008-6223(86)90102-8.
- [84] M. Streat, L.A. Sweetland, Physical and adsorptive properties of Hypersol-Macronet™ polymers, *Langmuir.* 5148 (1997). doi:10.1016/S1381-5148(97)00049-7.
- [85] F. Ferri, L. Bertin, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava, Recovery of low molecular weight phenols through solid-phase extraction, *Chem. Eng. J.* 166 (2011) 994–1001. doi:10.1016/j.cej.2010.11.090.
- [86] E. De Marco, M. Savarese, C. Parisini, S. Falco, A. Paduano, R. Sacchi, Phenolic ingredients from olive oil mill wastewater, *Ingredienti Aliment. IX* (2010) 16–22.
- [87] D.P. Zagklis, A.I. Vavouraki, M.E. Kornaros, C.A. Paraskeva, Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption, *J. Hazard. Mater.* 285 (2015) 69–76. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.11.038.
- [88] B. Dalmacija, E. Karlovic, Z. Tamas, D. Miskovic, Purification of high-salinity wastewater by activated sludge process, *Water Res.* 30 (1996) 295–298. doi:10.1016/0043-1354(95)00170-0.
- [89] F. Kargi, A.R. Dincer, Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation Fikret, *Enzyme Microb. Technol.* 19 (1996) 529–537. doi:10.1016/S0141-0229(96)00070-1.
- [90] N.. Dan, C. Visvanathan, B. Basu, Comparative evaluation of yeast and bacterial treatment of high salinity wastewater based on biokinetic coefficients, *Bioresour. Technol.* 87 (2003) 51–56. doi:10.1016/S0960-8524(02)00204-3.

- [91] E. Reid, X. Liu, S.J. Judd, Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006) 164–171. doi:10.1016/j.memsci.2006.06.021.
- [92] M. Hamoda, I. Alattar, Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment, *Water Sci. Technol.* 31 (1995) 61–72. doi:10.1016/0273-1223(95)00407-E.
- [93] R. Yucel Tokuz, W. Wesley Eckenfelder, The effect of inorganic salts on the activated sludge process performance, *Water Res.* 13 (1979) 99–104. doi:10.1016/0043-1354(79)90260-4.
- [94] O. Lefebvre, N. Vasudevan, M. Torrijos, K. Thanasekaran, R. Moletta, Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor, *Water Res.* 39 (2005) 1471–1480. doi:10.1016/j.watres.2004.12.038.
- [95] A. Haddadi, M. Shavandi, Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas* sp. strain PH2-2 isolated from saline soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013) 29–34. doi:10.1016/j.ibiod.2013.06.005.
- [96] E. Abdollahzadeh Sharghi, B. Bonakdarpour, M. Pakzadeh, Treatment of hypersaline produced water employing a moderately halophilic bacterial consortium in a membrane bioreactor: Effect of salt concentration on organic removal performance, mixed liquor characteristics and membrane fouling, *Bioresour. Technol.* 164 (2014) 203–213. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.099.
- [97] A. Oren, Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2002) 56–63. doi:10.1038/sj/jim/7000176.
- [98] H.H. Zahran, Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments, *Biol. Fertil. Soils.* 25 (1997) 211–223. doi:10.1007/s003740050306.
- [99] E.J. McAdam, S.J. Judd, Biological treatment of ion-exchange brine regenerant for re-use: A review, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 264–272. doi:10.1016/j.seppur.2008.01.007.
- [100] H. Larsen, Halophilism. In *The Bacteria*, Academic Press, New York, 1962.
- [101] H.G. Trüper, E.A. Galinski, Concentrated brines as habitats for microorganisms, *Experientia.* 42 (1986) 1182–1187.
- [102] X. Zhuang, Z. Han, Z. Bai, G. Zhuang, H. Shim, Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1119–1126. doi:10.1016/j.envpol.2010.01.007.
- [103] A. Ventosa, M.C. Márquez, C. Sánchez-Porro, R. Haba, *Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2012. doi:10.1007/978-94-007-5539-0.

- [104] V. Skerman, V. McGowan, P. Sneath, First draft approved lists of bacterial names, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 (1980) 225–420. doi:10.1099/00207713-26-4-563.
- [105] C.R. Woolard, R.L. Irvine, Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor, *Water Res.* 29 (1995) 1159–1168.
- [106] B.M. Peyton, T. Wilson, D.R. Yonge, Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions, *Water Res.* 36 (2002) 4811–4820. doi:10.1016/S0043-1354(02)00200-2.
- [107] A.F. Ramos, M.A. Gómez, E. Hontoria, J. González-López, Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor, *J. Hazard. Mater.* 142 (2007) 175–183. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.08.079.
- [108] P. Arulazhagan, N. Vasudevan, Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 256–262. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.09.017.
- [109] S. Asad, M. a. Amoozegar, a. a. Pourbabaee, M.N. Sarbolouki, S.M.M. Dastgheib, Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2082–2088. doi:10.1016/j.biortech.2006.08.020.
- [110] M.T. Garcia, E. Mellado, J.C. Ostos, A. Ventosa, *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 1723–1728. doi:10.1099/ijs.0.63114-0.
- [111] K. Horikoshi, Extremophiles: Halophiles, in: *Extrem. Handb.*, 2011: pp. 255–383.
- [112] Y.-F. Wang, X.-L. Wang, H. Li, K.-F. Lin, P. Wang, J. Yang, et al., Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 93 (2014) 138–144. doi:10.1016/j.ibiod.2014.04.010.
- [113] M. Afzal, S. Iqbal, S. Rauf, Z.M. Khalid, Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*, *J. Hazard. Mater.* 149 (2007) 60–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.046.
- [114] P. Praveen, D.T.T. Nguyen, K.-C. Loh, Biodegradation of phenol from saline wastewater using forward osmotic hollow fiber membrane bioreactor coupled chemostat, *Biochem. Eng. J.* 94 (2015) 125–133. doi:10.1016/j.bej.2014.11.014.
- [115] J. Dosta, J.M. Nieto, J. Vila, M. Grifoll, J. Mata-Álvarez, Phenol removal from hypersaline wastewaters in a Membrane Biological Reactor (MBR): Operation and microbiological characterisation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 4013–4020. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.123.

- [116] F.J. Cervantes, S.G. Pavlostathis, A.C. Van Haandel, *Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters*, IWA Publishing, London, 2006.
- [117] Metabolismo y Catabolismo. <http://cienciasenelcalvin.blogspot.com.es/2014/03/metabolismo-catabolismo.html>. Last access; February, (2016).
- [118] G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case, *Microbial Growth*, in: *Microbiol. An Introd.*, 12th ed., Benjamin Cummings, 2015: pp. 63–77.
- [119] P. Pitter, J. Chudoba, *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*, CRC Press, Boca Raton, 1990.
- [120] W.W. Eckenfelder, J.L. Musterman, *Activated sludge treatment of industrial wastewater*, Technomic Publishing Company, Pennsylvania (USA), 1995.
- [121] R.L. Droste, *Theory and practice of water and wastewater treatment*, John Wiley and Sons, 1997.
- [122] C.F. Forster, *Wastewater Treatment and Technology*, Thomas Telford, London, 2003.
- [123] A.H. Slade, G.J.S. Thorn, M.A. Dennis, The relationship between BOD:N ratio and wastewater treatability in a nitrogen-fixing wastewater treatment system, *Water Sci. Technol.* 63 (2011) 627. doi:10.2166/wst.2011.215.
- [124] M.D. LaGrega, P.L. Buckingham, J.C. Evans, *Hazardous Waste Management*, 2nd ed., Waveland Press, 2010.
- [125] A. Chiavola, G. Farabegoli, F. Antonetti, Biological treatment of olive mill wastewater in a sequencing batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 85 (2014) 71–78. doi:10.1016/j.bej.2014.02.004.
- [126] H. Ivnitsky, I. Katz, D. Minz, G. Volvovic, E. Shimoni, E. Kesselman, et al., Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment, *Water Res.* 41 (2007) 3924–3935. doi:10.1016/j.watres.2007.05.021.
- [127] European Standard EN 1899-2-March 1998, Determination of biochemical demand after n days. Part 2: method for undiluted sample (ISO 5815:1989, modified), (n.d.).
- [128] G. Moussavi, B. Barikbin, M. Mahmoudi, The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR, *Chem. Eng. J.* 158 (2010) 498–504. doi:10.1016/j.cej.2010.01.038.
- [129] A.R. Dinçer, F. Kargi, Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater, *Process Biochem.* 36 (2001) 901–906. doi:10.1016/S0032-9592(00)00287-9.
- [130] F. Kargi, A.R. Dinçer, Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contactor, *Enzyme*

- Microb. Technol. 22 (1998) 427–433. doi:10.1016/S0141-0229(97)00215-9.
- [131] I.C. Gonçalves, S. Penha, M. Matos, A.R. Santos, F. Franco, H.M. Pinheiro, Evaluation of an integrated anaerobic/aerobic SBR system for the treatment of wool dyeing effluents: Purification of wool dyeing effluent in a SBR, Biodegradation. 16 (2005) 81–89. doi:10.1007/s10531-004-0431-7.
- [132] M.J. Sharrer, Y. Tal, D. Ferrier, J.A. Hankins, S.T. Summerfelt, Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system, Aquac. Eng. 36 (2007) 159–176. doi:10.1016/j.aquaeng.2006.10.003.
- [133] Z. Huang, Y. Qie, Z. Wang, Y. Zhang, W. Zhou, Application of deep-sea psychrotolerant bacteria in wastewater treatment by aerobic dynamic membrane bioreactors at low temperature, J. Memb. Sci. 475 (2015) 47–56. doi:10.1016/j.memsci.2014.09.038.
- [134] M. Remy, H. Temmink, P. van den Brink, W. Rulkens, Low powdered activated carbon concentrations to improve MBR sludge filterability at high salinity and low temperature, Desalination. 276 (2011) 403–407. doi:10.1016/j.desal.2011.03.080.
- [135] O. Lefebvre, R. Moletta, Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review, Water Res. 40 (2006) 3671–3682. doi:10.1016/j.watres.2006.08.027.
- [136] A. Uygur, F. Kargi, Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor, Enzyme Microb. Technol. 34 (2004) 313–318. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.11.010.
- [137] US EPA, Sequencing batch reactors, wastewater technology fact sheet, EPA 832-F-99-073, US, Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 1999.
- [138] L.K. Wang, N.K. Shamma, Y.-T. Hung, Advanced biological treatment processes, Humana Press, Totowa, NJ, 2009. doi:10.1007/978-1-60327-170-7.
- [139] G.G. Aggelis, H.N. Gavala, G. Lyberatos, Combined and separate aerobic and anaerobic biotreatment of green olive debittering wastewater, J. Agric. Eng. Res. 80 (2001) 283–292. doi:10.1006/jaer.2001.0732.
- [140] Y.J. Chan, M.F. Chong, C.L. Law, D.G. Hassell, A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater, Chem. Eng. J. 155 (2009) 1–18. doi:10.1016/j.cej.2009.06.041.
- [141] S.V. Mohan, N.C. Rao, K.K. Prasad, B.T.V. Madhavi, P.N. Sharma, Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration, Process Biochem. 40 (2005) 1501–1508. doi:10.1016/j.procbio.2003.02.001.
- [142] S. Suresh, R.K. Tripathi, M.N. Gernal Rana, Review on treatment of industrial

- wastewater using sequential batch reactor, *Int. J. Sci. Technol. Manag.* 2 (2011) 64–84.
- [143] J.J. Heijnen, A. Mulder, R. Weltevrede, J. Hols, H. Vanleeuwen, Large-scale anaerobic–aerobic treatment of complex industrial-waste water using biofilm reactors, *Water Sci. Technol.* 23 (1991) 1427–1436.
- [144] B. Frostell, Anaerobic-aerobic biological treatment of starch industry wastewaters, *Starch - Stärke.* 35 (1983) 185–189. doi:10.1002/star.19830350602.
- [145] B. Tartakovsky, M.-F. Manuel, S.R. Guiot, Degradation of trichloroethylene in a coupled anaerobic–aerobic bioreactor: Modeling and experiment, *Biochem. Eng. J.* 26 (2005) 72–81. doi:10.1016/j.bej.2005.06.007.
- [146] P. Majumder, S. Gupta, Removal of chlorophenols in sequential anaerobic–aerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 118–129. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.009.
- [147] Z. Yang, S. Zhou, The biological treatment of landfill leachate using a simultaneous aerobic and anaerobic (SAA) bio-reactor system, *Chemosphere.* 72 (2008) 1751–1756. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.090.
- [148] I. Kapdan, R. Oztekin, The effect of hydraulic residence time and initial COD concentration on color and COD removal performance of the anaerobic–aerobic SBR system, *J. Hazard. Mater.* 136 (2006) 896–901. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.01.034.
- [149] N. Supaka, K. Juntongjin, S. Damronglerd, M. Delia, P. Strehaiano, Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system, *Chem. Eng. J.* 99 (2004) 169–176. doi:10.1016/j.cej.2003.09.010.
- [150] F.P. Van Der Zee, S. Villaverde, Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - A short review of bioreactor studies, *Water Res.* 39 (2005) 1425–1440. doi:10.1016/j.watres.2005.03.007.
- [151] G. Farabegoli, A. Chiavola, E. Rolle, M. Naso, Decolorization of Reactive Red 195 by a mixed culture in an alternating anaerobic-aerobic Sequencing Batch Reactor, *Biochem. Eng. J.* 52 (2010) 220–226. doi:10.1016/j.bej.2010.08.014.
- [152] N. Pasukphun, S. Vinitnantharat, Degradation of organic substances and reactive dye in an immobilized-cell sequencing batch reactor operation on simulated textile wastewater, *J. Environ. Sci. Heal. Part A.* 38 (2003) 2019–2028. doi:10.1081/ESE-120023329.
- [153] M. Vera, E. Aspé, M.C. Martí, M. Roeckel, Anaerobic-aerobic treatment of a saline fishing effluent, *Process Saf. Environ. Prot.* 77 (1999) 275–289. doi:10.1205/095758299530152.
- [154] B.K. Pramanik, F.A. Roddick, L. Fan, Effect of biological activated carbon pre-treatment to control organic fouling in the microfiltration of biologically treated

- secondary effluent, *Water Res.* 63 (2014) 147–157. doi:10.1016/j.watres.2014.06.014.
- [155] R.R. Mohammed, M.F. Chong, Treatment and decolorization of biologically treated palm oil mill effluent (POME) using banana peel as novel biosorbent, *J. Environ. Manage.* 132 (2014) 237–249. doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.031.
- [156] M. Bassandeh, A. Antony, P. Le-Clech, D. Richardson, G. Leslie, Evaluation of ion exchange resins for the removal of dissolved organic matter from biologically treated paper mill effluent, *Chemosphere.* 90 (2013) 1461–1469. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.007.
- [157] S. Kamenev, J. Kallas, R. Munter, M. Trapido, Chemical oxidation of biologically treated phenolic effluents, *Waste Manag.* 15 (1995) 203–208. doi:10.1016/0956-053X(95)00018-U.
- [158] M. Mänttari, K. Viitikko, M. Nyström, Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry, *J. Memb. Sci.* 272 (2006) 152–160. doi:10.1016/j.memsci.2005.07.031.
- [159] J. Li, J. Wu, H. Sun, F. Cheng, Y. Liu, Advanced treatment of biologically treated coking wastewater by membrane distillation coupled with pre-coagulation, *Desalination.* 380 (2016) 43–51. doi:10.1016/j.desal.2015.11.020.
- [160] A.K. Pabby, S.H. Rizvi, A.M. Sastre-Requena, *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications*, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [161] M. Bernardo, A. Santos, P. Cantinho, M. Minhalma, Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study, *Water Res.* 45 (2011) 904–912. doi:10.1016/j.watres.2010.09.027.
- [162] J.M.O. Pulido, A review on the use of membrane technology and fouling control for olive mill wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* (2015). doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.151.
- [163] J.H. Jhaveri, Z.V.P. Murthy, A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes, *Desalination.* 379 (2016) 137–154. doi:10.1016/j.desal.2015.11.009.
- [164] E. Garcia-Castello, a. Cassano, a. Criscuoli, C. Conidi, E. Drioli, Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system, *Water Res.* 44 (2010) 3883–3892. doi:10.1016/j.watres.2010.05.005.
- [165] C. a. Paraskeva, V.G. Papadakis, E. Tsarouchi, D.G. Kanellopoulou, P.G. Koutsoukos, Membrane processing for olive mill wastewater fractionation, *Desalination.* 213 (2007) 218–229. doi:10.1016/j.desal.2006.04.087.
- [166] S.S. Madaeni, Review paper the application of membrane technology for water disinfection, *Water Res.* 33 (1999) 301–308.

- [167] A. Di Zio, M. Prisciandaro, D. Barba, Disinfection of surface waters with UF membranes, *Desalination*. 179 (2005) 297–305. doi:10.1016/j.desal.2004.11.075.

CAPÍTULO IV

MATERIALES

Y

MÉTODOS ANALÍTICOS

IV.1. EQUIPOS EXPERIMENTALES	145
IV.1.1. Jar-Test	145
IV.1.2. Planta Piloto ITACA: SBR	146
IV.2. EQUIPOS INSTRUMENTALES	151
IV.2.1. Espectrofotómetro	151
IV.2.2. Microtox®	152
IV.2.3. Microscopios para el recuento e identificación de Bacteria y Protistas en el fango activo	152
IV.2.4. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	154
IV.2.5. Respirómetro	155
IV.2.6. Módulos de membranas	157
IV.2.7. Equipos Auxiliares	160
IV.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	161
IV.3.1. Demanda Química de Oxígeno	161
IV.3.2. Nitrógeno Total	162
IV.3.3. Fósforo Total	162
IV.3.4. Cloruros	163
IV.3.5. Color	163
IV.3.6. Sólidos Suspendidos y Sólidos Suspendidos Volátiles	164
IV.3.7. Toxicidad	165
IV.3.8. Identificación y cuantificación de Bacterias	168
IV.3.8.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH) para la cuantificación bacteriana del fango activo	169
IV.3.8.2. Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes salinas ..	175

IV.3.9. Identificación y cuantificación de Protistas.....	176
<i>IV.3.9.1. Recuento de Protistas en el fango activo.....</i>	<i>177</i>
<i>IV.3.9.2. Aislamiento e identificación de los Protistas.....</i>	<i>178</i>
IV.3.10. Capacidad Antioxidante Total.....	180
IV.3.11. Fenoles Totales.....	182
IV.3.12. Perfil Fenólico: Análisis HPLC.....	183
IV.3.13. Respirimetría	193
IV.4. REACTIVOS.....	198
IV.5. BIBLIOGRAFÍA.....	204

En este capítulo se van a detallar los equipos utilizados durante el procedimiento experimental, que incluyen la planta piloto para el tratamiento biológico y el equipo de jar-test utilizado en los pretratamientos de adsorción (con carbón y con resinas) y de ajuste de pH y adición de coagulantes y floculantes. Así mismo, se detallan los equipos instrumentales manejados en la determinación de los parámetros analíticos y los reactivos necesarios.

IV.1. EQUIPOS EXPERIMENTALES

IV.1.1. Jar-test

El equipo de jar-test utilizado, que se puede ver en la Figura IV.1, es un Flocumatic 4 (P SELECTA). Tiene cuatro agitadores con una velocidad de giro que puede variar entre 0 y 200 rpm.



Figura IV.1. Equipo de Jar-test.

La utilización de los jar-test está contemplada dentro de la norma D2035-ASTM [1] para la evaluación de la adición de reactivos en el tratamiento de aguas, bajo las mismas condiciones experimentales.

En este equipo se llevaron a cabo los ensayos correspondientes a los siguientes pretratamientos: ajuste de pH, adición de coagulantes-floculantes y adsorción con carbón activo y resinas. Además, se realizaron también los ensayos de recuperación de compuestos fenólicos, mediante la desorción con disolventes orgánicos de las resinas utilizadas en la adsorción.

IV.1.2. Planta Piloto ITACA: SBR

La planta piloto que se puede ver en la Figura IV.2 se utilizó en el tratamiento biológico de las FTOPs.

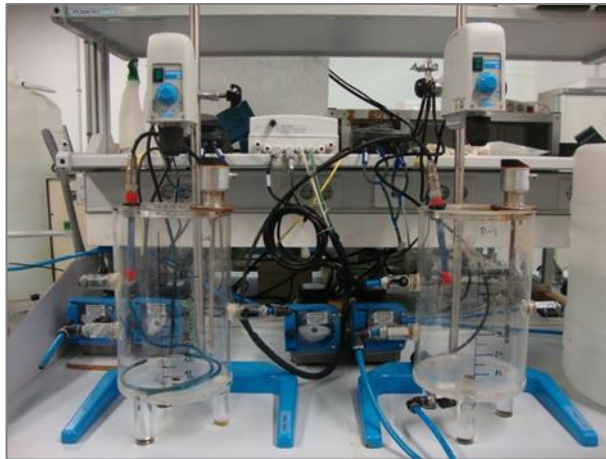


Figura IV.2. Planta Piloto ITACA.

Esta planta (propiedad de DAM), consta de dos unidades idénticas de tratamiento tipo SBR conectadas a un autómata (no mostrado en la fotografía). La función del autómata es controlar los ciclos del reactor, la puesta en marcha de las bombas de alimentación y drenaje, el nivel de líquido y el rango de concentración de oxígeno disuelto.

Componentes de la planta piloto

En la Figura IV.3 se esquematiza uno de los reactores de la planta ITACA, para el cual se van a detallar cada uno de sus componentes:

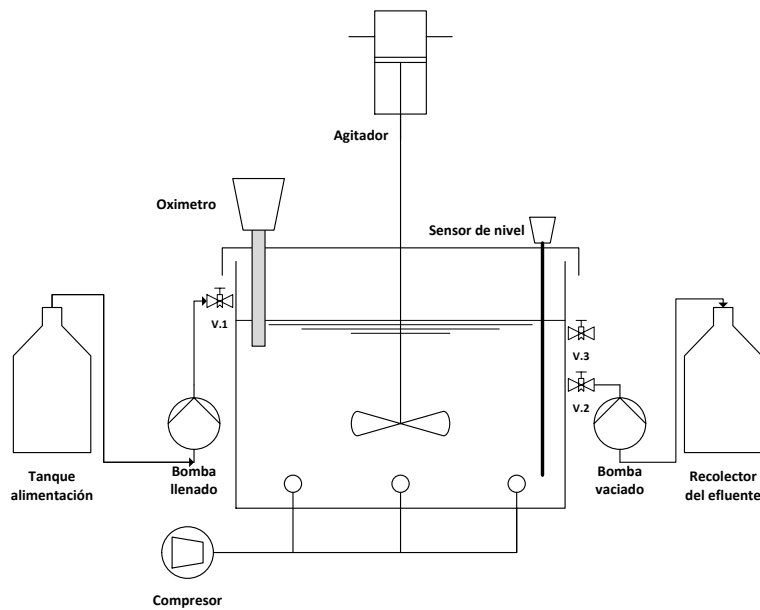


Figura IV.3. Esquema SBR.

Cada SBR está formado por un recipiente cilíndrico de material plástico transparente, que permite ver su contenido, con unas dimensiones de 20 cm de diámetro por 30 cm de alto. Este depósito tiene capacidad de 9 litros y está abierto en la parte superior. La tapa está hecha del mismo material y en ella están acoplados un sensor de nivel y un oxímetro (con sonda de temperatura), a través de unas aberturas circulares. Una tercera abertura permite insertar pala metálica que está acoplada a un agitador.

El alimento se sitúa en un tanque de PVC (capacidad 2L). A través de la válvula V.1 e impulsado por una bomba peristáltica, el alimento entra al SBR. El efluente se extrae del reactor con una bomba gemela a través de la válvula V.2 y se recolecta en otro tanque, de iguales características al de alimentación. La válvula V.3 se utilizó para extraer muestras de efluente o LM, para su análisis.

El suministro de aire se realiza a través de un compresor y un difusor situado en el fondo del reactor.

En la Tabla IV.1 se recopilan los equipos descritos con algunas de sus características.

Tabla IV.1. Equipos acoplados a los SBR de la planta piloto ITACA.

Equipo	Proveedor	Características
Bomba peristáltica	Serie MP AIGUAPRES	Caudal=1,6 L·h ⁻¹ 1,8 Cv 35 rpm
Agitador	Serie ES VELP Scientifica	230V/50-60 Hz 50-1300 rpm
Compresor	SERA air 550 R plus	flujo 550 L·h ⁻¹ 8 V
Oxímetro	Serie OXI 49 CRISON	Sonda de oxígeno disuelto y temperatura

Autómata

La interfaz del autómata de control se puede ver en la Figura IV.4 y la Figura IV.5. Los datos presentados en la Figura IV.4 tienen una finalidad informativa, en la que se pueden consultar los equipos que están funcionando y la etapa del ciclo en la que se encuentran los reactores. La interfaz de la Figura IV.5 permite

modificar el programa para ajustar los parámetros operacionales a las necesidades del ensayo. Estos parámetros se describen en la Tabla IV.2.



Figura IV.4. Autómata planta ITACA; interfaz informativa.



Figura IV.5. Autómata planta ITACA; interfaz modificaciones.

Tabla IV.2. Parámetros controlados por el autómata de la planta ITACA.

Parámetro		Rango	
Llenado	Tiempo	min	0 – 600
	Nivel	%	0 – 100
Bomba llenado		%	0 – 100
Reacción 1	Tiempo reacción	min	0 – 600
	OD max.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	OD min.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	Aireación ON	s	0 – 3600
	Aireación OFF	s	0 – 3600
Reacción 2	Tiempo reacción	min	0 – 600
	OD max.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	OD min.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	Aireación ON	s	0 – 3600
	Aireación OFF	s	0 – 3600
Reacción 3	Tiempo reacción	min	0 – 600
	OD max.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	OD min.	mg·L ⁻¹	0,0 – 0,7
	Aireación ON	s	0 – 3600
	Aireación OFF	s	0 – 3600
Sedimentación		min	0 – 600
Vaciado	Tiempo	min	0 – 600
	Nivel	%	0 – 100
Bomba llenado		%	0 – 100
Espera		min	0 – 600

Tal y como se observa en esta tabla, las fases de llenado, vaciado, sedimentación y espera, se fijan para cada uno de los ciclos. Sin embargo, la fase de reacción permite realizar hasta tres programaciones diferentes para

poder incluir etapas alternativas de reacción aerobia y anaerobia dentro del mismo ciclo.

IV.2. EQUIPOS INSTRUMENTALES

IV.2.1. Espectrofotómetro

El equipo espectrofotométrico utilizado en el desarrollo de esta tesis doctoral fue un Espectrofotómetro DR 6000 UV-VIS con tecnología RFID de HACH. Las características más significativas de este equipo quedan resumidas en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Espectrofotómetro DR 6000 (HACH)

Característica		Especificación
Ancho de banda espectral		2 nm
Condiciones de operación		10 – 40 °C máx. 80% de humedad relativa
Longitud de onda	Rango	190 – 1100
	Exactitud	± 1 nm
Medición fotométrica	Rango	±3 Abs (rango de 340 a 900 nm)
	Exactitud	1% entre 0,50 y 2,0 Abs 5 mAbs entre 0 y 0,5 Abs
Fuente de luz		Tungsteno (VIS) Deuterio (UV)

En él se llevaron a cabo las siguientes medidas:

- DQO, nitrógeno, fósforo y cloruros, con cubetas de reactivos.
- Color de las FTOP y otros efluentes.
- Concentración de fenoles totales.

IV.2.2. Microtox®

Para medir la toxicidad de las FTOP y de los efluentes, tras la depuración biológica, se utilizó el equipo de análisis Microtox® Serie M500 de AZUR ENVIRONMENTAL que se puede ver en la Figura IV.6.



Figura IV.6. Microtox® de AZUR ENVIRONMENTAL.

IV.2.3. Microscopios para el recuento e identificación de bacteria y protistas en el fango activo

El microscopio utilizado para la identificación y cuantificación de la población bacteriana fue un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50. Este equipo se encuentra en el Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA), bajo la supervisión del Dr. José Luis Alonso Molina (responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua). Las fotografías se realizaron con una cámara digital OLYMPUS DP50 acoplada al microscopio, que utilizó los

filtros U-MWIB (Fluoresceína, FAM) y U-MWIG (Rodamina, TAMRA). En la Figura IV.7 se presenta una imagen del equipo utilizado.



Figura IV.7. Microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50 del IIAMA.

Para el recuento e identificación de protistas se utilizaron dos microscopios: OLYMPUS BX 50 y NIKON ECLIPSE 80i, este último con una cámara DS-Fi2 acoplada. Estos dos equipos se encuentran en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la Dra. Blanca Pérez Uz.

IV.2.4. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia

Durante el periodo experimental se utilizaron dos equipos distintos de cromatografía líquida de alta eficiencia, conocidos habitualmente por sus siglas en inglés HPLC (High performance liquid chromatography). Ambos equipos se usaron para obtener el perfil fenólico de las FTOP y de los diversos efluentes obtenidos a lo largo del desarrollo experimental.

En los primeros análisis realizados se trabajó con el HPLC ubicado en el Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) de la Universitat Politècnica de València (UPV), bajo la supervisión de Jaime Primo Millo y con el apoyo técnico de Nuria Cabedo Escrig. El equipo utilizado fue un Waters Acquity UPLC system de MILFORD, equipado con un detector 2996 PDA (Photodiode Array). Posteriormente se utilizó otro HPLC adquirido por el Instituto de Seguridad Industrial, Radiofísica y Medioambiental (ISIRYM). En la Figura IV.8 se puede observar el equipo descrito y en la Tabla IV.4 las características técnicas más relevantes:

Tabla IV.4. Características técnicas HPLC (ISIRYM).

Módulo	Característica	Especificación	
MD-2018	Método fotométrico	Haz simple	
	Longitud onda	Rango	190 – 900 nm
		Exactitud	± 1 nm
	Fuente de luz		Tungsteno (VIS) Deuterio (UV)
PU-2089	Tasa de flujo	Rango	0,001 – 10 mL·min ⁻¹
		Exactitud	± 1 %
	Presión		0 – 50 MPa

Este equipo está compuesto por un sistema detector PDA MD-2018 y una bomba inyectora modelo PU-2089, ambos de JASCO. El detector MD-2018 va acompañado de un módulo para la adquisición de datos, cuyo procesamiento se

realiza con el Software ChromNAV de JASCO. En cuanto a la bomba PU-2089, cabe destacar que está preparada para dosificar una fase móvil compuesta por hasta cuatro disolventes distintos, con una variación del gradiente de concentración de entre el 0 y el 100%, en incrementos del 0,1%. Además, consta con una unidad de desgasificación para evitar interferencias en la detección del cromatograma.



Figura IV.8. HPLC (ISIRYM).

IV.2.5. Respirómetro

Para los ensayos respirométricos de fangos activos de un tratamiento biológico, se utilizó un respirómetro de la Serie BM-Advance de SURCIS. Este equipo

(Figura IV.9) está situado en el IIAMA, bajo la supervisión del Dr. José Luis Alonso Molina.



Figura IV.9. Respirómetro BM-Advance.

En la Figura IV.10 y la Figura IV.11 se presentan en detalle los componentes de la unidad de reacción.

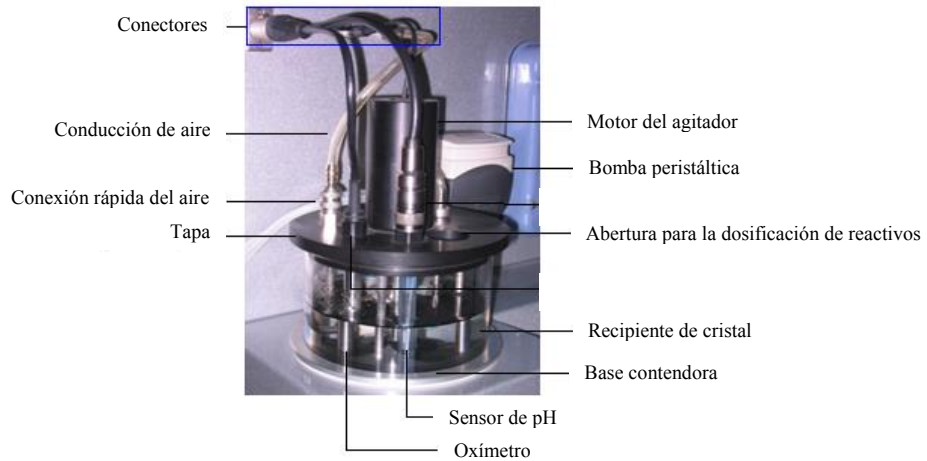


Figura IV.10. Unidad de reacción del Respirómetro BM-Advance.

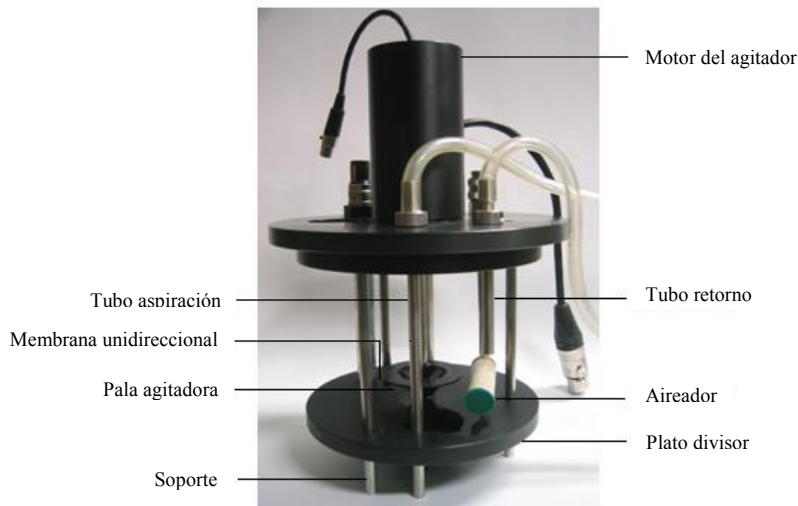


Figura IV.11. Componentes interiores de la unidad de reacción del Respirómetro BM-Advance.

En los ensayos llevados a cabo se determinó la tasa de consumo de oxígeno (OUR) y a partir de esta la tasa específica de consumo de oxígeno (SOUR). Además se obtuvo el coeficiente del rendimiento del crecimiento de la biomasa heterótrofa relativa a la demanda de oxígeno (Y_H). La obtención de estos parámetros se detalla en la sección IV.3.13.

IV.2.6. Módulos de membranas

Durante el periodo experimental se hizo uso de tres plantas piloto de membranas, en concreto una de ultrafiltración y dos de nanofiltración (NF1 y NF2). Estos equipos se utilizaron con dos finalidades:

- Como pretratamiento de las FTOP, previo a los ensayos realizados con resinas de adsorción, con la finalidad de obtener influentes con una menor

concentración de materia orgánica y de sólidos suspendidos. Se usaron la planta de UF y la de NF1.

- Como tratamiento terciario del efluente de salida del tratamiento biológico de las FTOP, en el que se utilizaron la planta de UF y la de NF2.

En la Figura IV.12 y la Figura IV.13 se pueden ver la planta de UF y la de NF1, respectivamente. La primera de ellas está situada en el laboratorio de Medio Ambiente de la UPV y la segunda en el Laboratorio de Investigación 2 de la UPV. La planta de UF está equipada con un módulo de membranas plano y está preparado para trabajar en un rango de presiones de entre 1 y 3 bares. Por su parte, el equipo de nanofiltración NF1 está equipado con un módulo de membranas en arrollamiento en espiral y está preparado para trabajar hasta una presión máxima de 25 bares.



Figura IV.12. Planta piloto de ultrafiltración.



Figura IV.13. Planta piloto de nanofiltración (NF1).

El segundo equipo de nanofiltración utilizado (NF2) está situada en el laboratorio de Medio Ambiente de la UPV y se puede ver en la Figura IV.14. Esta planta está equipada con un módulo de membranas planas preparado para trabajar hasta una presión máxima de 20 bares.



Figura IV.14. Planta piloto de nanofiltración (NF2).

IV.2.7. Equipos auxiliares

Durante el desarrollo experimental se utilizaron además otros equipos auxiliares que se listan a continuación:

- Medidor de pH GLP 21+ de CRISON.
- Conductímetro EC-Meter GLP 31+ de CRISON.
- Turbidímetro D112 de DINKO INSTRUMENTS.
- Balanza de precisión ABJ 120-4M de KERN.
- Centrífuga con capacidad para 8 viales y velocidad máxima de 8000 rpm de la Serie Centromix de P SELECTA.
- Termorreactor TR 300 de MERK, con los acoples necesarios para las cubetas de HACH LANGE.
- Soporte de metal con capacidad para tres filtros de disco y soporte cerámico, para la obtención de los sólidos suspendidos.
- Estufa de P SELECTA con un rango de temperaturas de 0 a 250°C.
- Horno de NABERTHERM con un rango de temperatura de 30 a 3000°C.
- Equipo de ultrasonidos Serie Elmasonic P 70H de ELMA.
- Bomba de vacío de diafragma resistente a químicos Serie N820 FT.18 de KNF LABOPORT.
- Rotavapor R-114 de BÜCHI.

IV.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

IV.3.1. Demanda química de oxígeno

Se midió la DQO soluble (filtrada a 0,45 μm) mediante cubetas de reacción de la casa HACH LANGE. Se utilizaron dos tipos de cubetas, en función del rango de DQO a medir.

- LCK 014; rango 1000 – 10000 $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Se utilizaron para medir la DQO de las FTOP. El método utilizado, de acuerdo a la ISO 15705:2002 [2], es válido para concentraciones de DQO por encima de 1000 $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. En él se produce la oxidación de la materia orgánica bajo reflujo durante 2 horas a 148°C, utilizando dicromato potásico y ácido sulfúrico como oxidantes en presencia de sulfato de plata como catalizador y sulfato de mercurio para enmascarar los cloruros. Posteriormente evalúa la coloración verde del Cr^{3+} .
 - Volumen de muestra 0,5 mL.
 - Desviación estándar 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
 - Interferencias; concentración máxima de cloruro 5000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que se realizaron las diluciones pertinentes para evitarlas.

- LCK 614; rango 50 – 300 $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Se utilizaron para medir los efluentes de las FTOP pretratadas y los efluentes del tratamiento biológico. El método utilizado está enmarcado dentro de la ISO 6060:1989 [3]. Utiliza la misma reacción descrita para el LCK014, pero en este caso se valora la disminución de la coloración amarilla del Cr^{6+} .
 - Volumen de muestra 2,0 mL.
 - Desviación estándar 1,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
 - Interferencias; concentración máxima de cloruro 1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que se tuvieron que diluir las muestras.

IV.3.2. Nitrógeno total

El nitrógeno total (N_T) de las FTOP y los efluentes del tratamiento biológico (filtrado a $0,45 \mu\text{m}$), se midió con las siguientes cubetas de HACH LANGE:

- LCK 338; rango $20 - 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se determinó utilizando el método de digestión de Koroleff (peroxodisulfato) y la detección fotométrica con 2,6-dimetilfenol, de acuerdo a la norma ISO 11905-1:1997 [4]. En este método se oxida el nitrógeno a nitrato mediante digestión con peroxodisulfato. Los iones nitrato reaccionan en una disolución de ácido sulfúrico y fosfórico con 2,6-dimetilfenol formando un nitrofenol.
 - Volumen de muestra $0,2 \text{ mL}$.
 - Desviación estándar $0,87 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
 - Interferencias; no se han descrito. En algunos casos se tuvo que diluir alguna muestra para entrar en el rango de las cubetas.

IV.3.3. Fósforo total

El fósforo total (P_T) de las FTOP y los efluentes del tratamiento biológico (filtrado a $0,45 \mu\text{m}$), se midió con las siguientes cubetas de HACH LANGE:

- LCK 348; rango $0,5 - 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se determinó mediante el método de azul de fosfomolibdeno, de acuerdo a la norma ISO 6878-1:1986 [6]. Los iones fosfato, presentes en la muestra, reaccionan en disolución ácida con iones molibdato y antimonio formando el complejo antimonilfosfomolibdato que mediante ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno.
 - Volumen de muestra $0,2 \text{ mL}$.
 - Desviación estándar $0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
 - Interferencias; no se han descrito. En algunos casos se tuvo que diluir alguna muestra para entrar en el rango de las cubetas.

IV.3.4. Cloruros

Los cloruros (Cl^-) se determinaron en la caracterización de las FTOP (muestras filtradas a $0,45 \mu\text{m}$), utilizando cubetas de reacción de HACH LANGE:

- LCK 311; rango $1 - 1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se determinó de acuerdo al método Hierro (III)-Tiocianato especificado en el procedimiento desarrollado en la norma APHA 4500- Cl^- Cyanide [5]. Durante la reacción de los iones cloruro con el tiocianato de mercurio se forma cloruro mercurio (II). Al mismo tiempo, se libera una cantidad equivalente de iones tiocianato que reaccionan con las sales férricas (III) formando tiocianato férrico (III).
 - Volumen de muestra $0,1 \text{ mL}$.
 - Desviación estándar $0,28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
 - Interferencias; no se han descrito. Las muestras se diluyeron 100 veces para entrar en el rango de las cubetas.

IV.3.5. Color

La tonalidad de las FTOP y los efluentes obtenidos tras la adsorción con resinas, variaron desde un anaranjado claro hasta anaranjados verdosos. Es por ello que el método utilizado [6] tuvo en cuenta las absorbancias del amarillo y del verde. Las muestras se filtraron a $40 \mu\text{m}$ (filtros de celulosa) para eliminar la excesiva turbidez en algunas de ellas, lo cual afectaba considerablemente a la medida, igualando de esta forma todas las muestras medidas. Se aplicó la ecuación Eq.(IV.1):

$$\text{Color} = A_{440} - A_{700} \quad \text{Eq.(IV.1)}$$

donde A_{440} es la absorbancia a 440 nm (amarillo) y A_{700} es la absorbancia a 700 nm (verde).

Los efluentes de los SBR presentaron una coloración oscura, debido a la oxidación de los compuestos fenólicos no degradados. A este tipo de reacciones se las conoce como “enzymatic browning” [7,8] y tienen lugar en condiciones alcalinas (el pH del licor de mezcla estuvo siempre por encima de 8 en todos los reactores) dando lugar a compuestos como las o-quinonas, que polimerizan rápidamente en sus formas de melanina, que presentan coloraciones marrón oscuro [9,10]. Los efluentes se diluyeron 40 veces y se filtraron a 40 µm (filtros de celulosa). Posteriormente se utilizó la fórmula aportada por Döepkens et al. [11] para calcular un parámetro denominado FZ, que tiene en cuenta las absorbancias de los colores amarillo, rojo y azul:

$$FZ = \frac{A_{436}^2 + A_{525}^2 + A_{620}^2}{A_{436} + A_{525} + A_{620}} \quad \text{Eq.(IV.2)}$$

donde A_{436} , A_{525} y A_{620} son las absorbancias medidas a 436 (amarillo), 525 (rojo) y 620 (azul) nm, respectivamente.

IV.3.6. Sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos (SS) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinaron en las FTOP y en los distintos efluentes obtenidos en los pretratamientos. También se calcularon en el licor de mezcla (LM) de los reactores biológicos, para los cuales la nomenclatura utilizada fue SSLM y SSVLM.

Sólidos suspendidos: SS y SSLM

Los SS y SSLM indican la concentración de los sólidos sedimentables y no sedimentables presentes en una fase líquida, que pueden ser retenidos en un filtro. Se utilizaron filtros de borosilicato con un diámetro de poro de 1,2 µm, de acuerdo a la norma APHA (2005) [12]. La concentración de sólidos

suspendidos se expresó en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y se obtuvo por diferencia de pesada entre el filtro limpio y el filtro con los sólidos secos (ecuación Eq.(IV.3)). El secado se realizó en estufa a 105°C , durante 90 min y posteriormente se dejó atemperar (30 min) en un desecador. Se utilizó como soporte para el filtro un vidrio de reloj.

$$\text{SS o SSLM} = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad \text{Eq.(IV.3)}$$

donde m_1 es la masa del filtro limpio (mg), m_2 es la masa del filtro con los SS secos (mg) y V es el volumen de muestra filtrado (L).

Sólidos suspendidos volátiles: SSV y SSVLM

Los SSV y SSVLM, representan la fracción de los sólidos suspendidos que se volatilizan a 550°C , conforme a la norma APHA (2005) [12]. Tras obtener los SS o SSML, se utilizó el mismo filtro y un crisol cerámico como soporte para realizar la calcinación a 550°C durante una hora. Tras atemperar en desecador, se utilizó la ecuación Eq.(IV.4):

$$\text{SSV o SSVLM} = \frac{m_2 - m_3}{V} \quad \text{Eq.(IV.4)}$$

donde m_3 es la masa del filtro con los SS calcinados (mg).

IV.3.7. Toxicidad

El sistema Microtox® se ha utilizado como una prueba de toxicidad acuática desde principios de 1980 y está aceptado como una prueba estándar [13]. Este sistema utiliza bacterias del tipo *Vibrio fischeri*, las cuales emiten luz durante el metabolismo celular. Cuando estas bacterias son expuestas a sustancias tóxicas

se produce una disminución en la luminiscencia, que se puede correlacionar directamente con la toxicidad.

Se midió la toxicidad de las FTOP y de los efluentes del tratamiento biológico. La metodología seguida fue la siguiente:

- Preparación de la muestra.
 - La salinidad debe ser del 2%. Se utilizó una disolución osmótica reguladora (OSA), proporcionada por el proveedor del equipo. En nuestro caso se añadieron 9 partes de muestra y 1 parte de OSA.
 - Turbidez y color. Pueden afectar a la lectura de luminiscencia. En nuestro caso las muestras se filtraron a 40 μm (filtro celulosa).
- Preparación de las bacterias; las bacterias liofilizadas se reconstituyeron con la disolución proporcionada por el proveedor (100 μL por vial). Una vez activadas se deben utilizar en un máximo de 2 h, conservándolas a 5°C. En la Figura IV.15 se presenta la zona de incubación de las muestras (15°C), la zona de conservación de las bacterias (5°C) y la zona de medida.

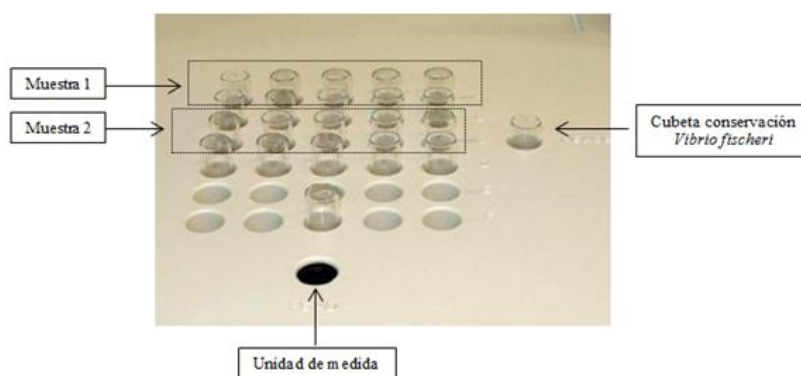


Figura IV.15. Detalle del equipo Microtox®.

- En todos los ensayos se preparó un blanco y la muestra por cuadruplicado, con 4 diluciones diferentes; 45,00% - 22,50% - 11,25% y 5,63%. Al blanco y a cada muestra se les añadieron 100 μ L del preparado de bacterias y se mantuvo 15 min en incubación (15°C). En la Figura IV.16 se presenta un esquema detallado de la preparación llevada a cabo.

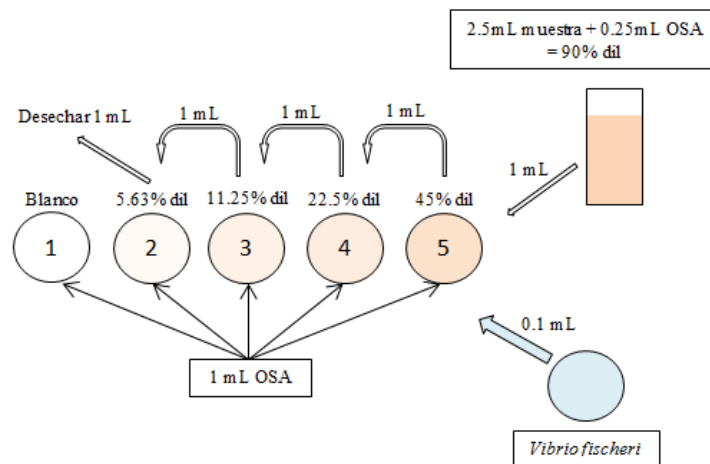


Figura IV.16. Esquema dosificación y dilución para Microtox®.

- Con los valores obtenidos y el software que acompaña al equipo, se calculó la EC_{50} , que equivale a la concentración de contaminantes ($mg \cdot L^{-1}$) que reduce un 50% la luminiscencia de las bacterias tras 15 minutos de contacto.
- Otra forma de expresar los resultados es también aplicando la ecuación Eq.(IV.5). con la que se obtienen unidades de toxicidad (UT).

$$\text{Toxicidad (UT)} = \frac{1}{EC_{50}} \cdot 100 \quad \text{Eq.(IV.5)}$$

IV.3.8. Identificación y cuantificación de bacterias

Las bacterias son procariotas, lo cual significa que sus células no tienen un núcleo definido. Es por ello que su material genético (ADN) no está separado del resto del citoplasma por una membrana.

Los microorganismos poseen un genotipo que se transmite por herencia y un fenotipo que depende de las circunstancias que les rodean. Su identificación se pueden realizar en base a las siguientes características [14].

1. Características filogenéticas.

En 1975, Carl Woese seleccionó el gen 16S rRNA como marcador filogenético molecular [15], el cual se sigue utilizando desde entonces de forma generalizada. Otro gen que posee un mayor grado de resolución es el 23S rRNA [16].

2. Características fenotípicas.

Incluyen pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad antimicrobiana. En su estudio se establecen las condiciones de pH, salinidad y temperatura para tener un crecimiento óptimo.

3. Características genotípicas.

Se estudia la composición del ácido desoxirribonucleico (DNA), proporcionando el porcentaje GC (contenido de guanina y citosina), que puede variar entre el 20 y el 80 %. Valores de GC inferiores al 3%, entre dos muestras, suponen una misma especie y valores por encima del 10% indican especies distintas. Por otro lado, cuando el valor de la secuenciación del gen 16S rRNA, para dos muestras distintas, no proporciona un dato clarificador (similitud del 97 % o más) se realiza la hibridación DNA- DNA.

En esta tesis doctoral se ha hecho únicamente uso de los análisis filogenéticos, utilizando los genes 16S rRNA y 23S rRNA como marcadores moleculares. Se

aplicó la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ*, conocida por sus siglas inglesas como FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). El estudio se acotó a la relación de dominios, filos y clases que se presenta en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Microorganismos identificados mediante la técnica FISH.

Dominio	Filo	Clase
<i>Archaea</i>	<i>Chrenarchaeota</i>	
		<i>α-Proteobacteria</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>
		<i>γ-Proteobacteria</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Chloroflexi</i>	
	<i>Cytophaga</i>	
	<i>Firmicutes</i>	
	<i>Actinobacteria</i>	

En cuanto a la identificación de la especie halófila dominante, se procedió conforme al método de aislamiento en medio salino ($70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) llevado a cabo por Zhang et al. [17], analizando las colonias que tuvieron un crecimiento significativo en estas condiciones.

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente por el Dr. José Luis Alonso Molina, en los que colaboró de forma activa la doctoranda.

IV.3.8.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH) para la cuantificación bacteriana del fango activo

La técnica FISH se basa en la hibridación directa de la bacteria diana con una sonda complementaria de una región del gen 16S rRNA o 23S rRNA. Presenta

la ventaja, frente a otras técnicas, de poder identificar microorganismos en su propio hábitat sin necesidad de realizar previamente su aislamiento y purificación.

Este método molecular consiste en preparar secuencias cortas de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias del ácido ribonucleico (RNA) que se quieren identificar. Estas sondas pueden unirse con una secuencia de RNA complementaria (16S rRNA o 23S rRNA) y se produce un híbrido DNA:RNA. La sonda está marcada con moléculas fluorescentes, llamadas fluorocromos (como la fluoresceína o rodamina), de forma que los híbridos formados sean fácilmente detectables con un microscopio de epifluorescencia. Estos fluorocromos son sustancias “colorantes” que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente con otra longitud de onda característica. En la Figura IV.17 se puede ver un esquema representativo de la hibridación in situ.

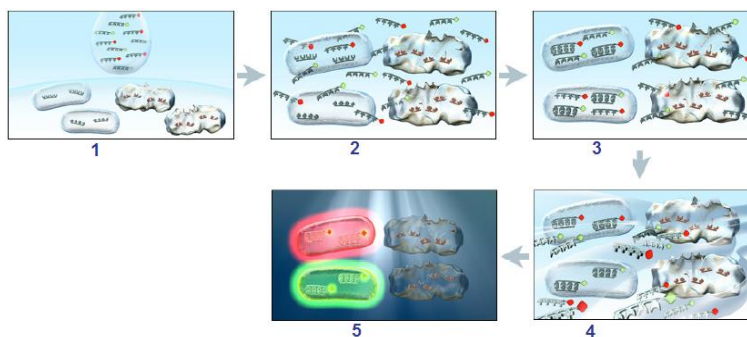


Figura IV.17. Esquema hibridación técnica FISH.

La parte más crítica de la técnica FISH es el diseño de las sondas, ya que estas deben ser lo suficientemente específicas como para unirse únicamente a la bacteria diana, teniendo en cuenta la presencia de otras bacterias con moléculas

de rRNA similares. Los tres parámetros determinantes para asegurar la especificidad de las sondas son la temperatura, la concentración de NaCl y la concentración de formamida (FA) en el tampón de hibridación [18]. En la Tabla IV.6 se presentan las sondas utilizadas para identificar los distintos tipos de bacterias y archaea, con la concentración de FA utilizada [19].

Tabla IV.6. Lista de sondas de oligonucleótidos y las concentraciones de formamida.

Prueba	Secuencia	%FA	Organismo
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Most bacteria
EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	35	<i>Planctomycetales</i>
EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	35	<i>Verrucomicrobiales</i>
EUB338IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	35	<i>Eubacteria</i>
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	35	<i>α-Proteobacteria</i>
CFX1223 GNSB941	CCATTGTAGCGTGTGTGTMG	35	<i>Chloroflexi</i>
BET42a	GCCTTCCCACCTCGTTT		
BET42a competitor	GCCTTCCCACATCGTT	35	<i>β-Proteobacteria</i>
GAM42a	GCCTTCCC CATCGTTT		
GAM42a competitor	GCCTTCCCACCTCGTTT	35	<i>γ-Proteobacteria</i>
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC		
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC	35	<i>Firmicutes</i>
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC		
HGC69a	TATAGTTACCACCGCCGT		
HGC69a competitor	TATAGTTACGGCCGCCGT	25	<i>Actinobacteria</i>
CF319a	TGGTCCGTATCTCAGTAC	35	<i>Cytophaga</i>
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	35	<i>Archaea</i>

La metodología seguida incluyó los siguientes pasos:

1. *Preparación de los portaobjetos.*

Los portaobjetos se lavaron con detergente y se enjuagaron con agua destilada, dejándolos secar al aire durante 24 h (protegidos del polvo). Posteriormente se cubrieron por inmersión con gelatina (preparada en el momento) y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos utilizados tuvieron una capacidad para 10 muestras (10 pocillos).

2. *Preparación de las muestras.*

Las muestras se fijaron para conserven su morfología y favorecer el acceso de las sondas a la zona de hibridación. En función del tipo de pared celular de la bacteria se utilizó un reactivo para la fijación; las bacterias Gram-negativas se fijaron con paraformaldehído al 4% y las Gram-positivas con etanol al 50%, ambas a 4°C [20]. Se puso entre 3 y 5 µl de muestra fijada en los pocillos del portaobjetos y se dejó secar al aire. Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento de deshidratación, en el que los portaobjetos se sumergieron sucesivamente durante 3 minutos en etanol al 50%, etanol al 80% y etanol puro. Finalmente se dejó secar el porta con las muestras fijadas al aire.

3. *Hibridación in situ.*

Se preparó la disolución de hibridación según el porcentaje de FA marcado en la Tabla IV.6. En cada pocillo se añadieron 9 µL de la disolución de hibridación y 1 µL de sonda y se incubó a 46°C durante 2 h (en oscuridad) [21]. Una vez fuera de la estufa se lavó cada porta con una disolución de lavado. Posteriormente, se sumergieron las muestras en esta misma disolución y se incubaron a 48°C, durante 15-20 min (en oscuridad). Finalmente se lavaron los portaobjetos con agua destilada, secándolos al aire en oscuridad. Estas muestras se conservaron a -20°C hasta su observación en microscopio.

4. Toma de imágenes con el microscopio OLYMPUS BX50.

La observación de las muestras se realizó con los objetivos de 60x y 100x y se tomaron un mínimo de 20 imágenes (al azar) de cada sonda hibridada. En la Figura IV.18 y la Figura IV.19 se observan varias de las imágenes tomadas durante esta parte experimental. Con el filtro verde se detectan todas las bacterias presentes y con el rojo las marcadas por cada sonda específica.

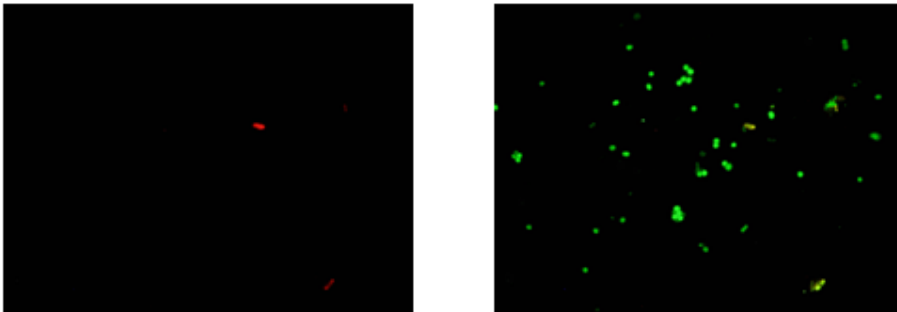


Figura IV.18. Imagen del fango activo con el microscopio BX50 y la sonda *Chloroflexi*.

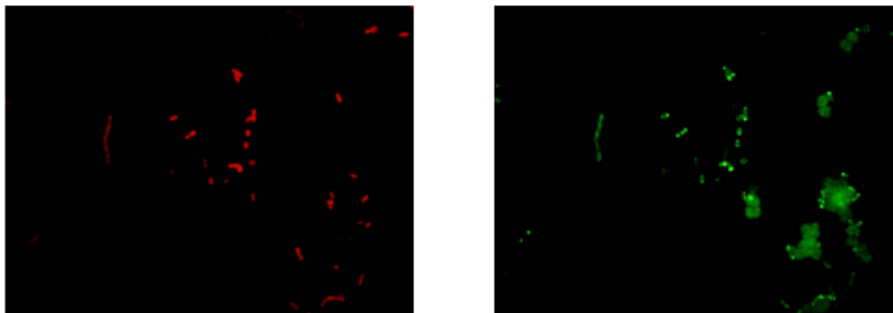


Figura IV.19. Imagen del fango activo con el microscopio BX50 y la sonda *γ-Proteobacteria*.

5. *Análisis y cuantificación de las bacterias.*

Las imágenes tomadas se procesaron con el software basado en técnicas de umbralización creado por Borrás [22], utilizando Matlab 7.1 para el tratamiento de los datos. En la Figura IV.20 se puede ver el tratamiento de la imagen que realiza esta herramienta para una muestra concreta.

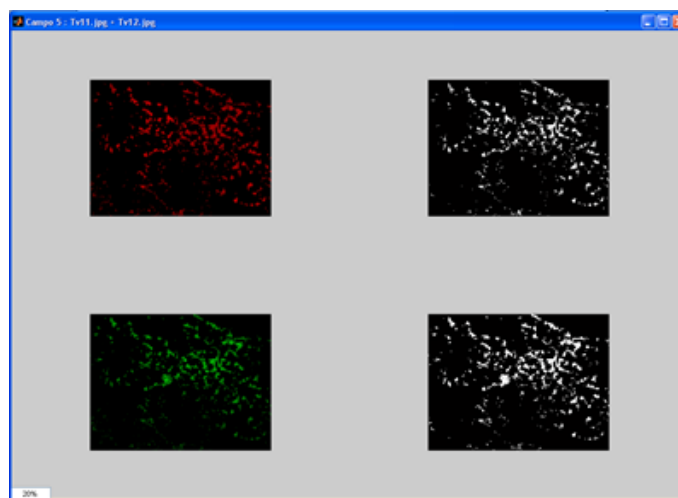


Figura IV.20. Tratamiento de imagen con software Borrás [22].

Por otro lado, en la Figura IV.21 se presenta la hoja de cálculo EXCEL que se genera tras el tratamiento de los datos, donde se proporcionan el área porcentual ocupada por las bacterias hibridadas junto a su desviación estándar.

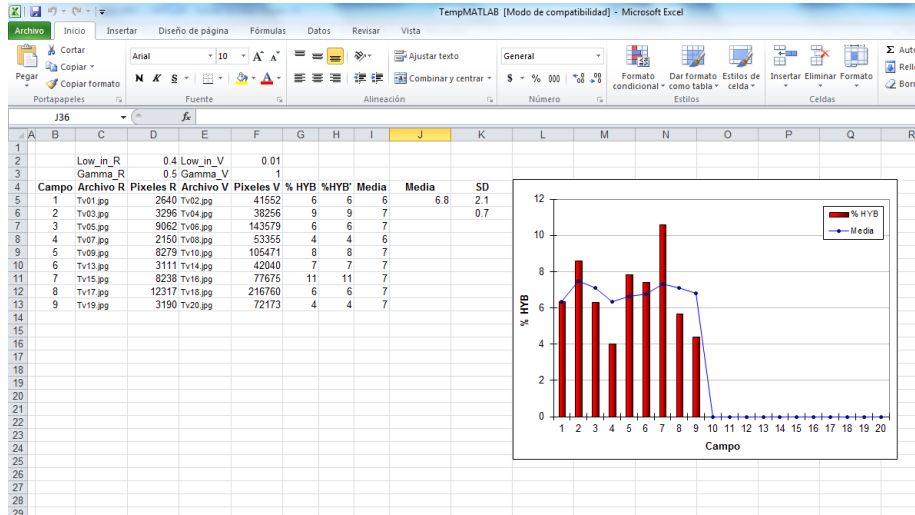


Figura IV.21. Hoja EXCEL con los datos del software Borrás [22].

IV.3.8.2. Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes salinas

Para identificar las bacterias halófilas se procedió conforme al método de aislamiento llevado a cabo por Zhang et al. [17]. En el que se siguieron los siguientes pasos:

- Se utilizó un cultivo de enriquecimiento (denominado SWM) con un contenido en NaCl de $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cual se inoculó el fango del SBR en estudio. Se mantuvo en agitación a 130 rpm y 37°C durante 48 h.
- Se tomó 1 mL de este cultivo, se inoculó sobre el agar SWM situado en placas Petri y se incubó durante 24-48h a 37°C . Las colonias se obtuvieron mediante siembra continua en el agar salino.

- Los aislamientos tolerantes a la salinidad de $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se resuspendieron en un caldo de cultivo con un 10% de glicerol y se almacenaron a -20°C .
- El gen 16S rRNA se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes indicadores: F27 (5'–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG–3') [23] y R1492 (5'–TACGGYTACCTTGTTACGACTT–3') [24].
- Los productos del PCR se purificaron con el kit GenElute PCR Clean-Up (Sigma) y se enviaron al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBCMP) de Valencia, para su secuenciación. La secuenciación se realizó bidireccionalmente.
- La secuencia se comparó con la de otros microorganismos por medio del Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [25] con el valor opcional limitado a secuencias de cepas de referencia. BLAST es un programa informático que permite comparar secuencias de DNA, RNA o proteínas con una extensa base de datos. Además, aplica un algoritmo que encuentra la/las secuencias con mayores similitudes a la secuencia buscada. Se utilizó también el servidor EzTaxon [26] en base a la secuencia del 16S rRNA obtenida, conforme al método utilizado por Kim et al. [27].

En el Anexo I se presenta el Árbol Filogenético obtenido para la bacteria halófila tolerante a las condiciones de elevada salinidad impuestas, así como la secuenciación del gen 16S rRNA.

IV.3.9. Identificación y cuantificación de protistas

Los protistas son organismos eucariotas, principalmente unicelulares, cuyas células tienen un núcleo definido, lo cual los diferencia de las bacterias. El

núcleo tiene una doble membrana celular que separa los cromosomas del resto del citoplasma.

El recuento e identificación de estos microorganismos se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, por la Dra. Blanca Pérez Uz.

IV.3.9.1. Recuento de protistas en el fango activo

El protocolo experimental seguido fue el siguiente:

1. Toma de muestras.

Para estos análisis se tomaron muestras de 20 mL del licor de mezcla de los SBR en funcionamiento. Tras su recolección se conservaron en una disolución acidificada de Lugol al 20% (v/v), para fijar las especies de la biomasa activa. Cabe destacar que esta concentración fue excepcionalmente elevada (habitual 2%) debido a que el Lugol se fija a la materia orgánica, la cual estaba presente en gran cantidad en las muestras tratadas. Por ello, se probaron concentraciones del 10%, 15% y 20% de Lugol y se seleccionó la concentración adecuada para obtener la fijación de los protistas. Las muestras fijadas se conservaron a 4°C y preservadas de la luz, hasta su recuento.

2. Preparación de la muestra.

Los recuentos se realizaron sobre alícuotas de 1 mL de las muestras fijadas, en cámaras de recuento Sedgewick-Rafter, similares a las que se muestran en la Figura IV.22. En las muestras en las que el número de organismos fue muy elevado, se disminuyó el volumen de análisis a 25 µL. En estos casos se utilizaron portaobjetos de vidrio y cubreobjetos de 22x22, que se sellaron a la placa con vaselina para configurar una cámara de recuento más pequeña y evitar la evaporación de la muestra.



Figura IV.22. Cámaras de recuento Sedgewick-Rafter.

3. *Recuento.*

El conteo se realizó utilizando un microscopio OLYMPUS BX 50 y objetivos de contraste de fase x10 y x40. Para cada una de las muestras se realizó el procedimiento de recuento por triplicado. Teniendo en cuenta el volumen de muestra utilizada y la dilución debida a la adición del Lugol, se obtuvo el valor medio de la cantidad de protistas en cada una de las muestras analizadas. Los datos se presentaron como número de células por mL de licor de mezcla ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$).

IV.3.9.2. Aislamiento e identificación de los protistas

Para estos ensayos se utilizaron muestras en vivo (no fijadas), llevando a cabo la observación directa del licor de mezcla. Por otro lado se utilizaron medios de cultivos preparados con NaCl hasta la conductividad de las muestras, en los que se inoculó la muestra original y se añadió trigo para promover el crecimiento bacteriano.

La identificación de las especies se llevó a cabo a partir de la observación directa del licor de mezcla y de los medios de cultivo, así como a través de la evaluación de las estructuras ciliares e infraciliares en células teñidas, realizada tras aplicar el protocolo de tinción con plata de Fernández-Galiano [28]. En la aplicación de este método se siguieron los siguientes pasos:

1. Toma de muestras.

Se recolectaron ciliados con micropipeta directamente del licor de mezcla o de los cultivos preparados previamente. Estos se depositaron en un volumen de 0,5 mL del mismo agua residual (filtrada a 0,2 μm), que se depositó en un portaobjetos excavado como al que se muestra en la Figura IV.23.



Figura IV.23. Portaobjetos con cavidad cóncava excavada.

2. Fijación y tinción.

Se añadieron 2 gotas de formol comercial al 37% a los ciliados así preparados y se agitó para mezclar bien con la muestra. Pasados unos tres minutos las células quedaron fijadas, procediendo al lavado de las mismas con agua destilada (lavado por triplicado). El volumen final se redujo a una

gota, con cuidado de no eliminar ciliados durante este paso. Posteriormente se aplicó la tinción con el método desarrollado por Fernández-Galiano [28] modificado para pequeños volúmenes, utilizando 1 mL de la mezcla de tinción preparada en el mismo momento (15 mL de agua destilada, 3 gotas de formol comercial 37%, 6 gotas de piridina, 25 gotas de una solución de proteasa peptona al 4 % y 1-2 mL de carbonato de plata de Río-Hortega) que se añadió sobre los ciliados fijados. El portaobjetos se introdujo en un baño de agua precalentado a 65°C hasta que se apreció el cambio de coloración de la muestra hacia tonos marrón-dorado. Se sacó del baño y se dejó enfriar.

3. *Identificación.*

Las células teñidas se recogieron con la ayuda de una micropipeta, se depositaron sobre un portaobjetos con un cubre encima y se observaron a través de un microscopio NIKON ECLIPSE 80i equipado con objetivos de campo claro 100x y 40x, tomando las fotografías con una cámara DS-Fi2 acoplada al microscopio. A partir de las fotografías tomadas se pudo evaluar la estructura de las especies encontradas y proceder a su identificación.

IV.3.10. Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total (TAA: total antioxidant activity) se determinó mediante una versión modificada del ensayo ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) llevado a cabo por Re et al. [29], utilizada por Cassano et al. [30] para aguas residuales de la producción de aceite de oliva. En este método se midió la TAA de una muestra en comparación a la de un estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxílico).

El catión radical ABTS se generó por reacción con persulfato de potasio, dando lugar a una disolución verde-azul. Al añadir la sustancia antioxidante se produjo

un descenso en la coloración, debido a la disminución en la concentración del radical, que se midió a través de la absorbancia a 734 nm. Se realizó una recta de calibrado que relacionó los valores de absorbancia medidos con concentraciones conocidas de Trolox (rango entre 0 y 25 mM). Los resultados para las muestras analizadas se expresaron como mM Trolox equivalente.

La metodología empleada fue la siguiente:

- El catión radical ABTS se obtuvo con la siguiente reacción; 10 ml de la disolución de ABTS (2 mM) con 100 μ l de disolución de persulfato de potasio (70 mM). La mezcla se dejó en oscuridad durante 12 h.
- La disolución de trabajo fue la siguiente: 1 ml del catión radical ABTS y 24 ml de una solución tampón de PBS (5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaH_2PO_4 , NaCl 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 6.8), hasta conseguir una absorbancia final a 734 nm de $0,70 \pm 0,02$.
- Posteriormente se añadieron 10 ml de la solución de trabajo y 10 ml de la muestra (estándar para obtener la recta de calibrado o muestra a analizar). Se registraron las absorbancias en intervalos de 1 min, para un total de 6 min.
- La TAA se obtuvo a partir del último valor registrado y de la recta de calibrado del Trolox.

Cabe decir que la determinación de la TAA sólo se realizó durante la puesta en marcha de los SBR, calculando este parámetro para la FTOP utilizada como alimento y para los efluentes depurados. El objetivo de estos análisis fue relacionar los resultados con la concentración de compuestos fenólicos. Dado que en paralelo se utilizó la determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y constatando que los resultados obtenidos con éste último eran más fiables y presentaban una mayor repetibilidad, se decidió abandonar la determinación de la TAA.

IV.3.11. Fenoles totales

Para la determinación de los fenoles totales en las FTOP y efluentes, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a la metodología utilizada por Singleton et al. [31]. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, que forma complejos con los compuestos fenólicos. La transferencia de electrones a pH básico reduce estos complejos en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), que tienen un color azul intenso que presenta su máxima absorbancia a 765 nm. Dado que la intensidad de esta coloración está en función de los grupos hidroxilo, potencialmente oxidables, es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos.

La metodología empleada fue la siguiente:

- Añadir en un recipiente 0,2 mL de muestra, 6,8 mL de agua destilada y 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Agitar en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos.
- Añadir 1 mL de solución del $CaCO_3$ al 20% (w/v), mezclar y dejar en oscuridad durante 1 h.
- Medir la absorbancia a 765 nm (A_{765}) e utilizar una recta de calibrado para calcular la concentración de fenoles totales.

Recta de Calibrado de Fenoles Totales

La recta de calibrada utilizada fue obtenida a partir de tirosol, por lo que los resultados para las muestras analizadas se presentaron como $mg\ TY \cdot L^{-1}$ equivalentes. Otros autores han utilizado ácido gálico [30,32] o el ácido caféico [33,34], en la determinación de los fenoles totales para aguas residuales de la producción de aceite. Para agua residual de la producción de aceitunas de mesa, excluyendo el agua de la etapa de fermentación, se utilizó también el ácido

gálico en varios trabajos [35,36]. Sin embargo, puesto que en las FTOP (tal como se ha comentado en la introducción) los compuestos fenólicos mayoritarios son el hidroxitirosol y el tirosol, se decidió utilizar alguno de estos dos como estándar. Finalmente se optó por el tirosol, al igual que hizo El-Abbassi et al. [37], por presentar una mayor estabilidad química. El rango de concentraciones utilizado estuvo entre 0 y 1000 mg·L⁻¹ y en la Figura IV.24 se observa la coloración de estas muestras estándar.



Figura IV.24. Patrones para recta de calibrado de tirosol.

Con estos patrones se calculó la recta que se presenta en la Eq.(IV.6), para la que se obtuvo un error cuadrático de 0,996.

$$\text{Fenoles Totales} = 558.96 \cdot A_{765} \quad \text{Eq.(IV.6)}$$

IV.3.12. Perfil fenólico: análisis HPLC

El análisis cromatográfico de las FTOP y efluentes tuvo una doble función. Por una parte permitió caracterizar los compuestos fenólicos presentes en las

muestras de FTOP utilizadas y por otra, permitió observar las modificaciones del perfil fenólico en función del tratamiento aplicado.

La cromatografía líquida de alta eficiencia consigue separar los componentes de una mezcla, gracias a las columnas cromatográficas. Estas columnas están formadas por una fase fija, que puede ser líquida o sólida, en las que se introduce a alta presión una fase móvil, constituida por un disolvente o mezcla de disolventes. La muestra a analizar, formada por una mezcla de analitos, se introduce en la columna con la fase móvil. Cada analito tiene una velocidad de avance a través de la columna en función de la afinidad física y/o química con cada una de las fases mencionadas, de forma que se detectan en la unidad de detección del HPLC a diferentes tiempos de retención. Los dos HPLC utilizados en este trabajo tienen detectores de absorción ultravioleta/visible, que pueden trabajar en todo el rango de longitudes de onda (λ) gracias a la incorporación del PDA (Photodiode Array). Los compuestos fenólicos estudiados presentan su máxima λ entre 218 nm y 322 nm.

Para los dos HPLC utilizados, hay una parte de la metodología que fue común a ambos equipos, correspondiente al análisis de los datos y preparación de las muestras. El método cromatográfico (flujo y gradiente de concentraciones de las fases móviles) utilizado en cada HPLC fue distinto.

Análisis de los datos obtenidos

Para caracterizar el perfil fenólico de las FTOP utilizadas en el periodo experimental, se compararon los picos obtenidos en los cromatogramas de varias FTOP con los picos de 16 compuestos fenólicos patrón (seleccionados a partir la bibliografía consultada). El desarrollo de este trabajo, junto al de ajuste del método cromatográfico, se realizó con el HPLC del IAM (ver sección IV.2.4).

Varios de los analitos-patrón fueron detectados en las muestras de FTOP analizadas. Para confirmar su presencia, Nuria Cabedo (Técnico del IAM)

analizó algunas de estas muestras en un espectrómetro de masas (HPLC-MS) que posee el mismo departamento. Todos los ensayos realizados confirmaron que los únicos compuestos fenólicos presentes en todas las FTOP fueron el tirosol y el hidroxitirosol, siendo el hidroxitirosol el que se encontró en mayor concentración. Otros como el ácido gálico, la catequina...sólo se encontraron en algunas de las muestras, por lo que se decidió llevar a cabo únicamente el seguimiento del tirosol y el hidroxitirosol.

Esta composición observada concuerda con lo expuesto en la Introducción, donde se expone que la presencia de hidroxitirosol se explica por la hidrólisis ácida y enzimática de la oleuropeína y la del tirosol por la hidrólisis de ligustrósido [38], que son los principales compuestos fenólicos en las aceitunas. La presencia de otros fenoles dependen principalmente del tipo de aceituna, del estado de maduración de la misma [39] y de la duración de las etapas de cocido y fermentación [40].

El hidroxitirosol y el tirosol presentaron un máximo a una absorbancia de 280 nm y 275 nm, respectivamente. El tiempo de retención (t_R), sin embargo, fue diferente para cada HPLC utilizado, debido a que los volúmenes muertos de cada equipo y las columnas fueron diferentes. En la Tabla IV.7 se presentan los valores de t_R para cada uno de ellos.

Tabla IV.7. Tiempo de retención del tirosol e hidroxitirosol en los HPLC utilizados.

	Compuesto	t_R (min)
HPLC (IAM)	HTY	4,8
	TY	5,7
HPLC (ISIRYM)	HTY	6,9
	TY	9,4

Se utilizó un patrón interno para garantizar una cuantificación más precisa, ya que el uso de patrones internos genera una relación directa con el analito, de forma que se eliminan los errores debidos a pérdida de muestra o al efecto de

matriz, que son muy comunes. Se eligió la Hidroquinona (HQ) por presentar la máxima intensidad de su pico a 275 nm con un t_R muy bajo (2,1 y 3,9 min en el HPLC del IAM y del ISIRYM, respectivamente), que no coincidía ni interfería con ninguno de los compuestos fenólicos de las FTOP. En la Figura IV.25 se presenta un ejemplo de cromatograma típico de una FTOP, donde se pueden observar la HQ, el hidroxitirosol y el tirosol, junto con otros picos no identificados.

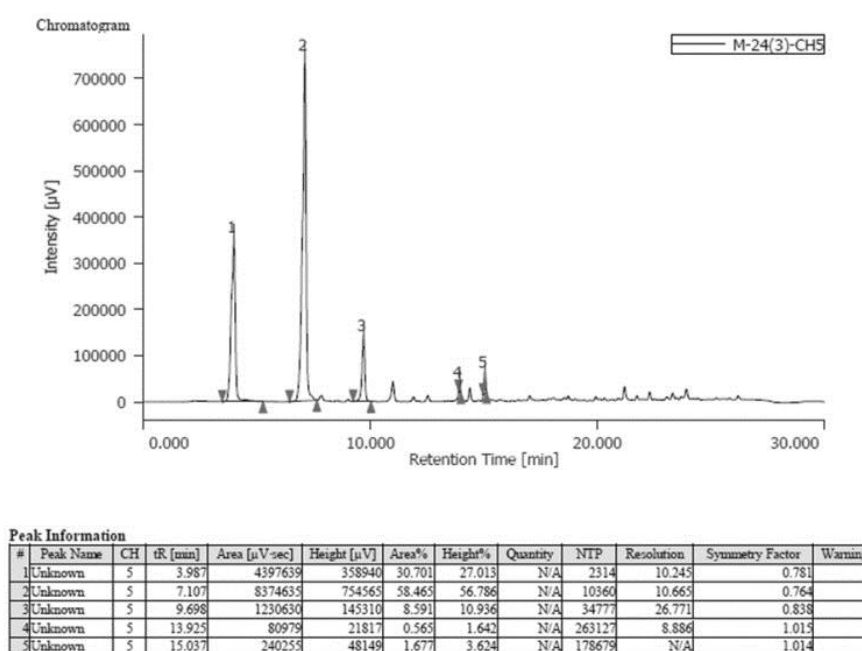


Figura IV.25. Cromatograma tipo para una FTOP con el HPLC (JASCO). Identificación de picos; (1 y 5) Hidroquinona, (2) Hidroxitirosol, (3) Tirosol.

La concentración de hidroxitirosol y tirosol en cada muestra se obtuvo a partir del área encerrada bajo la curva del pico representativo de cada fenol y la línea base (proporcionada por el software integrado en cada uno de los equipos), y de

las rectas de calibrado, calculadas conforme al método que se explica a continuación.

Preparación de las muestras y obtención de las rectas de calibrado

Debido a la elevada salinidad de las FTOP y de los efluentes, fue necesario llevar a cabo una extracción líquido-líquido, para separar los compuestos fenólicos de su matriz salina antes de su análisis cromatográfico. El método utilizado fue el empleado por El-Abbasi et al. [37], el cual se detalla de forma esquemática en la Figura IV.26. La metodología seguida fue la siguiente:

- Se acidificó a pH 2 (HCl 6N) un volumen de muestra de 20 mL. Posteriormente se filtró a 40 μ m para eliminar el precipitado formado.
- Se tomaron 10 mL de la muestra acidificada y se añadieron 10 mL de Hexano. Esta mezcla se agitó con la ayuda de ultrasonidos durante 4 minutos. Posteriormente se vertió en un embudo de decantación.
- Una vez separadas las fases (disolvente en la parte superior) se recuperó la muestra y se desechó el disolvente, donde quedaron retenidos los lípidos (pueden interferir en el análisis posterior). Se realizó el lavado con Hexano por duplicado.
- A la fracción de muestra sin lípidos se le añadieron 10 mL de acetato de etilo y se agitó (ultrasonidos) durante 4 minutos. Debido a la formación de una emulsión, fue necesario centrifugar la muestra + disolvente en viales de vidrio, a 4000 rpm durante 4 min. Los compuestos fenólicos, que quedan retenidos en el acetato de etilo (fase superior), se recuperaron con una pipeta Pasteur y se depositaron en un matraz de vidrio de tipo balón. Para cada muestra se realizaron tres extracciones.

- El acetato de etilo eliminó utilizando un rotavapor, para conseguir su evaporación a baja temperatura (40°C).
- Por último se pesó el residuo seco.
- Las muestras se prepararon para tener una concentración de $7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de muestra. Para ello se disolvió el residuo seco en una disolución de metanol que contenía el patrón interno en una concentración de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HQ, llamada MeHQ. Finalmente se filtraron a $0,22 \mu\text{m}$ (filtros de jeringa de teflón) y se guardaron a -20°C hasta su uso. Cada muestra se preparó por triplicado.

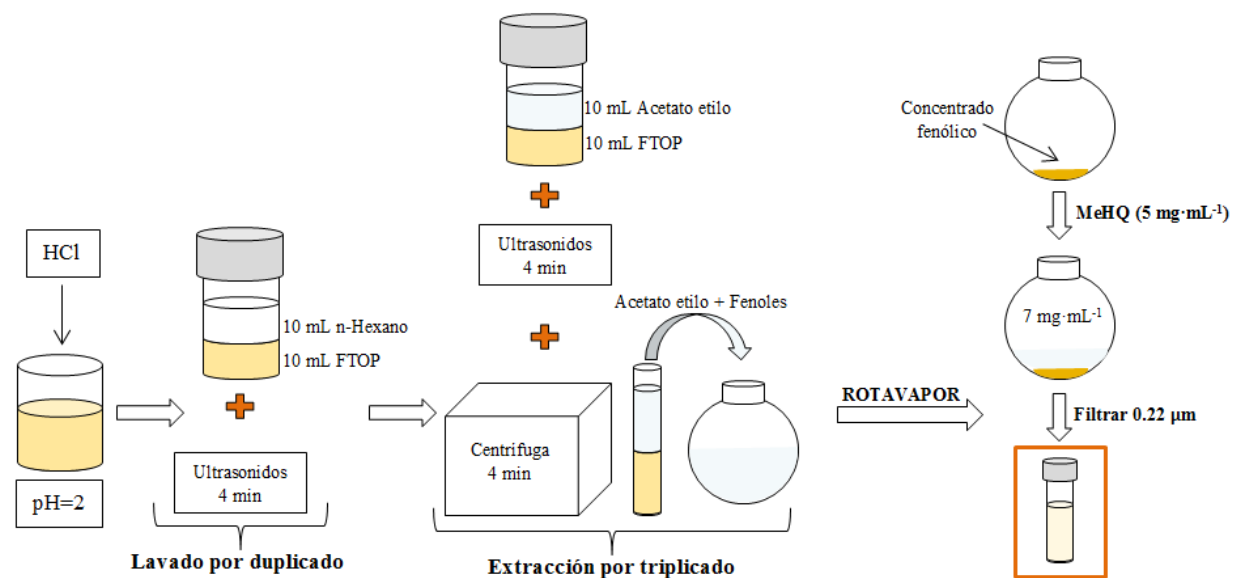


Figura IV.26. Esquema de preparación de muestras para análisis en HPLC.

Rectas de Calibrado

Las rectas de calibrado obtenidas para el hidroxitirosol y el tirosol permitieron relacionar el área de los picos de cada compuesto con sus concentraciones.

Estas rectas tienen la siguiente estructura general:

$$\frac{A_{Ph}}{A_{HQ}} = x \cdot \frac{C_{Ph}}{C_{HQ}} + n \quad \text{Eq.(IV.7)}$$

donde C_{HQ} y C_{Ph} fueron las concentraciones de hidroquinona ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y del fenol analizado, A_{HQ} y A_{Ph} fueron las áreas proporcionadas por el equipo y los parámetros “x” y “n” fueron la pendiente y ordenada en el origen de la recta de ajuste, respectivamente.

Recta de calibrado del Tirosol

Para el tirosol se prepararon cinco patrones en concentraciones que variaron entre 0 y $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Con los datos obtenidos se obtuvieron las rectas de calibrado para cada HPLC, ambas con un R^2 de 0,9999.

$$C_{TY} (\text{MILFORD}) = \frac{0.5}{0,6755} \cdot \left(\frac{A_{TY}}{A_{HQ}} - 0,0044 \right) \quad \text{Eq.(IV.8)}$$

$$C_{TY} (\text{JASCO}) = \frac{0.5}{0,9988} \cdot \left(\frac{A_{TY}}{A_{HQ}} - 0,0069 \right) \quad \text{Eq.(IV.9)}$$

Recta de calibrado del Hidroxitirosol

Para el hidroxitirosol se prepararon también cinco patrones, en este caso en concentraciones entre 0 y 2,0 mg·mL⁻¹. Operando del mismo modo se obtuvieron las rectas para cada HPLC, con un R² de 0,9975 para el HPLC de MILFORD y de 0,9991 para el de JASCO.

$$C_{\text{HTY}} (\text{MILFORD}) = \frac{\text{HQ}}{0,6086} \cdot \left(\frac{A_{\text{HTY}}}{A_{\text{HQ}}} - 0,0965 \right) \quad \text{Eq.(IV.10)}$$

$$C_{\text{HTY}} (\text{JASCO}) = \frac{\text{HQ}}{1,5095} \cdot \left(\frac{A_{\text{HTY}}}{A_{\text{HQ}}} + 0,1013 \right) \quad \text{Eq.(IV.11)}$$

Método Cromatográfico

La bibliografía consultada para la identificación de compuestos fenólicos similares a los presentes en las FTOP [41,42], proporcionó una primera aproximación para tener un punto de partida en la obtención de los métodos cromatográficos necesarios. Tras los ajustes pertinentes en el flujo de muestra inyectada y gradiente de las fases móviles, se obtuvieron los métodos para cada uno de los HPLC utilizados.

Con los métodos que se presentan a continuación, se consiguió una buena separación y definición de los picos.

UPLC-PDA de MILFORD (IAM)

Columna:	C18 de Waters BEH (2.1×100 mm, 1.7 μm)
Flujo:	0,4 mL·min ⁻¹
Vol. inyección:	5 μL
Fase móvil:	A = Acetonitrilo + 1% ácido fórmico B = Agua + 1% ácido fórmico
Gradiente:	100% B desde 0 a 1 min, aumentar hasta el 55% A en el min 25, después aumentar al 100% A y mantener 5 min (hasta el min 30), por último volver al 100% B en 2 min, manteniendo esta concentración durante 3 min.

HPLC de JASCO (ISIRYM)

Columna:	Phenomenex Kinetex 5u Biphenyl 100A (4,6 x 250 mm, 5 μm)
Flujo:	1,5 mL·min ⁻¹
Vol. inyección:	10 μL
Fase móvil:	A = Agua + 1% ácido acético B = Metanol + 1% ácido acético
Gradiente:	5% B desde 0 a 1 min, aumentar hasta el 80% B en el min 25, por último volver al 5% B en 2 min (hasta min 27), manteniendo esta concentración durante 3 min.

IV.3.13. Respirometría

Existen diferentes técnicas para determinar la biomasa, que incluyen métodos directos y métodos indirectos, como los que se pueden observar en la Tabla IV.8.

Tabla IV.8. Técnicas para determinar la biomasa.

Métodos directos	
Métodos gravimétricos	
Métodos espectrofotométricos	
Métodos microscópicos de recuento celular	
Microscopía de epifluorescencia	DAPI, Naranja de acridina...
	CTF, SFDA
	FISH
Métodos indirectos	
Métodos físico-químicos: COT, DQO	
Componentes celulares	Proteínas, polisacáridos, ATP...
Métodos Bioquímicos	Actividad esterasa
	Actividad deshidrogenasa
Métodos cinéticos	Tasa de respiración
	Tasa de desaparición de sustrato

En el trabajo desarrollado se aplicaron varias de estas técnicas, en concreto los métodos gravimétricos (sección IV.3.6), métodos físico-químicos (sección IV.3.1) y la microscopía de epifluorescencia con la técnica FISH (sección IV.3.8.1). Además, en una parte de los estudios también se utilizaron métodos cinéticos, con la ayuda del equipo respirométrico BM-Advance. Los parámetros que se determinaron fueron los siguientes:

- La tasa de consumo de oxígeno en el licor de mezcla (OUR), que se midió en $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

- La tasa específica de consumo de oxígeno en el licor de mezcla (SOUR), que se midió en $\text{mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- El coeficiente del rendimiento de producción de la biomasa heterótrofa (Y_H), que relaciona la materia celular producida en función de la materia orgánica degradada y que se midió como $\text{g DQO celular} \cdot \text{g DQO}^{-1}$.

Todos los ensayos se realizaron en condiciones de respiración endógena y en ausencia de nitrificación. La respiración endógena se alcanza cuando los microorganismos han consumido toda la DQO biodegradable presente en el LM, de forma que el consumo de oxígeno que realizan a partir de ese momento se emplea para auto-oxidarse a sí mismos. Para asegurar que no hay consumo de oxígeno debido a la nitrificación, se utilizó Alil Tiourea (ATU) para inhibir la biomasa autótrofa y asegurar con ello que la tasa de respiración únicamente se debió a la respiración endógena.

Cuando la temperatura y la cantidad de microorganismos es constante la respiración endógena también lo es [43], por lo que es posible calcular el OUR de forma experimental mediante un ensayo de tipo estático. En este tipo de ensayo se interrumpe el suministro de oxígeno al LM durante unos minutos y se registra el oxígeno disuelto (OD). El balance de masas del OD, en estas condiciones, cumple la siguiente relación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -OUR \quad \text{Eq.(IV.12)}$$

donde C_{O_2} es la concentración de OD en el licor de mezcla.

Por lo tanto, la variación del OD con el tiempo corresponde a una recta con pendiente negativa cuyo valor es el OUR. La metodología experimental seguida en los ensayos para obtener el OUR fue la siguiente:

- Se tomó un litro de LM al final del ciclo de reacción (para asegurar la máxima biodegradación del sustrato) y se mantuvo en aireación prolongada durante varias horas.
- Se fijó la temperatura en el equipo (correspondiente a la T^a de trabajo de los SBR) y se introdujo el LM en la vasija de reacción, manteniendo constantes la agitación y la aireación ($1,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$).
- Se añadió ATU en una cantidad de 2 mg por cada gramo de SSVLM, como mínimo 20 minutos antes de comenzar el ensayo.
- Se estimó que las condiciones fueron endógenas cuando el OD fue constante durante unos 10 minutos. A partir de ese momento comenzó el ensayo.
- Se interrumpió la aireación y se registró la disminución del OD. El equipo presenta los datos de OD en función del tiempo (Figura IV.27) y calcula el valor del OUR. Este valor también se puede calcular de forma manual, ajustando a una recta los datos del OD y del tiempo obtenidos para cada ensayo realizado.

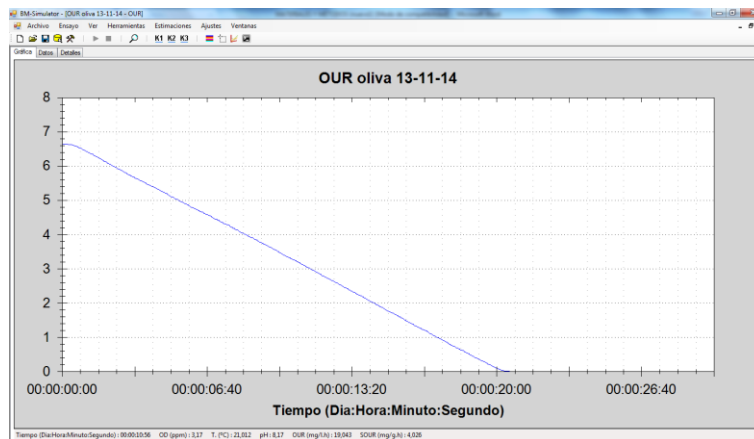


Figura IV.27. Representación gráfica del OUR para una FTOP, en la cual el eje de ordenadas representa el OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Dado que el OUR depende de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra en el momento del ensayo, es más habitual utilizar el SOUR para comparar resultados. El SOUR se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{SOUR} = \frac{\text{OUR}}{\text{SSVLM}} \quad \text{Eq.(IV.13)}$$

El SOUR está relacionado con la actividad metabólica de las células [44], de forma que para una misma agua residual, un aumento progresivo de este parámetro indica un aumento en la actividad biológica y viceversa.

El parámetro Y_H está asociado a la producción de fango debido al crecimiento de los microorganismos. La Y_H se puede calcular a partir de datos respirométricos [45,46], obteniendo la cantidad de OD necesario para degradar una determinada concentración de materia orgánica y aplicando la siguiente ecuación:

$$Y_H = 1 - \frac{\text{OC}}{\text{DQO}_{\text{degradada}}} \quad \text{Eq.(IV.14)}$$

donde OC es la cantidad de oxígeno consumido durante la degradación ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), la cual se puede obtener a partir de un ensayo dinámico en el respirómetro.

La metodología experimental de este ensayo dinámico es la siguiente:

- Se partió de una muestra de un litro de LM en las mismas condiciones comentadas para la obtención del OUR (respiración endógena e inhibición de la biomasa autótrofa).
- Se añadieron 50 mL de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), por ser un sustrato muy biodegradable y comenzó el ensayo (aireación constante).

- El equipo muestra el OD consumido en cada momento del ensayo. A este parámetro se le denomina R_S ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y su representación gráfica se puede ver en la Figura IV.28.

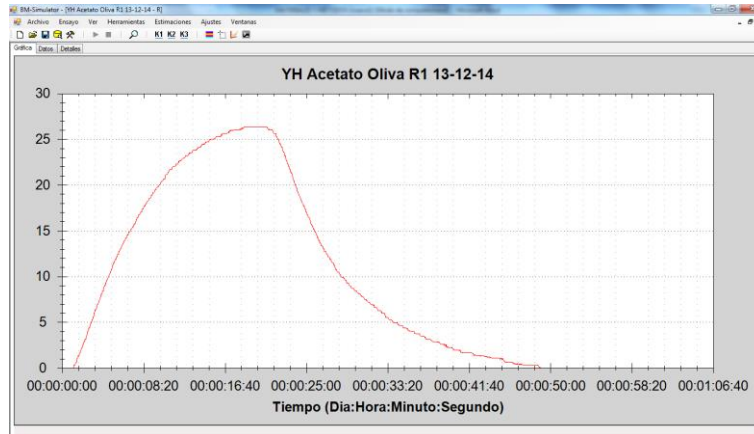


Figura IV.28. Representación gráfica de R_S para una FTOP.

- El ensayo finalizó cuando se alcanzaron de nuevo las condiciones endógenas, de forma que todo el sustrato fue consumido.
- El equipo calcula la integral bajo esta curva, cuyo valor corresponde a OC. Con el valor de OC, la DQO del acetato de sodio y la Eq.(IV.14) se obtuvo la Y_H .

IV.4. REACTIVOS

En primer lugar se describen los materiales que se utilizaron durante la parte experimental correspondiente a los pretratamientos de las FTOP. En la Tabla IV.9 se presentan los cuatro tipos de carbón activo en polvo utilizados en la adsorción de compuestos fenólicos, en la Tabla IV.10 las resinas usadas en la adsorción y posterior recuperación de los compuestos fenólicos presentes en las FTOP y por último, en la Tabla IV.11 se presenta la relación de coagulantes y floculantes usados.

Tabla IV.9. Carbón Activo en Polvo de CHIEMIVALL.

Carbón Activo	Características	pH
Clarimex 06 CAE	Madera de pino activado con H ₃ PO ₄ macroporos	2-4
Clarimex 06 GAE	Modificación del CAE	4,5-6,5
BM8	Bituminoso activado con vapor de agua micro-mesoporos	9-10
CCP80	Cáscara de coco activado con vapor de agua	9-11

Tabla IV.10. Resinas utilizadas en la Recuperación de Fenoles.

Resina	Características	
DOWEX MARATHON C	Intercambio catiónico fuerte	SIGMA
Amberlite XAD4		SIGMA
MN200	Polímero reticulado no iónico	PUROLITE
MN202		PUROLITE

Tabla IV.11. Coagulantes y Floculantes de DERYPOL.

Coagulantes		Características	
GT-25	Origen vegetal (Acacia)		
K-225	Sintético. Indicado para clarificador secundario		
HA-89	Sintético Aniónico.		
Floculantes	Características	Carácter Iónico	Peso Molecular
ZW-332	Anfótero	-	Alto
TG-325		Bajo	Muy alto
DR-3000	Catiónico	Medio	Alto
DF-100		Alto	Alto
GO-2030	Aniónico	Alto	Muy alto

En la Tabla IV.12 se listan el resto de reactivos utilizados en los ensayos o en la aplicación de los métodos analíticos descritos en la sección IV.3. Además, en esta tabla se han incluido los nutrientes aportados a las FTOP para el tratamiento biológico y las sustancias utilizadas para la preparación de un agua sintética salina, usada en la puesta en marcha del tratamiento biológico.

Tabla IV.12. Reactivos utilizados en la experimentación

Reactivo	Fórmula	Estado	Proveedor	
Ajuste de pH (pretratamientos)				
Hidróxido Sódico	NaOH	Líquido	40%	PANREAC
Ácido Clorhídrico	HCl	Líquido	6N	PANREAC

Reactivo	Fórmula	Estado		Proveedor
Capacidad antioxidante total (sección IV.3.10)				
Persulfato de Potasio	$K_2S_2O_8$	Polvo	99%	PANREAC
ABTS		Polvo		SIGMA
di-Sodio Hidrógeno Fosfato	Na_2HPO_4	Polvo	98%	PANREAC
Sodio Hidrógeno Fosfato	NaH_2PO_4	Polvo	99%	PANREAC
Fenoles totales (sección IV.3.11)				
Reactivo Folin-Ciocalteu		Líquido		PANREAC
Carbonato de Sodio	Na_2CO_3	Polvo	99%	PANREAC
Extracción líquido-líquido (sección IV.3.12)				
Hexano	C_6H_{14}	Líquido	HPLC	VWR
Acetato de Etilo	$C_4H_8O_2$	Líquido	HPLC	VWR
Metanol	CH_3OH	Líquido	HPLC	VWR
Patrones HPLC (sección IV.3.12)				
Ácido Cafeico	$C_9H_8O_4$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido Protocatecuico	$C_7H_6O_4$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido Fenilacético	$C_8H_8O_2$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido benzoico	$C_7H_6O_2$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido p-cumárico	$C_9H_8O_3$	Polvo	Patrón	SIGMA
Resorcinol	$C_6H_4(OH)_2$	Polvo	Patrón	SIGMA
Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	Polvo	Patrón	SIGMA
Tirosol	$C_8H_{10}O_2$	Polvo	Patrón	SIGMA
Hidroxitirosol	$C_8H_{10}O_3$	Polvo	Patrón	SIGMA
Hidroxitirosol Acetato	$C_{10}H_{12}O_4$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido Gálico	$C_7H_6O_5$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido Siríngico	$C_9H_{10}O_5$	Polvo	Patrón	SIGMA
Ácido Vanílico	$C_8H_8O_4$	Polvo	Patrón	SIGMA
Oleuropeína	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Polvo	Patrón	SIGMA
Hidroquinona	$C_6H_6O_2$	Polvo	Patrón	SIGMA

Reactivo	Fórmula	Estado		Proveedor
Nutrientes para la FTOP (tratamiento biológico)				
Fosfato Dipotásico	K ₂ HPO ₄	Polvo	98%	PANREAC
Urea	NH ₂ CONH ₂	Polvo	99%	PANREAC
Agua salina sintética (tratamiento biológico)				
Peptona de caseína		Polvo		PANREAC
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O	Polvo	98%	PANREAC
Fosfato Dipotásico	K ₂ HPO ₄	Polvo	98%	PANREAC
Cloruro de sodio	NaCl	Granulado		
Adsorción/Desorción de fenoles				
Hidróxido Sódico	NaOH	Pellets	98%	PANREAC
Etanol absoluto	CH ₃ CH ₂ OH	Líquido	99.5%	PANREAC

También se utilizaron reactivos, o mezclas de reactivos, suministrados directamente por los proveedores, tales como:

- Cubetas de reacción de HACH LANGE para la determinación de DQO, N_T, P_T y Cl⁻.
- Bacterias (*Vibrio fischeri*) y disolución ajustadora osmótica, suministrados por Microtox®.

En la aplicación de la técnica FISH fueron necesarias una gran cantidad de reactivos y disoluciones (sección IV.3.8), que se detallan a continuación por separado:

- *Paraformaldehído para fijación*: Calentar 65 ml de agua bidestilada hasta 60°C y añadir 4 g de paraformaldehído y 1 gota de una solución de NaOH 2M y agitar. Retirar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X,

ajustando el pH a 7,2 con HCl. Filtrar a 0,2 μm y enfriar rápidamente a 4°C, conservando a esta temperatura.

- PBS 3X (pH=7,4); 22,8 g de NaCl, 3 g NaH_2PO_4 , 2,88 g Na_2HPO_4 y 1000 mL de agua destilada. Filtrar a 0,45 μm y conservar a 4°C.
- Etanol 100%; etanol absoluto grado PRS de SIGMA.
- Etanol 80%; 400 ml de etanol + 100 mL de agua destilada.
- Etanol 50%; 250 ml de etanol + 250 mL de agua destilada.
- *Solución de gelatina (preparación portaobjetos)*: Fundir la gelatina (0,1% gelatina + 0,01% $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) con 100 mL de agua destilada calentada a 60°C. Enfriar a 50°C para sumergir los porta.
- *Tampón de hibridación y Solución de lavado*: En la Tabla IV.13 se detalla la composición conforme al porcentaje de FA necesario para cada sonda (especificado en la Tabla IV.6).

Tabla IV.13. Preparación del tampón de hibridación y de la solución de lavado según el porcentaje de formamida (FA).

Reactivo	Tampón Hibridación		Solución de lavado	
	25% FA	35% FA	25% FA	35% FA
NaCl 5M	360 μL	360 μL	1490 μL	700 μL
HCl-Tris 1M	40 μL	40 μL	1000 μL	1000 μL
Agua Mili-Q	1098 μL	898 μL	47.94 mL	47.75 mL
SDS 10%	2 μL	2 μL	50 μL	50 μL
FA	500 μL	700 μL	-	-
EDTA 0.5M	-	-	500 μL	500 μL

Las disoluciones que se encuentran en esta tabla se prepararon de la siguiente forma:

- NaCl 5M; 292,2 g de NaCl + 1000 mL de agua destilada.
- EDTA 0,5M; 186,1 g de EDTA + 1000 mL de agua destilada. Se ajustó a pH 8 con NaOH.
- Tris-HCl 1M (pH 8,0); 121,1 g de Tris Base + 42 mL de HCl + 1000 mL de agua destilada.
- Sodio dodecil sulfato (SDS) 10%; 10 g SDS + 100 mL de agua destilada.

Todas estas disoluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se filtraron a 0,45 µm antes de su uso.

Por último se detalla la preparación del Lugol, utilizado para la fijación de protistas para su posterior recuento (sección IV.3.9):

- Mezclar KI (10 g al 1%) y I₂ (5 g al 0,5%) en 1 L de agua destilada caliente hasta disolución completa.
- Añadir 100 mL de ácido acético.

IV.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ASTM International, ASTM D2035-13. Standard Practice for Coagulation-Flocculation Jar Test of Water, West Conshohocken, PA. (2013).
- [2] International Organization for Standardization, Water quality - Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD), ISO 157052002. (2002).
- [3] International Organization for Standardization, Water quality - Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) - Small-scale sealed-tube method, ISO 60601989. (1989).
- [4] International Organization for Standardization, Water quality - Determination of nitrogen - Part 1 (ST-N) - Small-scale sealed-tube method, ISO 11905-11997. (1997).
- [5] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, DC, Cyanide, APHA 4500-CI-. (1999).
- [6] A. De Castro, M. Brenes, Fermentation of washing waters of spanish-style green olive processing, *Process Biochem.* 36 (2001) 797–802. doi:10.1016/S0032-9592(00)00280-6.
- [7] K.A. Segovia-Bravo, M. Jarén-Galán, P. García-García, A. Garrido-Fernández, Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts, *Food Chem.* 123 (2010) 741–746. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.044.
- [8] K.A. Segovia-Bravo, M. Jarén-Galán, P. Garcia-Garcia, A. Garrido-Fernández, Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved, *Food Chem.* 114 (2009) 1380–1385. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.017.
- [9] S. Sayadi, N. Allouche, M. Jaoua, F. Aloui, Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, *Process Biochem.* 35 (2000) 725–735. doi:10.1016/S0032-9592(99)00134-X.
- [10] M. Brenes Balbuena, P. Garcia-Garcia, A. Garrido-Fernandez, Regeneration of Spanish Style Green Table Olive Brines by Ultrafiltration, *J. Food Sci.* 53 (1988) 1733–1766.
- [11] E. Döepkens, R. Jonas, T. Jung, R. Krull, Rückführung von Abwasserteilströmen der Textilveredlung in den Produktionsprozess, GVC (Hrsg.), *Prepr. Colloq. Produktionsintegrierter Wasser Abwassertechnik, "Nachhaltige Prod. Der Textilveredlung" Und "Membrantechnik"*. Bremen. (2001) B143–B15.
- [12] APHA AWWA WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. ed. American Public Health Association, Washington, DC, (2005).

- [13] Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium 1, Annu. B. ASTM Stand. (1995) D-5660-95. doi:10.1520/D5660-96R09.2.
- [14] P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings, Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics., Microbiol. Rev. 60 (1996) 407-438.
- [15] C.R. Woese, G.E. Fox, L. Zablen, T. Uchida, L. Bonen, K. Pechman, et al., Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA, Nature. 254 (1975) 83-86. doi:10.1038/254083a0.
- [16] R.R. De La Haba, C. Sánchez-Porro, M.C. Márquez, A. Ventosa, Taxonomic study of the genus *Salinicola*: Transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60 (2010) 963-971. doi:10.1099/ijs.0.014480-0.
- [17] X. Zhang, J. Gao, F. Zhao, Y. Zhao, Z. Li, Characterization of a salt-tolerant bacterium *Bacillus* sp. from a membrane bioreactor for saline wastewater treatment, J. Environ. Sci. 26 (2014) 1369-1374. doi:10.1016/S1001-0742(13)60613-0.
- [18] J. Alonso-Molina, J.J. Morenilla, I. Bernácer, R.M. Lloret, G. Cuesta, G.W. Ramírez, Manual de técnicas avanzadas para la identificación y control de bacterias filamentosas, 1ª Ed, 2009.
- [19] A. Loy, M. Horn, M. Wagner, ProbeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 514-516.
- [20] W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, K.H. Schleifer, Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions, Syst. Appl. Microbiol. 15 (1992) 593-600.
- [21] R.I. Amann, B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, S. D.A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, Appl. Environ. Microbiol. 56 (1990) 1919-1925.
- [22] L. Borrás, Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. (2008)., 2008.
- [23] D. Chèneby, L. Philippot, A. Hartmann, C. Hénault, J. Germon, 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils, FEMS Microbiol. Ecol. 34 (2000) 121-128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102689>.

- [24] G.C.Y. Wang, Y. Wang, The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species, *Microbiology*. 142 (1996) 1107–1114. doi:10.1099/13500872-142-5-1107.
- [25] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. Last access date; September, (2014).
- [26] <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>. Last access date; September, (2014).
- [27] O.S. Kim, Y.J. Cho, K. Lee, S.H. Yoon, M. Kim, H. Na, et al., Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2012) 716–721.
- [28] D. Fernandez-Galiano, Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 95 (1976) 557–560.
- [29] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [30] A. Cassano, C. Conidi, E. Drioli, Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment, *Water Res.* 45 (2011) 3197–3204. doi:10.1016/j.watres.2011.03.041.
- [31] V. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 152–178.
- [32] D.P. Zagklis, A.I. Vavouraki, M.E. Kornaros, C.A. Paraskeva, Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption, *J. Hazard. Mater.* 285 (2015) 69–76. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.11.038.
- [33] J. Beltran, T. Gonzalez, J. Garcia, Kinetics of the biodegradation of green table olive wastewaters by aerobic and anaerobic treatments, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 839–845. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.10.102.
- [34] T.I. Lafka, A.E. Lazou, V.J. Sinanoglou, E.S. Lazos, Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes, *Food Chem.* 125 (2011) 92–98. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.041.
- [35] M. Bouaziz, S. Lassoued, Z. Bouallagui, S. Smaoui, A. Gargoubi, A. Dhouib, et al., Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater, *Bioorganic Med. Chem.* 16 (2008) 9238–9246. doi:10.1016/j.bmc.2008.09.012.

-
- [36] M. Kotsou, A. Kyriacou, K. Lasaridi, G. Pilidis, Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater, *Process Biochem.* 39 (2004) 1653–1660. doi:10.1016/S0032-9592(03)00308-X.
- [37] A. El-Abbassi, M. Khayet, A. Hafidi, Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011) 4522–4530. doi:10.1016/j.watres.2011.05.044.
- [38] I. Fendri, M. Chamkha, M. Bouaziz, M. Labat, S. Sayadi, S. Abdelkafi, Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1–13. doi:10.1080/09593330.2012.689364.
- [39] C. Romero-Barranco, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido Fernández, Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001) 237–246. doi:10.1016/S0260-8774(00)00204-1.
- [40] M. Brenes, L. Rejano, P. Garcia, A. Sanchez, A. Garrido, Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2702–2706. doi:10.1021/jf00058a028.
- [41] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, T.S. Giannopoulos, G. a. Pilidis, Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 339–343. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.061.
- [42] N. Ben Othman, D. Roblain, N. Chammen, P. Thonart, M. Hamdi, Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives, *Food Chem.* 116 (2009) 662–669. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.084.
- [43] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V.E. Santos, J.C. Merchuk, Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 289–307. doi:10.1016/j.bej.2010.01.011.
- [44] F. Garcia-Ochoa, S. Escobar, E. Gomez, Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects, *Chem. Eng. Sci.* 122 (2015) 491–499. doi:10.1016/j.ces.2014.10.016.
- [45] M. Spérandio, P. Etienne, Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various S_0/X_0 ratios, *Water Res.* 34 (2000) 1233–1246. doi:10.1016/S0043-1354(99)00241-9.
- [46] J. Vollertsen, T. Hvitved-Jacobsen, Biodegradability of wastewater - A method for COD-fractionation, *Water Sci. Technol.* 45 (2002) 25–34.

CAPÍTULO V

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

V.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS FTOP	215
V.2. PRETRATAMIENTOS	215
V.2.1. Ajuste de pH.....	217
V.2.2. Coagulantes-Floculantes	218
V.2.3. Adsorción con carbón activo.....	219
V.2.4. Recuperación de compuestos fenólicos	222
V.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	230
V.3.1. Puesta en marcha.....	230
V.3.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos	234
V.3.2.1. <i>Concentración de nutrientes en las FTOP</i>	236
V.3.2.2. <i>Pretratamiento de las FTOP con carbón activo</i>	238
V.3.2.3. <i>Condiciones isotermas del licor de mezcla a 30°C</i>	241
V.3.3. Alternancia de fases anaerobias y fases aerobias	244
V.4. TRATAMIENTO Terciario: ULTRAFILTRACIÓN Y NANOFILTRACIÓN	247
V.5. BIBLIOGRAFÍA	251

A lo largo del capítulo de “Antecedentes” y “Estudios Previos” se ha hablado de las salmueras de fermentación y se han estudiado los tratamientos seleccionados para formar parte del sistema integral de depuración de las FTOP. La metodología experimental seguida en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estableció en base a los conocimientos adquiridos en estos estudios previos. Ello permitió abordar de una manera sistemática los ensayos a realizar, diferenciando aquellos aspectos determinantes para conseguir el éxito del tratamiento y desechando opciones no aptas para el tipo específico de agua a tratar.

En este capítulo se explica la metodología seguida durante el periodo experimental. Ésta se ha dividido en cuatro grandes bloques, cuyo contenido fundamental es el siguiente:

1. Caracterización de las FTOP. La obtención de datos en este bloque permitirá establecer el rango de variación de los parámetros seleccionados para caracterizar este tipo de aguas residuales. Los tratamientos planteados en los siguientes bloques tendrán validez dentro de estos rangos.
2. Pretratamientos. La metodología llevada a cabo deberá responder a dos finalidades: estudio de pretratamientos para reducir la contaminación inicial de las FTOP y estudio de pretratamientos para recuperar compuestos fenólicos. En cada caso se perseguirá la optimización del proceso estudiado.
3. Tratamiento biológico. El objetivo es desarrollar un tratamiento biológico capaz de reducir al máximo la DQO biodegradable. La metodología deberá incluir la puesta en marcha, el mantenimiento del tratamiento a lo largo del tiempo y el análisis de diferentes actuaciones sobre el sistema, con el fin de aumentar el rendimiento de eliminación de materia orgánica y reducir los costes del proceso.

4. Tratamiento terciario. Los ensayos realizados en este bloque deberán aportar los análisis necesarios para establecer la idoneidad de este tratamiento final. Las características del efluente final permitirán evaluar su posible reutilización.

V.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS FTOP

Las muestras de FTOP caracterizadas durante los ensayos sumaron un total de treinta y seis.

Los parámetros medidos fueron: pH, conductividad, turbidez, color, DQO soluble, cloruros, SS, SSV, concentración de fenoles totales y perfil fenólico. Todos estos análisis se realizaron conforme a los métodos analíticos descritos en el Capítulo IV. Las muestras se conservaron en nevera a 4°C hasta su utilización.

La nomenclatura utilizada en las publicaciones presentadas en el capítulo de “Resultados” y que también se ha usado en el desarrollo de la metodología experimental, no atiende a una numeración correlativa conforme a la recepción de las muestras. En cada una de estas publicaciones las FTOP se nombraron siempre desde el dígito 1 en adelante (FTOP-1, FTOP-2...), dado que estas investigaciones se presentaron como trabajos independientes unos de otros. Ello no debe llevar a confusión al lector de esta Tesis Doctoral, ya que en cada una de estas publicaciones se incluye una tabla con la caracterización de las FTOP usadas.

V.2. PRETRATAMIENTOS

Las técnicas seleccionadas como pretratamientos de las FTOP fueron cuatro. Las tres primeras tuvieron como finalidad principal disminuir la carga contaminante de las FTOP mediante la reducción de uno o varios de los siguientes parámetros: sólidos en suspensión, turbidez, DQO y concentración de compuestos fenólicos. La cuarta persiguió la recuperación de compuestos fenólicos, para su posterior valorización como sustancias antioxidantes naturales.

Los pretratamientos estudiados fueron:

- Ajuste de pH, con posterior sedimentación.
- Adición de coagulantes y floculantes, con y sin ajuste de pH, y posterior sedimentación.
- Adsorción con carbón activo en polvo (CAP).
- Adsorción con resinas poliméricas.

En los tres primeros ensayos se utilizaron varias FTOP, por lo que los resultados se valoraron en función de los porcentajes de eliminación de los parámetros comentados y no en base a sus valores absolutos. Con ello se obtuvieron las condiciones de operación óptimas para cada uno de los pretratamientos. Finalmente y con la intención de poder comparar las diferentes técnicas, se usó una misma FTOP para las condiciones óptimas establecidas.

En el caso de las resinas se utilizaron dos FTOP diferentes, que a su vez fueron sometidas a tres pretratamientos diferentes: filtrado tradicional, ultrafiltración y nanofiltración. Con ello se evaluó la recuperación de compuestos fenólicos y la influencia de estos pretratamientos tuvieron sobre el concentrado fenólico obtenido y sobre la vida útil de la resina usada.

El equipo experimental utilizado fue en todos los casos el jar-test descrito en la sección IV.1.1 del capítulo anterior. Los resultados y conclusiones obtenidas para los pretratamientos de ajuste de pH, adición de coagulantes y floculantes y adsorción con CAP, se incluyeron en un artículo científico publicado en la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [1]. En la misma revista, pero en un artículo diferente [2], se incluyó el trabajo llevado a cabo con las resinas poliméricas. La versión de autor de ambas publicaciones se ha incluido en la sección VI.1.1 y sección VI.1.2 del capítulo de “Resultados”.

V.2.1. Ajuste de pH

El rango de pH ensayado estuvo entre 2 y 11. Partiendo del pH original de las FTOP (≈ 4), se aumentó o disminuyó este parámetro de una en una unidad y se estudió el sobrenadante obtenido tras un periodo de sedimentación.

Metodología experimental

Se trabajó a T^a ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y se utilizó un volumen de muestra de 0,5 L. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y la metodología seguida fue la siguiente:

- Se ajustó el pH añadiendo NaOH o HCl, según se quisiera aumentar o disminuir el pH, manteniendo la agitación a 150 rpm.
- Una vez ajustado el pH se redujo la agitación hasta 60 rpm y se mantuvo durante 5 min, para favorecer la formación de agregados.
- Se detuvo la agitación, dejando sedimentar durante 90 min.
- Se tomaron muestras del sobrenadante clarificado con una bureta, para evitar coger el precipitado del fondo.

Análisis

Para el sobrenadante se midieron los siguientes parámetros: pH, conductividad, turbidez, SS, DQO y fenoles totales.

El pH óptimo fue aquel que consiguió un elevado porcentaje de eliminación de los parámetros medidos con la mínima cantidad de reactivo.

V.2.2. Coagulantes-Floculantes

En el desarrollo de esta parte se establecieron una serie de pasos, que permitieron abordar la gran cantidad de pruebas a realizar de una forma sistemática, cumpliendo objetivos y descartando las opciones menos eficientes.

1º Paso; Selección del mejor par coagulante/floculante.

Se ensayaron cada uno de los 3 coagulantes con los 5 floculantes de los que se disponía (Tabla IV.11). Las concentraciones empleadas fueron $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los coagulantes y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los floculantes (recomendada por el proveedor). Se evaluó la reducción de la turbidez del sobrenadante.

2º Paso; Concentración óptima de coagulante y floculante.

Para los dos reactivos seleccionados se probaron concentraciones crecientes de coagulante, desde 200 hasta $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, con una concentración fija de floculante de $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La cantidad de floculante se fijó en base a un ensayo preliminar con $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de coagulante y $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de floculante, en el que no se mejoró la eliminación de turbidez.

3º Paso; pH óptimo.

Con el óptimo de concentraciones establecidas en el paso anterior, se realizó el ajuste de pH en un rango que varió entre 2 y 11.

Metodología experimental

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, a T^a ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y con un volumen de muestra de 0,5 L. La metodología seguida fue la siguiente:

- Se añadieron en primer lugar los coagulantes, manteniendo una velocidad de giro de 150 rpm durante 8 min para el GT-25 y de 2 min para el K-225 y el HA-89 (siguiendo las especificaciones del proveedor).
- En los ensayos con ajuste de pH se añadió NaOH o HCl a continuación del coagulante, manteniendo la velocidad de agitación.
- Para incorporar el floculante se disminuyó la velocidad a 60 rpm, manteniéndola durante 5 min, para favorecer la formación de agregados.
- Se detuvo la agitación y dejó sedimentar la mezcla durante 90 min.
- Se tomaron muestras del sobrenadante clarificado con una bureta, para evitar coger el precipitado del fondo.

Análisis

Para el sobrenadante se obtuvieron los siguientes parámetros: pH, conductividad, turbidez, SS, DQO y fenoles totales.

Como resultado de estos ensayos se obtuvo el coagulante y el floculante más adecuado para el pretratamiento de las FTOP y las concentraciones y condiciones de pH óptimos.

V.2.3. Adsorción con carbón activo

Previamente a la realización de los ensayos de adsorción, se establecieron una serie de parámetros operacionales en base a la bibliografía consultada. Estos parámetros fueron la velocidad de agitación durante la reacción y el pH de trabajo:

- La velocidad de agitación se fijó en 150 rpm, de acuerdo a las condiciones utilizadas por otros autores en sus investigaciones [3,4]. Con esta velocidad se aseguró que la difusión del sustrato, desde la fase líquida al adsorbente, no fuera una etapa limitante del proceso.
- Por otro lado, tal y como se ha comentado en el Capítulo de “Estudios Previos” (sección III.1.2.1), la condición ácida de las FTOP favorece la adsorción de los compuestos fenólicos en el carbón activo, por lo que no se consideró necesario variar el pH de las muestras.

Los pasos establecidos para realizar la batería de ensayos experimentales fueron los siguientes:

1º Paso; Selección del mejor CAP.

Se probaron cuatro tipos de CAP (Tabla IV.9), con una concentración de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un tiempo de reacción de 4 horas (para asegurar las condiciones de equilibrio). Para estas condiciones se midió la concentración de fenoles totales al inicio y al final de cada ensayo, estableciendo el CAP con mayor capacidad de adsorción de estos compuestos en las FTOP.

2º Paso; Tiempo de equilibrio en la adsorción.

Para el CAP seleccionado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción, que se produce cuando se alcanza una concentración constante del adsorbato en la fase líquida. Con ello se optimizó el tiempo de reacción. Se probaron 2, 4 y $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CAP para un tiempo de reacción de 2 horas, tomando alícuotas a los 5, 15, 30, 45, 60 y 120 min. Para cada muestra se determinó la concentración de fenoles totales adsorbidos.

3º Paso; Isotermas de adsorción.

Una vez establecidas las condiciones de equilibrio se calcularon las isotermas de adsorción de Langmuir y Freundlich. Para ello se realizaron ensayos con seis concentraciones de CAP (entre 2 y 8 g·L⁻¹) y se obtuvieron las concentraciones de fenoles totales en el equilibrio. Estas concentraciones se ajustaron a las isotermas Langmuir [Eq.(III.3)] y de Freundlich [Eq.(III.5)], explicadas en la sección III.1.2, estableciendo el mecanismo de adsorción entre los compuestos fenólicos de las FTOP y el CAP utilizado.

Metodología experimental

Los ensayos de adsorción se realizaron a T^a ambiente (22 ± 1°C), con un volumen de muestra de 0,5 L y por triplicado. La metodología seguida en los jar-test fue la siguiente:

- Se mezcló el CAP con la FTOP y se mantuvo durante el tiempo de reacción establecido, según el paso experimental (4 h, 2 h o el tiempo de equilibrio), a una velocidad de 150 rpm.
- Se detuvo la agitación y se dejó sedimentar 20-30 min, ya que un tiempo mayor no mejoró la decantación. Esta deficiente sedimentación fue debido al pequeño tamaño de las partículas, que hizo necesario un proceso de filtración posterior para separar el CAP. Para este fin se usaron filtros de celulosa con un diámetro de poro de 40 µm.

Análisis

Para los efluentes filtrados se realizaron los siguientes análisis: pH, conductividad, DQO, fenoles totales y perfil fenólico (algunas muestras).

Aunque con este pretratamiento no se eliminaron SS, la filtración adicional necesaria si lo hizo. Sin embargo, no se evaluó la reducción de turbidez y SS producidas ya que no eran inherentes al pretratamiento de adsorción. Con estos ensayos se obtuvo el mejor CAP para llevar a cabo la adsorción de compuestos fenólicos de las FTOP, al pH natural de este tipo de aguas residuales. Además, se caracterizó su mecanismo de adsorción y se optimizaron los tiempos de reacción.

V.2.4. Recuperación de compuestos fenólicos

Este pretratamiento tuvo como objetivo principal la valorización de los compuestos fenólicos presentes, produciéndose al mismo tiempo una reducción de sustancias contaminantes en las FTOP por adsorción. Tal y como se ha explicado en el capítulo de “Estudios Previos” (sección III.1.2.2), los compuestos fenólicos naturales tienen una gran demanda por parte de las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas, por lo que su recuperación y concentración presentan una importante motivación. Es por ello que en este trabajo se ha querido dar una especial relevancia a este punto, llevando a cabo un exhaustivo estudio al respecto.

Dadas las ventajas de trabajar al pH original de las muestras (reducción en los tiempos de operación y ahorro en los costes asociados a reactivos), se buscaron resinas en las que las condiciones ácidas de la fase líquida favorecieran la adsorción de los compuestos fenólicos. Gracias al estudio del arte realizado, las resinas más apropiadas serían las de poliestireno-divinilbenceno y las de intercambio catiónico. Es por ello que en los ensayos se probaron tres resinas del primer tipo y una del segundo.

Otro aspecto que se tuvo en cuenta con vistas a obtener un concentrado fenólico lo más puro posible, fue la concentración de sustancias contaminantes que se podían adsorber en las resinas, tales como materia orgánica no fenólica y SS presentes en la fase líquida. Estos contaminantes podían influir no solo en el

porcentaje de compuestos fenólicos adsorbidos y desorbidos (debido a la competencia entre sustratos), sino también en la vida útil de la resina. Para valorar este efecto se realizaron ensayos con las FTOP sometidas a distintos pretratamientos, los cuales tuvieron como objetivo reducir los SS y la materia orgánica, conservando la matriz del agua residual.

Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

- *Filtrado tradicional*; Se utilizó un filtro de cartucho de Nylon con un tamaño de poro de 60 μm . Con esta operación se eliminaron los sólidos gruesos (trozos de hueso, restos de pulpa, restos de relleno...) y se redujo un poco el porcentaje de SS.
- *Ultrafiltración*; Se utilizó una membrana plana de poliéter sulfona con un corte molecular de 5 kDa (Serie UP005 de Microdyn-Nadir), con el equipo descrito en la sección IV.2.6 (Figura IV.12). Se operó con una presión transmembranal de 2.5 bares y con un caudal de 300 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. El influente utilizado fue la FTOP filtrada a 60 μm , para evitar un ensuciamiento excesivo de la membrana. Con esta operación se eliminó por completo la turbidez y los SS y se redujo la DQO.
- *Nanofiltración*; Se utilizó una membrana de poliamida de la Serie NF245 de DOW, con un corte molecular aproximado de 300 Da y una configuración de arrollamiento en espiral. Se usó la planta piloto descrita en la sección IV.2.6, correspondiente a la planta NF1 (Figura IV.13). Se operó con una presión transmembranal de 15 bares y con un caudal de 300 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Con esta operación se eliminaron por completo la turbidez, los SS y se redujo la DQO en una proporción mayor a la conseguida con la UF.

Al igual que en los otros casos y debido a la gran cantidad de ensayos a realizar, se procedió de forma sistemática conforme a los pasos que se describen a continuación:

1º Paso; Selección de la resina.

Se probaron las cuatro resinas presentadas en la Tabla IV.10, en una concentración de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con una muestra de FTOP filtrada a $60 \mu\text{m}$. El tiempo de reacción se fijó tres horas, para asegurar las condiciones de equilibrio. Para las dos resinas con las que se obtuvo una mayor adsorción de compuestos fenólicos, se realizó un segundo ensayo con 20 y $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el mismo tiempo de reacción. De estas dos se seleccionó la que presentó una mayor capacidad de adsorción.

2º Paso; Adsorción. Obtención del tiempo de equilibrio y estudio de la cinética y de las isotermas de adsorción.

Con la resina seleccionada se realizaron ensayos de adsorción para varias muestras sometidas a los pretratamientos descritos. En concreto se utilizaron dos FTOP filtradas a $60 \mu\text{m}$, dos UF y una NF. Para cada una de estas muestras se probaron cinco concentraciones de resina; 5 , 10 , 20 , 30 y $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se fijó un tiempo de reacción de tres horas durante los cuales se tomaron alícuotas a los 5 , 10 , 15 , 20 , 30 , 45 , 60 , 120 y 180 min. Con los valores de los fenoles totales obtenidos se estableció el tiempo de equilibrio de adsorción y la cinética de la reacción a partir de las ecuaciones Eq.(III.7) y Eq.(III.9). Para el equilibrio de adsorción se ajustaron las isotermas de adsorción de Langmuir [Eq.(III.3)] y de Freundlich [Eq.(III.5)]. Además, se aplicó el modelo de difusión intraparticular utilizando la ecuación Eq.(III.10).

3º Paso; Selección del disolvente orgánico para la desorción de compuestos fenólicos.

En base al estado del arte realizado, se seleccionaron el etanol y el acetato de etilo como los disolventes más adecuados para llevar a cabo la desorción de los compuestos fenólicos retenidos en la resina. Se utilizó una resina en la que previamente se habían adsorbido fenoles ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de resina y $0,5 \text{ L}$ de

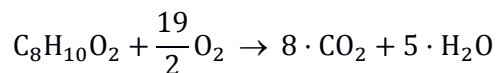
una muestra NF). La selección del disolvente se hizo en base al porcentaje de fenoles totales recuperados y a la toxicidad y precio del mismo.

4º Paso; Desorción y recuperación de compuestos fenólicos.

Para cada uno de los ensayos de adsorción realizados en el 2º Paso, se realizó la desorción con el disolvente seleccionado. Se estableció un tiempo de reacción de 60 min y se tomaron alícuotas a los 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min, analizando los fenoles totales recuperados para determinar el tiempo de equilibrio en la desorción.

Por otro lado, se estudió la influencia que el pretratamiento realizado en las FTOP tuvo sobre el porcentaje de fenoles en el material desorbido. Puesto que los fenoles son sustancias oxidables, se podría evaluar el porcentaje de estas sustancias comparando su DQO con la DQO total del material desorbido. Aunque la lógica dicta analizar el efluente tras la desorción, finalmente se optó por el análisis del material adsorbido. La principal razón que obligó a ello fue que la fase líquida que contenía la extracción tenía una base orgánica (disolvente) que no se consiguió evaporar al 100%, obteniendo una DQO por encima de lo esperado en todas las pruebas realizadas.

La premisa utilizada fue suponer que la composición adsorbida debía ser muy similar a la desorbida, ya que la concentración de fenoles adsorbidos y desorbidos eran prácticamente iguales. Por lo tanto, la DQO asociado a los fenoles adsorbidos y desorbidos debía ser similar. Con ello y teniendo en cuenta que la oxidación del tirosol (sustancia equivalente de referencia en el cálculo de fenoles totales) corresponde a la siguiente reacción;



Con ello se obtuvo que para oxidar un mol de tirosol son necesarios 9,5 moles de O₂. Teniendo en cuenta que el peso molecular del tirosol es 138 g·mol⁻¹ y que el del oxígeno es 16 g·mol⁻¹, serían necesarios 2,2 g de O₂ para

oxidar 1 g de tirosol. Esta relación permitió obtener la DQO asociada a los compuestos fenólicos ($DQO_{Ph,ads}$) aplicando la ecuación Eq.(V.1).

$$DQO_{Ph,ads} = (C_{Ph,0} - C_{Ph,e}) \cdot 2,2 \quad \text{Eq.(V.1)}$$

donde $C_{Ph,0}$ y $C_{Ph,e}$ son la concentración de fenoles totales inicial y en el equilibrio tras la adsorción, respectivamente. Comparando los valores de la DQO total adsorbida con los de $DQO_{Ph,ads}$ se pudo obtener el porcentaje de fenoles en el concentrado fenólico.

5º Paso; Ciclo de vida útil de la resina.

El objetivo de esta tarea fue calcular la pérdida del rendimiento de la resina durante diez ciclos de adsorción, desorción y regeneración. Se utilizaron las muestras filtradas, UF y NF, con una concentración inicial de fenoles similar, para que este parámetro no influyera sobre el estudio realizado.

Metodología experimental

Los ensayos de adsorción y desorción se llevaron a cabo a T^a ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y por triplicado. A continuación se detalla el procedimiento experimental seguido en cada uno de estos procesos, así como cada uno de los ciclos correspondientes al estudio de la vida útil de la resina. Por último se especifica el tratamiento de activación/regeneración que requiere la resina antes de cada etapa de adsorción.

a) Adsorción

- El tiempo de reacción fue de 180 min a 150 rpm.
- La resina se separó de la fase líquida con filtros de celulosa y se lavó dos veces con agua osmotizada (5 min a 150 rpm).
- La resina se secó en estufa a 50°C durante 3 horas.

Análisis: En la fase líquida se midió tras la adsorción: pH, conductividad, color, concentración de fenoles totales y DQO. En algunos casos se obtuvo el perfil fenólico.

b) Desorción

- Se pesó la resina seca y se calculó el volumen de disolvente necesario para mantener la misma concentración que en el ensayo de adsorción correspondiente.
- El tiempo de reacción con el disolvente fue de 60 min a 150 rpm y a Tª ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Análisis: En la fase líquida se midió tras la desorción: color y concentración de fenoles totales. En algunas muestras se obtuvo el perfil fenólico.

c) Ciclo de vida útil

- Se llevó a cabo la adsorción con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de resina, conforme a la metodología descrita.
- Posteriormente y siguiendo la metodología correspondiente, se realizó la desorción de los compuestos fenólicos.
- Tras la desorción se separó la resina del disolvente y se lavó dos veces con agua osmotizada (5 min a 150 rpm).
- Se llevó a cabo la regeneración de la resina conforme al protocolo que se presenta al final de esta sección.
- Tras la regeneración, se lavó de nuevo la resina con agua osmotizada (2 lavados de 5 min a 150 rpm) y se secó en estufa a 50°C durante 3 horas.

- Se pesó la resina seca y se calculó la cantidad de FTOP filtrada, ultrafiltrada o nanofiltrada necesaria para conservar la concentración de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ establecida inicialmente, para realizar un nuevo ciclo.

Análisis: Se midió la concentración de fenoles totales en la fase líquida tras la adsorción y tras la desorción. En algunas muestras se obtuvo el perfil fenólico.

d) Protocolo de activación/regeneración de la resina MN200

La resina seleccionada necesitó un proceso de activación antes de su primer uso, que se realizó conforme a las recomendaciones del proveedor. Este mismo procedimiento se utilizó para regenerar la resina tras la desorción y antes de comenzar un nuevo ciclo de adsorción. La metodología seguida fue la siguiente:

- Se preparó una disolución de hidróxido de sodio (2% peso/volumen), en la que se mantuvo la resina en agitación durante 60 min con una velocidad de 150 rpm.
- Con la ayuda de un filtro de celulosa de $40 \mu\text{m}$ se separó la resina de la disolución, que se lavó dos veces con agua osmotizada (5 min a 150 rpm).
- La resina se separó del agua y se secó en estufa a 50°C durante 3 horas.

En la Figura V.1 se presenta un esquema representativo de la metodología empleada para la activación de la resina y para los ciclos de adsorción y desorción. El conjunto de estos tres métodos corresponderían con cada uno de los ciclos realizados en los ensayos de vida útil de la resina.

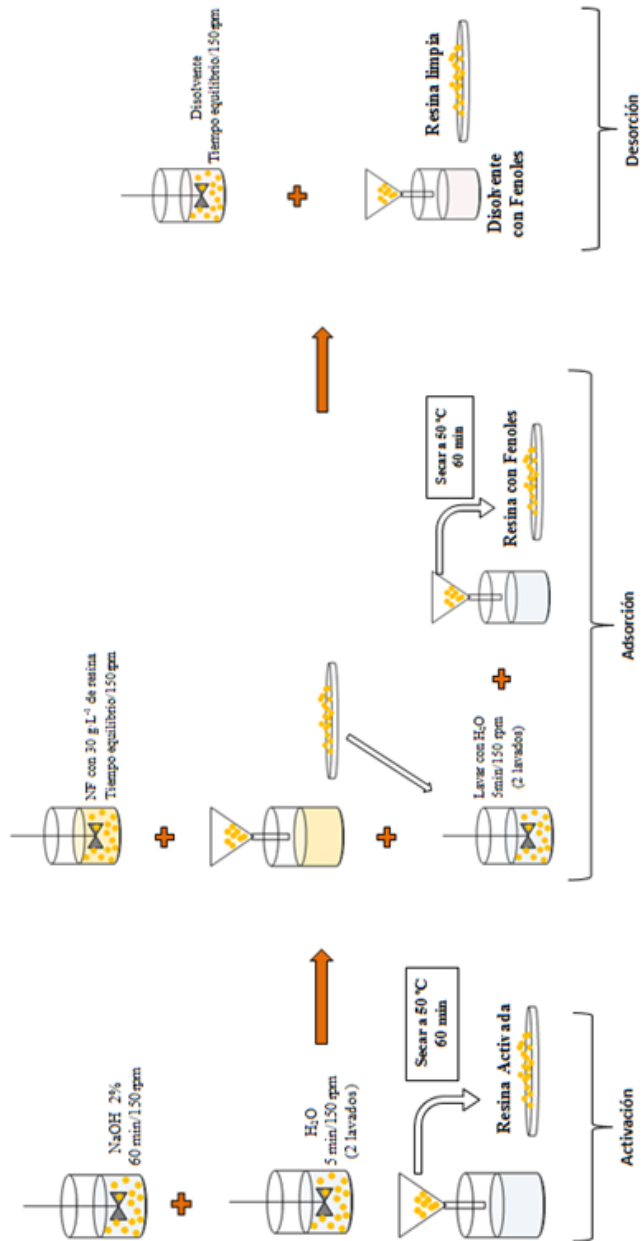


Figura V.1 Vida útil de la resina; Activación y ciclos de adsorción/desorción.

V.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO

El tratamiento biológico de las FTOP se llevó a cabo en reactores biológicos secuenciales (SBR). Los componentes, configuración y funcionamiento, así como el sistema de aireación utilizado, han quedado detallados en la sección IV.1.2.

V.3.1. Puesta en marcha

En el capítulo de “Estudios Previos” de este trabajo, se ha justificado la dificultad que presenta la gestión de las FTOP mediante tratamientos biológicos convencionales, debido a la elevada salinidad de estas aguas residuales. Ello obliga a contar con una biomasa específica, que incluya bacterias halófilas capaces de llevar a cabo sus funciones metabólicas en estas condiciones de extrema salinidad. Otro de los parámetros a tener en cuenta es el tiempo de retención hidráulico (TRH), el cual debe ser lo suficientemente elevado para permitir una adaptación progresiva de los microorganismos, no solo a la elevada salinidad, sino también a las elevadas concentraciones de DQO y a la presencia de compuestos fenólicos.

Los resultados y conclusiones obtenidas durante el periodo experimental correspondiente a la puesta en marcha de los reactores, se publicaron en la revista *Chemical Engineering Journal* [5]. La versión de autor de esta publicación se ha incluido en la sección VI.2.1 de Resultados.

Metodología experimental

En la puesta en marcha se utilizaron dos reactores, nombrados como SBR-1 y SBR-2, en los que se desarrollaron dos estrategias diferentes de adaptación de la biomasa a las FTOP:

– *Estrategia 1: Adaptación conjunta a la salinidad y fenoles.*

Se llevó a cabo en el reactor SBR-1. En este reactor se utilizó FTOP como alimento desde el primer día de la puesta en marcha. Gracias al elevado TRH, se produjo un aumento gradual de la concentración salina en el reactor. Así mismo, la biomasa se fue adaptando poco a poco a la presencia de fenoles. Cuando se establecieron las condiciones estacionarias se dio por terminada la puesta en marcha. En estas condiciones los parámetros seleccionados para caracterizar el efluente se mantuvieron constantes durante varios ciclos de operación. Estos parámetros fueron la conductividad y el porcentaje de eliminación de DQO y fenoles.

– *Estrategia 2: Adaptación separada a la salinidad y fenoles.*

En el SBR-2 se llevó a cabo una adaptación previa a la salinidad, utilizando un agua sintética salina con la siguiente composición; 20 g·L⁻¹ de peptona de caseína, 2,5 g·L⁻¹ de glucosa, 2,5 g·L⁻¹ de K₂HPO₄ y 100 g·L⁻¹ de NaCl (DQO ≈ 10 g·L⁻¹). Tras 45 días de operación, se alcanzó una conductividad de 60 mS·cm⁻¹ y un rendimiento de eliminación de DQO del 85%. Con esta biomasa preadaptada se comenzó a suministrar FTOP como alimento. El final de la puesta en marcha del SBR-2 se hizo en base a las mismas consideraciones tenidas en el SBR-1.

La comparativa entre las dos estrategias se realizó a partir del momento en que ambos reactores se alimentaron con FTOP.

Biomasa

Ambos reactores se sembraron con biomasa procedente de una planta de tratamiento de lixiviados de vertederos situada en la provincia de Valencia. Las razones para utilizar esta biomasa fueron las siguientes:

- La conductividad inicial del fango activo utilizado para la siembra fue de $12 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ello confería a los microorganismos unas condiciones de adaptación a concentraciones salinas más elevadas que los que se encontrarían en una EDARU convencional.
- La diferencia entre la conductividad del fango de siembra y el de las FTOP, permitió estudiar la evolución del rendimiento de eliminación de DQO y fenoles, así como las modificaciones poblacionales de la biomasa.
- Por otro lado, la biomasa seleccionada tenía una adaptación previa a sustancias orgánicas complejas de degradación lenta e incluso a la presencia de sustancias inhibidoras, presentes en los lixiviados. Estas características podían proporcionar una adaptación más rápida y eficaz a un agua residual como las FTOP, que el uso de cepas aisladas.

Parámetros operacionales

Ambos reactores operaron durante 108 días. El TRH fue de 40 días y un ciclo diario en ambos SBRs. En la Tabla V.1 se detallan los tiempos asignados a cada una de las fases llevadas a cabo en cada ciclo, junto a otras características operacionales comunes.

Durante este periodo se utilizaron dos muestras (FTOP-1 y FTOP-2). La FTOP-1 se usó durante los primeros 48 días y la FTOP-2 desde el día 49 hasta el 108. La relación estequiométrica entre la DQO, el nitrógeno y el fósforo en el alimento (DQO:N:P) se fijó en 250/5/1, de acuerdo a lo establecido en la sección III.2.3 del capítulo de “Estudios Previos”.

Tabla V.1. Puesta en marcha SBRs; Características operacionales.

Características operativas	
Volumen de reacción	6 L
Volumen influente/efluente	150 mL·d ⁻¹
Temperatura	18 – 20°C
Oxígeno disuelto	1,5 – 2,5 mg·L ⁻¹
TRH	40 d
Periodo experimental	108 d
Fases del ciclo SBR	
Llenado	2 min
Reacción anóxica	1 h
Reacción aeróbica	21 h
Sedimentación	1,5 h
Vaciado	2 min
Tiempo de espera	26 min

Análisis

Las muestras de FTOP utilizadas se caracterizaron conforme a lo establecido en la sección V.1. En los reactores se llevaron a cabo análisis del efluente y del LM, con una periodicidad de dos veces por semana. Los parámetros controlados fueron los siguientes:

- Efluente: pH, conductividad, turbidez y DQO soluble.
- Licor de mezcla: SSLM, SSVLM y temperatura.

Con estos parámetros se calculó la relación SSVLM/SSLM y la carga másica en función de los sólidos volátiles, también conocida como F/M (*food-to-microorganism ratio*). F/M relaciona la materia orgánica presente en el

influyente con la biomasa capaz de degradarlo y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$F/M = \frac{DQO_0 \cdot Q}{V_R \cdot SSVLM} \quad \text{Eq.(V.2)}$$

donde DQO_0 es la DQO inicial de la FTOP utilizada ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Q es caudal de FTOP alimentado al día y V_R es el volumen de reacción.

Se llevó a cabo el control poblacional de las especies detalladas en la Tabla IV.5 para los dos reactores en los días 46, 66 y 108, utilizando la técnica FISH (sección IV.3.8.1). La identificación de las bacterias tolerantes salinas se realizó en la última semana de la puesta en marcha, conforme al método descrito en la sección IV.3.8.2.

Otros análisis realizados al efluente de los SBR al final de la puesta en marcha fueron los siguientes: capacidad antioxidante, toxicidad, fenoles totales y concentración de tirosol e hidroxitirosol (análisis con HPLC). Cada uno de estos parámetros se obtuvo de acuerdo a los métodos analíticos descritos en el Capítulo IV.

V.3.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos

Tras la puesta en marcha de los SBR se consiguió la adaptación de la biomasa a conductividades alrededor de $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ y a concentraciones de DQO y fenoles totales en el influente sobre $16.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.000 \text{ mgTY}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Los rendimientos de eliminación alcanzados tras el tratamiento biológico estuvieron por encima del 80% en el caso de la DQO y fue casi completa en el caso de los compuestos fenólicos, tal y como se verá en

los resultados presentados. Estos rendimientos fueron algo superiores en el SBR-1, donde se llevó a cabo la adaptación conjunta.

Aunque los rendimientos obtenidos fueron muy buenos, el TRH necesario para conseguir la adaptación de la biomasa activa fue muy elevado. Una vez conseguida esta adaptación, fue necesario estudiar la optimización del tratamiento para disminuir el TRH, ya que valores excesivos de este parámetro harían difícil la viabilidad del proceso a nivel industrial.

La estrategia seguida para alcanzar los objetivos específicos marcados para esta parte del trabajo, fue estudiar diversos factores que pudieran mejorar la biodegradación de las FTOP. Esto podría permitir aumentar la cantidad de influente a tratar, reduciendo el TRH, sin disminuir el rendimiento de eliminación de la materia orgánica. Los factores considerados fueron la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en las FTOP, la aplicación de uno de los pretratamientos estudiados en la sección III.1, en concreto la adsorción con carbón activo y el aumento y mantenimiento de la temperatura del LM hasta los 30°C.

Los resultados y conclusiones obtenidas fueron divididos en dos artículos de investigación. En el primero de ellos se estudió la influencia que la concentración de nutrientes y la aplicación de un pretratamiento de adsorción con carbón activo tuvo sobre el rendimiento de eliminación de materia orgánica y fenoles. Este artículo incluyó un estudio sobre la población bacteriana presente. La investigación fue publicada en la revista *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [6], cuya versión de autor está incluida en la sección VI.2.2 del capítulo de “Resultados”. En el segundo artículo también se estudió el rendimiento de eliminación de materia orgánica para diferentes condiciones operacionales en las que se varió el TRH, el ratio F/M y la temperatura del LM. En este trabajo se incluyó un estudio sobre la población de protistas en los reactores involucrados. Este artículo ha sido enviado recientemente al *Water Research*.

V.3.2.1. Concentración de nutrientes en las FTOP

En la sección III.2.3 se estableció la relación estequiométrica para la DQO:N:P en unos valores de 250:5:1. Los ensayos que se explican a continuación tuvieron como finalidad el estudio de la influencia del déficit de nutrientes y del exceso de los mismos en las FTOP utilizadas como alimento, sobre el rendimiento del reactor. Para ello se utilizaron FTOP deficitarias en nutrientes, a las que posteriormente se les añadió de forma externa nitrógeno y fósforo, hasta la cantidad estequiométrica establecida como referencia y en un 10% en exceso. En cada etapa experimental se hizo el seguimiento del proceso, analizando el efluente y el LM para evaluar el rendimiento del reactor.

Metodología experimental

La experimentación tuvo una duración de 166 días y se llevó a cabo en el SBR-1 utilizado en la puesta en marcha. La cronología experimental se dividió en tres etapas:

- *Etapa 1:* Durante los primeros 22 días se utilizó la FTOP-1, con una relación DQO/N/P de 250:5:1. Posteriormente, se usó la FTOP-2 que era deficitaria en N y P, estudiando durante 47 días el efecto sobre el rendimiento del SBR-1.
- *Etapa 2:* A partir del día 70 y hasta el día 117, se aportó de forma externa el N y el P necesarios para obtener la relación 250/5/1 en la FTOP-2. La fuente de nitrógeno fue urea (NH_2CONH_2) y la de fósforo fue K_2HPO_4 .
- *Etapa 3:* Finalmente se añadió un exceso de nutrientes en la FTOP-2, hasta tener un 10% más sobre la relación fijada. Esta última etapa experimental tuvo una duración de 48 días.

Nota: Las FTOP-1 y FTOP-2, no son las utilizadas en la puesta en marcha. Esta nomenclatura obedece a los motivos explicados la sección V.1.

Parámetros operacionales

Se operó con las mismas condiciones descritas en la Tabla V.1.

Análisis

Las muestras de FTOP utilizadas se caracterizaron conforme a lo establecido. En el efluente y en el LM se llevaron a cabo los mismos controles que en la puesta en marcha, pero con una periodicidad de una vez por semana.

Otro de los parámetros analizados en el efluente fue la concentración de fenoles totales en los días 53 y 147, para evaluar la influencia que la relación DQO:N:P tuvo sobre la biodegradación de los compuestos fenólicos.

También se realizó el control poblacional de bacterias en la biomasa del SBR-1 en los días 40, 100 y 160. A diferencia del control realizado en la puesta en marcha, para este periodo experimental sólo se identificaron y cuantificaron las *γ-Proteobacteria*, llevando a cabo la hibridación con una única sonda (GAM42a). La razón de ello fue porque al comenzar el ensayo más del 50% de la población bacteriana pertenecía a esta subclase (aumentando a más del 70% posteriormente). Con este dato, se consideró que con el seguimiento único de las *γ-Proteobacteria*, quedaba caracterizada la población bacteriana, sin necesidad de considerar otras especies minoritarias.

Para este mismo reactor, también se identificó y cuantificó la población de protistas en el fango activo, utilizando la metodología descrita en la sección IV.3.9 del capítulo de “Materiales y Métodos”. El muestreo se prolongó durante 293 días, a razón de una muestra cada tres semanas (total 12 muestras).

V.3.2.2. Pretratamiento de las FTOP con carbón activo

De los pretratamientos descritos en la sección III.1, se optó por la adsorción con CAP por varias razones:

- Fue el pretratamiento con mayor capacidad de eliminación de materia orgánica y fenoles.
- Aunque directamente no eliminaron SS, si se consiguió reducir la concentración de sólidos de forma indirecta por filtración.
- Las diferentes FTOP utilizadas presentaron una variabilidad importante en parámetros como la concentración de DQO y fenoles totales. Con la adsorción es posible controlar estas condiciones iniciales de entrada al reactor, ya que en función de la concentración de CAP utilizada se consigue una mayor o menor eliminación de sustancias no deseadas. Con ello se podrían obtener influentes más homogéneos minimizando el impacto que, variaciones bruscas en la DQO o concentración fenólica de entrada, podrían tener sobre el tratamiento biológico.

Metodología experimental

Se utilizaron 3 reactores nombrados como SBR-2, SBR-3 y SBR-4. El SBR-2 se puso en funcionamiento con fango activo procedente de las purgas del SBR-1 (no confundir con el SBR-2 de la puesta en marcha). Hasta conseguir un volumen de reacción de 6 L. En este primer periodo el SBR-2 operó de forma manual y cada día se calculó el volumen de FTOP necesario para trabajar con las mismas condiciones de F/M del SBR-1. No se realizaron purgas de fango ni se extrajo efluente. Tras 33 días de operación manual se alcanzó el volumen deseado, pasando a la operación automática y comenzando con ello el ensayo propiamente dicho. Con esta operación se obtuvo un reactor gemelo al SBR-1, que operó durante 132 días con FTOP pretratada con CAP.

Una vez terminada la parte experimental con el SBR-2 y con la finalidad de poder realizar un número mayor de ensayos y evitar largos tiempos de espera, se dividió este reactor en dos nuevos. Estos dos reactores, SBR-3 y SBR-4, operaron con un volumen de reacción de 3 L cada uno, durante 116 días (desde el día 167 al día 283). Se alimentaron con FTOP pretratada con CAP y se probaron diferentes TRH y F/M.

En la Figura V.2 se detalla la cronología de los ensayos realizados con cada uno de los reactores comentados en las secciones V.3.2.1 y V.3.2.2.

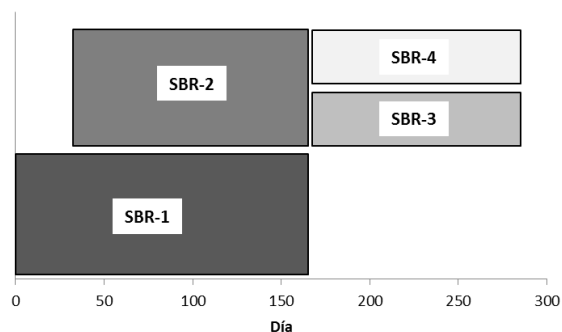


Figura V.2. Reactores utilizados en el estudio del rendimiento del tratamiento biológico de las FTOP: influencia de la concentración de nutrientes y pretratamiento con CAP.

En los resultados presentados en el capítulo correspondiente, se analizaron los datos con respecto a dos etapas experimentales diferenciadas:

- *Etapas 1. Comparativa entre el SBR-1 y el SBR-2.*

Tras la puesta en marcha del SBR-2 de 33 días se mantuvo durante 13 días más las mismas condiciones que en el SBR-1. A partir del día 47 el SBR-1 se alimentó con FTOP-2 y el SBR-2 con FTOP-2 pretratada con CAP

(FTOP-2_{CAP}). Con este pretratamiento se redujo la concentración de fenoles totales hasta los 400 mg TY·L⁻¹ (inicialmente era 1550 mg TY·L⁻¹). La consiguiente disminución de la DQO hizo que el balance de DQO:N:P se mantuviera en la relación estequiométrica requerida. Para conservar el mismo ratio F/M que en el SBR-1 se redujo el TRH de 40 a 30 días.

– *Etapa 2: Comparativa entre el SBR-3 y el SBR-4.*

Durante este periodo se utilizaron las muestras FTOP-3_{CAP} (del día 167 al 203) y FTOP-4_{CAP} (del día 204 al 283). Con este pretratamiento se redujo la concentración de fenoles totales hasta 200 mg TY·L⁻¹. Debido a las características iniciales de estas FTOP y al pretratamiento aplicado se consiguió una importante reducción de la DQO del influente. Ello permitió mantener en el SBR-4 la misma F/M utilizada en el SBR-2, reduciendo el TRH de 30 a 15 días. En el caso del SBR-3 se decidió mantener el TRH en 30 días, reduciendo F/M a la mitad, para ver si aumentaba con ello el rendimiento de eliminación de DQO.

Parámetros operacionales

A modo de resumen se presenta la Tabla V.2, en la que se detallan diferentes parámetros que pueden facilitar la comprensión de las actuaciones realizadas. La duración de las fases en cada uno de los ciclos, fue la misma en los tres reactores (Tabla V.1).

Tabla V.2. Características operativas de los reactores SBR-2, SBR-3 y SBR-4 utilizados en la evaluación del pretratamiento de las FTOP con CAP en el tratamiento biológico.

Características operativas	SBR-2	SBR-3	SBR-4
Temperatura (°C)		18 – 20	
Oxígeno disuelto (mg·L ⁻¹)		1,5 – 2,5	
Volumen de reacción (L)	6	3	3
F/M (kg DQO·kg SSVLM ⁻¹ ·d ⁻¹)	0,14	0,08	0,14
Volumen influente/efluente (mL·d ⁻¹)	200	100	200
TRH (días)	30	30	15

Análisis

Los análisis realizados a las FTOP, efluente y LM fueron los mismos que los especificados en la sección V.3.2.1.

El control de las *γ-Proteobacteria* en el reactor SBR-2 se hizo en los mismos días que en el SBR-1 (días 40, 100 y 160). En los reactores SBR-3 y SBR-4 se llevó a cabo los días 200, 240 y 280.

Al igual que se ha comentado para el SBR-1, en los reactores SBR-2, SBR-3 y SBR-4 también se llevó a cabo la identificación y cuantificación de la población de protistas en el fango activo, durante el mismo periodo de tiempo y con la misma frecuencia.

V.3.2.3. Condiciones isotermas del licor de mezcla a 30°C

La mayor parte de las bacterias que se pueden encontrar en la naturaleza son mesófilas, es decir, tienen su máximo rango de crecimiento a temperaturas comprendidas entre 25°C y 40°C. Es por ello que en diversos trabajos de

investigación se ha confirmado que la biodegradación de los compuestos fenólicos aumenta en este rango de temperaturas. Polymenakou y Stephanou [7] establecieron en 30°C la temperatura óptima de degradación de una mezcla de fenol, tolueno, o-cresol, naftaleno y 1,2,3-trimetilbenzeno, con bacterias de la clase *Pseudomonas sp.* En estudios más recientes [8], la máxima degradación para un agua sintética con una concentración inicial de 1000 mg·L⁻¹ de fenol y con bacterias del tipo *Pseudomona putida*, fue a los 35°C.

Es por ello que en este trabajo se planteó la posibilidad de aumentar la temperatura del licor de mezcla hasta los 30°C y mantenerla en estas condiciones, estudiando su influencia sobre el rendimiento de un reactor con una biomasa adaptada a las FTOP. Para ello se utilizó el mismo tipo de SBR que en los ensayos explicados hasta el momento, añadiendo un sistema de calefacción externo al mismo. Este sistema consistió en un baño de agua termostático, desde el que se impulsó agua caliente a través de una conducción de silicona que rodeó el SBR por su parte exterior, tal y como se muestra en la Figura V.3. La temperatura del baño se varió entre 35°C y 40°C, en función de la temperatura ambiente. Por último y para conseguir un mejor aislamiento, se recubrió la camisa formada por el tubo de silicona con un material aislante, el cual se puede ver desplegado en la parte derecha de la figura.

Metodología experimental

La experimentación se llevó a cabo con el SBR-2 utilizado en la puesta en marcha. Aunque este reactor tuvo una estrategia de adaptación diferente a la del SBR-1, la comunidad bacteriana fue muy similar (datos no publicados). Ello permitió establecer criterios de comparación entre estos reactores, así como con el resto de SBR obtenidos a partir del SBR-1. La finalidad fue evaluar la influencia de diferentes parámetros operacionales sobre el rendimiento de los reactores involucrados. Los ensayos se prolongaron durante 293 días, en los que se mantuvieron las condiciones isoterma a 30°C en el licor de mezcla.



Figura V.3. Sistema calefactor externo al SBR.

Parámetros operacionales

Este reactor operó en las mismas condiciones descritas en la Tabla V.1, a excepción de la temperatura.

Análisis

Los parámetros medidos en las FTOP utilizadas, efluente y LM fueron los especificados en la sección V.3.2.1.

Se llevó a cabo la cuantificación e identificación de protistas, para las 12 muestras recogidas durante el periodo experimental.

V.3.3. Alternancia de fases anaerobias y fases aerobias

El objetivo planteado en esta parte del trabajo fue estudiar los efectos de una reducción en el tiempo de aireación durante la fase de reacción, sobre la degradación biológica de la materia orgánica y de los compuestos fenólicos.

Los resultados y conclusiones obtenidas se publicaron en la revista *Biochemical Engineering Journal* [9], cuya versión de autor se ha incluido en la sección VI.2.4 de “Resultados”.

Metodología experimental

Los ensayos se realizaron en dos reactores, nombrados como SBR-1 y SBR-2 en los resultados presentados. El SBR-1 correspondió al mismo SBR-1 de la puesta en marcha, que luego se usó en los ensayos expuestos en la sección V.3.2.1. El SBR-2 se obtuvo de nuevo a partir de las purgas de fango realizadas al SBR-1, siguiendo la misma metodología explicada en la sección V.3.2.2. La situación de partida para ambos reactores fue la detallada en la Tabla V.1, donde la fase de reacción tuvo una primera hora anóxica, seguida de 21 horas con aireación. Durante el ensayo se variaron estos tiempos.

Parámetros operacionales

Los ensayos tuvieron una duración de 103 días, en los que se llevaron a cabo tres etapas diferenciadas en las que se modificaron las condiciones de aireación en la etapa de reacción:

- *Etapas 1 (38 días):* En el SBR-1 se aumentó la aireación a 22 horas y en el SBR-2 se apagó la aireación por completo.
- *Etapas 2 (36 días):* En el SBR-1 se redujo el tiempo de aireación de 22 h a 14 h y en el SBR-2 se aumentó desde 0 hasta 8 h.

- *Etapa 3 (29 días)*: En esta etapa de nuevo se volvió a reducir el tiempo de aireación en el SBR-1 y se aumentó en el SBR-2, quedando 8 h de aireación en el SBR-1 y 14 h en el SBR-2.

En todos los casos en los que hubo fase anaerobia y fase aerobia durante la reacción, se comenzó con la fase anaerobia. El resto de condiciones de operación en ambos reactores, se presentan en la Tabla V.3.

Tabla V.3. Características operacionales seguidas en el estudio de la alternancia de fases anaerobias y fases aerobias.

Características operativas	
Volumen de reacción	6 L
Volumen influente/efluente	360 mL·d ⁻¹
Temperatura	18 – 20°C
Oxígeno disuelto fase aerobia	1,5 – 2,5 mg·L ⁻¹
TRH	16,6 d
Fases del ciclo SBR	
Llenado	2 min
Reacción	22 h
Sedimentación	1,5 h
Vaciado	2 min
Tiempo de espera	26 min

Análisis

Los análisis realizados a las FTOP, efluentes y licor de mezcla fueron los mismos que los especificados en la sección V.3.2.1, aunque en esta ocasión se

hicieron dos veces por semana, ya que las modificaciones introducidas requerían un mayor control.

Además de los parámetros especificados, también se controló la concentración de fenoles totales en el efluente (dos veces por semana). Además, el perfil fenólico del efluente se obtuvo al final de cada una de las etapas realizadas.

Se midieron los SS en el efluente para evaluar la pérdida de biomasa en la descarga del agua tratada, ya que en alguna de las etapas experimentales se observó una sedimentación deficiente. Con estos datos y los correspondientes a los SSLM, se calculó la producción neta de fangos (ΔX) en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta X = \frac{1}{V_R} \cdot \left(\frac{(\text{SSLM}_j - \text{SSLM}_i) \cdot V_R}{\Delta t_{ij}} + \text{SS}_{\text{ef}} \cdot Q_{\text{ef}} \right) \quad \text{Eq.(V.3)}$$

donde SS_{ef} fueron los sólidos suspendidos medidos en el efluente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Q_{ef} el caudal diario de efluente. Los subíndices “i” y “j” representan dos días consecutivos sin purga de fango. La producción de fango, así medida, incluyó los sólidos suspendidos no biodegradables contenidos en las FTOP y el crecimiento bacteriano.

Además, se realizaron análisis respirométricos del licor de mezcla en los últimos días de cada una de las etapas experimentales. Los parámetros obtenidos fueron la tasa de consumo de oxígeno (OUR), la tasa específica de consumo de oxígeno (SOUR) y el coeficiente del rendimiento de producción de la biomasa heterótrofa (Y_H), siguiendo la metodología explicada en la sección IV.3.13.

V.4. TRATAMIENTO TERCIARIO: ULTRAFILTRACIÓN Y NANOFILTRACIÓN

Para alcanzar los parámetros de calidad necesarios y poder reutilizar la salmuera regenerada, fue necesario un tratamiento terciario. El tratamiento elegido fue un sistema de membranas de UF y NF en serie, operando a continuación del tratamiento biológico. Aunque en la práctica se operaría de forma continua, el método experimental llevado a cabo no permitió este modo de operación, debido al pequeño volumen diario de salida del SBR y a que la operación era en discontinuo en el sistema biológico. Tras recoger la cantidad suficiente de efluente del SBR, se procedió con la UF. Posteriormente se realizó la NF del permeado obtenido en la etapa anterior.

Aunque no fue uno de los objetivos fijados para esta parte del estudio, los ensayos se prolongaron unos días más para comprobar la biodegradabilidad de las FTOP. Aprovechando las diferentes DQO de las FTOP utilizadas se aumentó al doble el parámetro F/M, manteniendo el TRH, para evaluar el efecto sobre el rendimiento de eliminación de la materia orgánica.

Los resultados conseguidos para este tratamiento terciario se incluyeron en un artículo científico, en el que se abordó el tratamiento global de las FTOP mediante un sistema integrado que incluyó el tratamiento biológico y el tratamiento con membranas del efluente de salida del mismo. Este artículo ha sido publicado en la revista Journal of Cleaner Production (sección VI.2.4).

Metodología experimental

Etapa-1: Tratamiento biológico.

Tuvo una duración de 208 días. Se llevó a cabo con el reactor SBR-1, utilizado en la puesta en marcha, también utilizado en el estudio de evaluación del tratamiento biológico en función de la concentración de nutrientes. Este reactor

también se usó en los ensayos de alternancia de fases anaerobias y aerobias (sección V.3.3), que aunque en esta memoria se explica en la sección anterior, cronológicamente tuvo lugar después de esta. Durante el periodo experimental se utilizaron cuatro FTOP, nombradas desde FTOP-1 a FTOP-4.

- *Parámetros operacionales:* A excepción del volumen de influente/efluente y por consiguiente del TRH, el resto de parámetros operacionales se mantuvieron conforme a las especificaciones de la Tabla V.1. Las variaciones se realizaron en función de la FTOP utilizada (ver Tabla V.4):
 - a) Para las tres primeras FTOP se mantuvo el F/M, variando el TRH en función de la DQO de la FTOP utilizada. En los últimos 40 días de operación se recogieron 15 L de efluente, que se guardaron en nevera a 4°C para someterlos al tratamiento terciario.
 - b) Para la FTOP-4 se decidió mantener el TRH, aumentando con ello F/M al doble, ya que su DQO doblaba la de DQO de la FTOP-3.

Tabla V.4. Parámetros operacionales del SBR-1 durante el tratamiento integrado (Biológico+UF+NF).

Muestra	V _{infl/eflu} (mL)	HRT (días)	F/M ^(*) (kg DQO·kg SSVLM ⁻¹ ·d ⁻¹)	Días de operación
FTOP-1	150	40		0-35
FTOP-2	290	20.7	0.106 ± 0.017	36-74
FTOP-3	360	16.7		74-155
FTOP-4	360	16.7	0.212 ± 0.043	156-208

* Para un rango de SSVLM entre 3000-4000 mg·L⁻¹.

- *Análisis:* Los análisis de las FTOP, efluentes y LM fueron los mismos y se realizaron con la misma periodicidad, que los especificados en la sección V.3.2.1.

Etapa-2: Ultrafiltración.

El influente de la UF fue el efluente del tratamiento biológico, filtrado previamente a 60 μm (filtro de cartucho de Nylon) para eliminar la presencia de pequeños flóculos de biomasa que pudieran quedar. Para la UF se utilizó una membrana plana de poliéter sulfona, con un corte molecular de 5 kDa (Serie UP005 de Microdyn-Nadir). La planta piloto utilizada fue la descrita en la sección IV.2.6 (Figura IV.12).

- *Parámetros operacionales:* El ensayo de UF se llevó a cabo a 25°C, 3 bares y una velocidad de 2,2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (caudal aproximado de 300 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). El rechazo se recuperó en el tanque de alimentación, hasta un factor de reducción del volumen de 2,1.
- *Limpieza de la membrana:* Se llevó a cabo a T^a ambiente, 0,6 bares y 300 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, con el siguiente protocolo: enjuagado con agua osmotizada (9 min), limpieza con una disolución de NaOH (pH = 11) durante 30 min a 30°C, enjuagado con agua osmotizada (9 min), limpieza durante 5 min con una disolución de ácido cítrico (1% peso/volumen) y un nuevo enjuagado con agua osmotizada (9 min).
- *Análisis:* Se analizó el efluente filtrado del SBR, el permeado y el rechazo final de la UF. Los parámetros determinados fueron: pH, conductividad, turbidez, color (FZ), SS, concentración de fenoles totales y DQO soluble. Además, se obtuvo el perfil fenólico del influente y del permeado.

Etapa-3: Nanofiltración.

El influente para la NF fue el permeado obtenido en la UF. Se utilizó una membrana de poliamida de la Serie NF245 de DOW, con un corte molecular aproximado de 300 Da. La planta piloto está descrita en la sección IV.2.6, en la que se ha nombrado como NF2 (Figura IV.14).

- *Parámetros operacionales:* Se operó a 25°C, con una presión transmembranal de 15 bares y con una velocidad de 1,5 m·s⁻¹ (caudal aproximado de 140 L·h⁻¹). En este caso se trabajó a concentración constante, recuperando el rechazo y el permeado en el tanque de alimentación.
- *Limpieza de la membrana:* Se realizó a T^a ambiente, con el mismo caudal y sin presión. Se hicieron enjuagues con agua del grifo y agua osmotizada hasta que la conductividad del rechazo fue igual a la del agua influente. Posteriormente, se hizo un lavado con agua osmotizada hasta que la conductividad del permeado fue igual a la del agua influente. No fue necesario aplicar limpieza química.
- *Análisis:* Para el permeado de la NF, una vez se alcanzaron las condiciones estacionarias, se midió: pH, conductividad, turbidez, color (FZ), concentración de fenoles totales, DQO soluble y perfil fenólico.

V.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Ferrer-Polonio, A. Iborra-Clar, J.A. Mendoza-Roca, L. Pastor-Alcañiz, Fermentation brines from Spanish style green table olives processing: treatment alternatives before recycling or recovery operations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 131–137. doi:10.1002/jctb.4550.
- [2] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, L. Pastor-Alcañiz, Adsorption of raw and treated by membranes fermentation brines from table olives processing for phenolic compounds separation and recovery, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 2094–2102. doi:10.1002/jctb.4807.
- [3] U. Beker, B. Ganbold, H. Dertli, D.D. Gülbayir, Adsorption of phenol by activated carbon: Influence of activation methods and solution pH, *Energy Convers. Manag.* 51 (2010) 235–240. doi:10.1016/j.enconman.2009.08.035.
- [4] S. Kumar, M. Zafar, J.K. Prajapati, S. Kumar, S. Kannepalli, Modeling studies on simultaneous adsorption of phenol and resorcinol onto granular activated carbon from simulated aqueous solution, *J. Hazard. Mater.* 185 (2011) 287–294.
- [5] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, J. Alonso-Molina, L. Pastor-Alcañiz, Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry, *Chem. Eng. J.* 273 (2015) 595–602. doi:10.1016/j.cej.2015.03.062.
- [6] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, J.L. Alonso-Molina, L. Pastor-Alcañiz, Biological treatment performance of hypersaline wastewaters with high phenols concentration from table olive packaging industry using sequencing batch reactors, *J. Ind. Eng. Chem.* In Press (2016). doi:10.1016/j.jiec.2016.07.046.
- [7] P.N. Polymenakou, E.G. Stephanou, Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*, *Biodegradation.* 16 (2005) 403–413.
- [8] Shweta, Dhandayuthapani, Optimization of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* isolated from industrial effluent, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4 (2013) 405 – 413.
- [9] E. Ferrer-Polonio, N.T. García-Quijano, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, Effect of alternating anaerobic and aerobic phases on the performance of a SBR treating effluents with high salinity and phenols concentration, *Biochem. Eng. J.* 113 (2016) 57–65. doi:10.1016/j.bej.2016.05.010.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

VI.1. PRETRATAMIENTOS	259
VI.1.1. Tratamientos alternativos previos a la operación de reciclado o recuperación	259
VI.1.1.1. <i>Introduction</i>	260
VI.1.1.2. <i>Materials and Methods</i>	263
VI.1.1.3. <i>Results and Discussion</i>	266
VI.1.1.4. <i>Conclusions</i>	277
VI.1.1.5. <i>References</i>	278
VI.1.2. Recuperación de compuestos fenólicos de las FTOP para su valorización	283
VI.1.2.1. <i>Introduction</i>	284
VI.1.2.2. <i>Materials and Methods</i>	287
VI.1.2.3. <i>Results and Discussion</i>	291
VI.1.2.4. <i>Conclusions</i>	305
VI.1.2.5. <i>References</i>	306
VI.2. TRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	311
VI.2.1. Puesta en marcha.....	311
VI.2.1.1. <i>Introduction</i>	312
VI.2.1.2. <i>Materials and Methods</i>	315
VI.2.1.3. <i>Results and Discussion</i>	323
VI.2.1.4. <i>Conclusions</i>	333
VI.2.1.5. <i>References</i>	334
VI.2.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos	341
VI.2.2.1. <i>Introduction</i>	342
VI.2.2.2. <i>Materials and Methods</i>	344

VI.2.2.3.	<i>Results and Discussion</i>	352
VI.2.2.4.	<i>Conclusions</i>	363
VI.2.2.5.	<i>References</i>	364
VI.2.3.	Influencia de los parámetros operacionales sobre la eliminación de la materia orgánica y la población protista del fango activo.....	369
VI.2.3.1.	<i>Introduction</i>	370
VI.2.3.2.	<i>Material and Methods</i>	373
VI.2.3.3.	<i>Results and Discussion</i>	380
VI.2.3.4.	<i>Conclusions</i>	397
VI.2.3.5.	<i>References</i>	398
VI.2.4.	Reducción del consumo energético	405
VI.2.3.1.	<i>Introduction</i>	407
VI.2.3.2.	<i>Material and Methods</i>	409
VI.2.3.3.	<i>Results and Discussion</i>	415
VI.2.3.4.	<i>Conclusions</i>	426
VI.2.3.5.	<i>References</i>	427
VI.3.	TRATAMIENTO INTEGRADO: COMBINACIÓN DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO Y MEMBRANAS	433
VI.3.1.	Combinación de tecnologías: tratamiento biológico y membranas.....	433
VI.3.1.1.	<i>Introduction</i>	434
VI.3.1.2.	<i>Materials and Methods</i>	437
VI.3.1.3.	<i>Results and Discussion</i>	444
VI.3.1.4.	<i>Conclusions</i>	455
VI.3.1.5.	<i>References</i>	455
VI.4.	COSTES DE OPERACIÓN.....	463

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación, a través de las publicaciones realizadas. Cada una de estas publicaciones engloba una parte de las actuaciones llevadas a cabo en el tratamiento integral de las FTOP.

En primer lugar se analizan los pretratamientos llevados a cabo, los cuales tuvieron una doble finalidad:

- Reducción de la carga contaminante en las FTOP, donde el objetivo principal fue disminuir al máximo la cantidad de sólidos en suspensión, la turbidez y la concentración de materia orgánica. Dentro de este último parámetro, se le dio una especial importancia a la eliminación de compuestos fenólicos.
- Recuperación de compuestos fenólicos para su valorización.

Para conseguir la reducción de contaminantes se aplicaron tres pretratamientos físico-químicos: ajuste de pH con posterior sedimentación, tratamiento con coagulantes y floculantes con y sin ajuste de pH con posterior sedimentación y por último, adsorción con carbón activo en polvo. Los resultados obtenidos quedan detallados en la sección VI.1.1. Para conseguir la recuperación de compuestos fenólicos se utilizó una resina polimérica, en la que se adsorbieron los compuestos fenólicos presentes en las FTOP y posteriormente, se recuperaron utilizando un disolvente orgánico. Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental llevado a cabo, se recogen en la sección VI.1.2.

En segundo lugar se presenta el estudio del tratamiento biológico de las FTOP, utilizando reactores secuenciales tipo SBR. Este estudio engloba la puesta en marcha (sección VI.2.1) y la optimización del tratamiento. Para optimizar el sistema se tuvieron en cuenta aspectos relacionados con el rendimiento de los reactores y aspectos energéticos. En el primero caso se llevaron a cabo diversas actuaciones encaminadas a disminuir el tiempo de retención hidráulico: 1) incrementando el rendimiento de eliminación de contaminantes, mediante la

adición extra de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y aumentando la temperatura del reactor hasta los 30°C y 2) reduciendo la concentración de materia orgánica inicial de las FTOP aplicando uno de los pretratamientos propuestos, en concreto la adsorción con carbón activo. Los resultados obtenidos quedan expuestos en la sección VI.2.2 y sección VI.2.3. En cuanto a la optimización energética, se estudió la posibilidad de reducir los costes asociados a la aireación, mediante la alternancia de fases anaerobias y aerobias durante la fase de reacción. Los resultados y conclusiones han quedado incluidos en la sección VI.2.4.

Este capítulo se cierra con la aplicación de un tratamiento terciario al efluente de salida del biológico, con membranas de ultrafiltración y nanofiltración en serie. Con ellos se constituye el tratamiento integral llevado pensado para la depuración y regeneración de las FTOP, planteado en los objetivos de esta Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos se detallan en la sección VI.3.

Por último se ha incluido una sección VI.4 en la que se realiza una evaluación de los costes de operación del tratamiento integral propuesto, el cual incluiría el pretratamiento de las FTOP con carbón activo en polvo o resinas, el tratamiento biológico de las mismas y el tratamiento del efluente de salida del biológico con membranas de UF y NF.

El formato original de los artículos se ha adaptado para facilitar su lectura y para cumplir con la Normativa de los Estudios de Doctorado de la Universitat Politècnica de València, en la que se establece que se debe utilizar la versión “postprint” o “versión de autor”, para no entrar en conflicto con los derechos declarados en el contrato de la publicación.

(<http://www.upv.es/entidades/EDOCTORADO/info/846298normalc.htm>)

VI.1. PRETRATAMIENTOS

VI.1.1. Tratamientos alternativos previos a la operación de reciclado o recuperación

Journal of Chemical Technology and Biotechnology [Explore this journal >](#)

Research Article

Fermentation brines from Spanish style green table olives processing: treatment alternatives before recycling or recovery operations

[Eva Ferrer-Polonio](#) [✉](#), [Alicia Iborra-Clar](#), [José A Mendoza-Roca](#),
[Laura Pastor-Alcañiz](#)

First published: 14 October 2014 [Full publication history](#)

DOI: [10.1002/jctb.4550](https://doi.org/10.1002/jctb.4550) [View/save citation](#)



View Issue TOC
Volume 91, Issue 1
January 2016
Pages 131-137

This is the peer reviewed version of the following article: “Fermentation brines from Spanish style Green table olives processing: treatment alternatives before recycling or recovery operations, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 91 (1) (2016), 131-137”, which has been published in final form at DOI: 10.1002/jctb.4550. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

Abstract

BACKGROUND: Fermentation brine from Spanish style green table olives processing (FTOP) is characterized by very high conductivity (around 88 mS·cm⁻¹), high values of suspended solids (near 1300 mg·L⁻¹), chemical oxygen demand (around 17900 mg·L⁻¹) and total phenols (1000 mg·L⁻¹). In this paper, fermentation brines have been exhaustively characterized and pH adjustment-

sedimentation, coagulation-flocculation-sedimentation and adsorption with activated carbon have been evaluated.

RESULTS AND CONCLUSIONS: The pre-treatment selection will depend on the final FTOP management. If no polyphenols elimination is required in view of a further recovery, the best pre-treatment is pH adjustment to 9 plus sedimentation. The removal efficiency achieved were 33.1% solid suspended, 82.5% turbidity and only 10.4% of polyphenols. However, if the final FTOP treatment was biological, the best pre-treatment is adsorption with powder active carbon, because this pre-treatment implies the maximum reduction of phenols in FTOP, which inhibit microorganism activity in the biological process. The maximum in total phenols removal efficiency was 96.0% with 8 g·L⁻¹ of BM8 powder activated carbon (21% soluble COD).

Keywords: Fermentation brines; Polyphenols; Pre-treatments; Table olives.

VI.1.1.1. Introduction

Table olives production is mainly concentrated on Mediterranean countries such as Spain, Italy, Greek, Tunisia and Morocco [1]. In particular, Spain is the biggest table olives producer in the World. The average world production was between 2005 and 2011 of 2,150,000 tonnes, corresponding 508,000 to the Spain's production, i.e. 24% of the world production [2].

The aim of the table olive processing is to convert the olive tree fruit into an edible product by eliminating its bitterness, which is mainly due to oleuropein. This is a polyphenol that can only be found in olives. The process firstly includes the treatment with sodium hydroxide solution (1-2% w/v) during 8-12 hours. In this stage, oleuropein is hydrolysed [3]. Sodium hydroxide penetrates through approximately three quarters of the fruit flesh, remaining a flesh volume around the bone unaffected. This unaffected part will provide the sugar

content for the further fermentation. After this stage, olives are rinsed and submerged in brine (4-8 % w/v) of sodium chloride and lactic acid is added for pH adjustment. The organoleptic properties of olives are improved by this solution, enhancing simultaneously the growth of *Lactobacter lactobacillus*, which is responsible for the fermentation. This stage is slow (around 2 months). After it, table olives are prepared for their use.

Wastewater generated during fermentation process of table olives processing (FTOP) is in the range of 3.9 and 7.5 m³ per ton of olives [1]. This volume is only 20% of the total wastewater produced by a table olive processing industry but it contributes to 80-85% of the total pollution [4]. The simultaneous presence of high organic matter and phenolic compounds (soluble COD around 17.9 g·L⁻¹ and total phenols concentration of 1045 mg·L⁻¹) and the enormous conductivity (around 88 mS·cm⁻¹) due to the high salt concentration make difficult the brine treatment. Thus, Romero-Barranco et al. [5] proposed some general guidelines for the treatment of spent brines or osmotic solutions, highlighting the main difficulties in their treatment. These authors proposed the conventional physic-chemical processes (adsorption with activate carbon and ultrafiltration) as pre-treatments, although they no reported results in term of removal efficiencies.

The biological treatment of these effluents is also very difficult to carry out. The salinity shocks by fermentation brines or osmotic solutions discharged to municipal wastewater treatment plants cause physical and biochemical changes of the activated sludge [6]. If a separated biological treatment is carried out for the fermentation brines, the high salinity and the phenols concentration will require very high hydraulic retention times in the reactors. Additionally, the adapted biomass or isolated bacterial strains will be necessary due to the inhibitory effect in the biomass of phenolic compounds and salt concentration [7, 8].

Unlike olive mill wastewaters (OMWW) there are hardly papers dealing with pre-treatments of table olive processing wastewaters. The treatment of OMWWs has similar problems to those of the FTOP since polyphenols would

inhibit their biological treatment. However, the OMWW conductivity is considerably lower and suspended solids and COD concentrations are much higher in comparison with the FTOP. The main characteristics of the OMWWs depending on the olive oil production method were reported by Azbar et al. [9] Paraskeva and Diamadopoulos [10] summarized the techniques used for OMWWs treatment. It is interesting to highlight that the COD removal efficiencies were lower than 50% using separated physico-chemicals treatments; thereby a process combination was necessary to enhance the treatment efficiency. In the last years, the adsorption has been reported as one of the most promising OMWW pre-treatment in view of a further biological treatment. The adsorption achieves high polyphenol removal efficiencies [11], also it can be used as a treatment before the use of OMWW for hydrogen photo-production [12]. Barbera et al. [13] studied adsorption as the only treatment before the OMWW application to a particular agricultural purpose. Thus, these authors achieved a 95% of polyphenols removal with 80 g·L⁻¹ of activated carbon.

Focusing on the FTOPs treatment, Segovia-Bravo et al. [14] studied the ozonation of fermentation brines with the aim of eliminating both polyphenols and microorganisms in order to reuse the brine. García-García et al. [15] proposed electro-coagulation as pre-treatment of a further biological process. According to the authors, most of the phenols in the wastewater from the table olive packaging industry were removed, what allowed treating the effluent in a biological process.

Thus, only a few papers have been found in the literature about the partial treatment of table olive processing wastewaters. It is evident that pre-treatments can be carried out either to eliminate polyphenols in view of a further biological treatment or to preserve them with the aim of applying a membrane process for their recovery. In this paper both possibilities are covered with the three pre-treatments studied: pH adjustment plus sedimentation, coagulation/flocculation plus sedimentation and adsorption.

VI.1.1.2. *Materials and Methods*

Wastewater

Fermentation brine was provided by a table olive packaging industry located in Comunidad Valenciana (Spain). Before its use, wastewater was stored at a temperature of 4°C.

Chemicals

HCl (6 N) y NaOH (10 M) solutions were prepared for pH adjustment. For the total phenols analysis hexane, ethyl acetate, methanol and sodium carbonate (Panreac) and Folin & Ciocalteu's reagent (Sigma Aldrich) were used. Table VI.1 and Table VI.2 show the different activated carbons (Chiemivall) and chemicals for coagulation-flocculation (Derypol) added in the adsorption and physico-chemical tests, respectively.

Table VI.1. Powder activate carbon.

Activate carbon	Characteristics	pH
Clarimex 061 CAE	Pinewood activated with phosphoric acid macroporous	2-4
Clarimex 061 GAE	Modified from CAE	4.5-6.5
BM8	Bituminous activated with water vapor micro-mesoporous	9-10
CCP80	Coconut shell activated with water vapor	9-11

Table VI.2. Coagulants and flocculants.

Coagulants		Characteristics	
GT-25	Vegetable Origin (Acacia)		
K-225	Synthetic. Suitable for secondary clarifier		
HA-89	Synthetic. Specific for cutting oils		
Flocculants	Characteristics	Ionic character	Molecular weight
ZW-332	Amphoteric	-	High
TG-325		Low	Very high
DR-3000	Cationic	Medium	High
DF-100		High	High
GO-2030	Anionic	High	Very high

Analyses

For the characterization study 20 samples were analysed by measuring pH, conductivity, turbidity, total phenols (T.Ph), sodium (Na^+), chloride (Cl^-), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS). The phenolic profile was analysed in six samples selected according to the measured total phenols concentration, in order to obtain the phenolic profile in samples with different total phenols content, including the maximum and minimum concentrations.

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (Crison), respectively. The turbidity was determined with a Turbidimeter D-112 from Dinko Instruments. The SS and SSV were measured according to APHA, 2005 [16]. The ions and the soluble COD concentrations were analysed by using kits and a Spectrophotometer DR600 (Hach Lange).

Phenol total content determination and HPLC analysis

For the polyphenols measurement, all samples were previously treated in order to extract them according to El-Abbassi et al. [17]. The extracts were brought to dryness in a rotary evaporator (Rotavapor R-114 from BÜCHI) at 40°C and the residue was dissolved in methanol. The extracts obtained were used for total phenols and UPLC-PDA analysis. Total phenols (simple phenolic and polyphenolic compounds) were measured spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu method [18]. Results were expressed as ppm equivalent of tyrosol ($\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$). UPLC-PDA analysis were carried out on Waters Acquity UPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a binary solvent manager, sample manager, column compartment, and 2996 PDA detector, connected to Waters Masslynx 4.1 software. The separation was carried out using a Waters BEH C18 column ($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$) at 40 °C. The optimal chromatographic conditions were established: solvent system, phase A, 1 % formic acid in acetonitrile, and phase B, 1 % formic acid in water; gradient conditions were as follows: 100% B at 0 min for 1 min to 55% A in 25 min, then 100% A at 30 min, held for 5 min, returned to 100% B in 2 min, and equilibrated for 3 min before the next injection; flow rate of $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and injection volume of $5 \mu\text{L}$. The samples (7 mg) were reconstituted in 1 mL of IS (hydroquinone at $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in MeOH). External calibration curves were obtained for different analytes in different concentrations which were dissolved in the IS solution and injected in triplicate. Results were expressed as ppm of phenolic compound tested.

Jar tests

Jar test equipment was used both for mixing the neutralization chemicals in the pH adjusting experiments and for powder activated carbon and coagulation/flocculation experiments.

For all these tests, 500 mL of wastewater were poured in each beaker of a Floccumatic 4 jar-test apparatus from JP Selecta. In the pH adjustment tests, the range was between 2 and 11 and the temperature was 22°C. Chemicals were added at a stirring velocity of 150 rpm. Afterwards stirring was lowered to 60 rpm during 5 minutes in order to enhance floc formation. In the coagulation-flocculation tests, coagulants were added at 150 rpm (reaction time was 2 minutes for K225 and H89 and 8 min for the coagulant GT-25 according to provider recommendations). Temperature was maintained at 22 °C. Then pH adjustment was performed for enhancing the effect of the flocculant. Afterwards flocculants were added and stirring was lowered to 60 rpm during 5 minutes. In the adsorption tests the reaction time ranged between 1 and 4 hours at 150 rpm. After the corresponding mixing phases the samples were settled during 90 minutes.

VI.1.1.3. Results and Discussion

Wastewater characterisation

Table VI.3 shows the mean values and the standard deviation calculated after the analysis of 22 FTOPs that were referred to as FTOP i , where i is the number of the sample processed ($i = 1 - 22$).

It can be observed that the FTOP is acidic (pH around 4). Conductivity is very high, having an average value of 88 mS·cm⁻¹ due mainly to the sodium chloride added for olives conservation. Suspended solids concentration is also high (around 1319 mg·L⁻¹), what implies high turbidity values. Concerning organic matter, soluble COD value average for the 22 samples is 17.9 g·L⁻¹ and the T.Ph concentration is 1045 mg TY·L⁻¹. In comparison with olive mill wastewater (more widely studied), conductivity of FTOP is considerably higher, whereas the concentration of SS, soluble COD and pH value are lower.

Table VI.3. Wastewater characterization.

Physicochemical parameters	Contents
pH	4.0±0.1
Electrical Conductivity (mS·cm⁻¹)	88±11
Turbidity (NTU)	328±128
Soluble COD (g·L⁻¹)	17.9±4.1
Na⁺ (g·L⁻¹)	70.6±1.7
Cl⁻ (g·L⁻¹)	62.7±1.5
SS (mg·L⁻¹)	1319±622
SSV (%)	53±7
Total Phenols (mg TY·L⁻¹)	1045±245

It has to be highlighted that the polyphenols concentration and the phenolic profile in the wastewater will depend on the cultivar, the degree of ripeness and the duration of the three phases of the table olives production (debitting, rinsing and brining). The results of the analysis of the phenolic profile indicated that hydroxytyrosol (HTY) and tyrosol (TY) were present in the FTOP wastewater. However, other polyphenols were not detected. These results are in agreement to those reported by Charoenprasert and Mitchell [19]. These authors concluded that for the Spanish-Style green olives processing, oleuropein is cleaved in the debittering stage, what drives to hydroxytyrosol and oleoside-1-methyl ester. Meanwhile hydroxytyrosol is stable, oleoside-1-methyl ester concentration decreases rapidly due to the conversion to elenolic acid and glucose. On the other hand, tyrosol is formed from the ligstroside hydrolysis. These results are also similar to those reported by García-García et al. [15], who only identified HTY and TY and their glucosides in the FTOP fermentation brines. For all characterized FTOP, HTY was the polyphenol with the highest concentration. Its concentration varied between 263 and 880 mg HTY·L⁻¹ for the FTOPs with 885 mg TY·L⁻¹ and 1536 mg TY·L⁻¹ of the T.Ph concentration, respectively. These were the maximum and minimum concentrations measured in 22 FTOPs analysed. Tyrosol concentrations varied between 45 and 132 mg

TY·L⁻¹, for the same samples. However, in the literature different results can be also found. Parinos et al. [20] reported only 76 mg·L⁻¹ of T.Ph in the fermentation brine from the Spanish-Style green olives processing. These authors reported that the most concentrated polyphenol was dibutyl phthalate and the concentration of HTY was lower than 10 mg·L⁻¹.

Wastewater pre-treatments

Different wastewater samples were used during the experiments. However, for a better comparison among the different tested pre-treatments, a final series of experiments with the same wastewater sample was performed (FTOP₂₀). FTOP₂₀ was characterized by pH = 4, conductivity = 73.7 mS·cm⁻¹, soluble COD = 14.2 g·L⁻¹, SS = 971 mg·L⁻¹, turbidity = 186 NTU, T.Ph = 885 mg TY·L⁻¹, HTY = 263 mg HTY·L⁻¹ and TY = 45 mg TY·L⁻¹.

pH adjustment and sedimentation

Figure VI.1 shows FTOP₂₀ treatment efficiency in terms of SS, soluble COD, turbidity and T.Ph removal. It is observed that when FTOP₂₀ pH was increased or decreased, from the original pH of the sample (pH = 4), turbidity was reduced. The highest turbidity reduction was achieved at pH 10 and 11 with 95% and 97 % of turbidity removal, respectively. As expected, SS concentration followed the same tendency as turbidity (42% SS removal was obtained at pH = 10 and 45% at pH = 11).

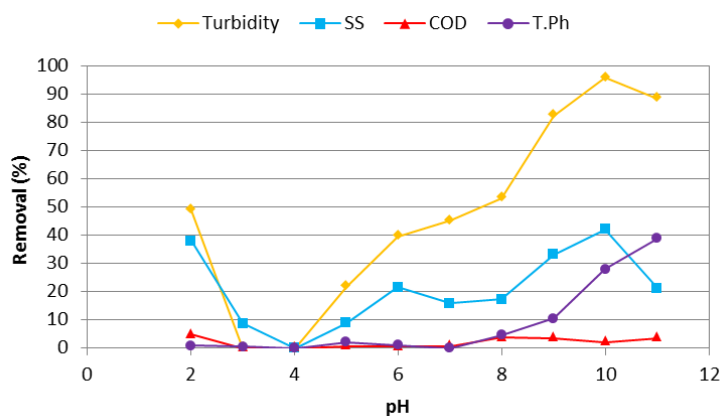


Figure VI.1. Removal percentage of turbidity, SS, soluble COD and T.Ph in FTOP₂₀ after pH adjustment and sedimentation tests.

Concerning the phenolic compounds, no variation was observed up to pH values of 8. Above pH = 8, T.Ph removal was increasing. Thus, at pH = 11 phenols removal was 39% (it was the highest removal efficiency). This reduction can be explained by hydroxytyrosol oxidation. Oxidation did not occurred in the storage tank of the fermentation brine due to the anaerobic conditions [21]. Finally, soluble COD was not eliminated as expected. Above pH = 8 a slight reduction was achieved due to phenols removal.

Coagulation-Flocculation

In the first jar-tests series, all the flocculants were tested with every coagulant. Initial coagulant and flocculant concentrations (1000 and 30 mg·L⁻¹, respectively) were recommended by the chemicals supplier in view of the wastewater characteristics. The turbidity was measured at every test with the aim of selecting the best coagulant/flocculant. This test was performed with FTOP₈ (turbidity = 181 NTU). Figure VI.2 illustrates the turbidity achieved after treatment.

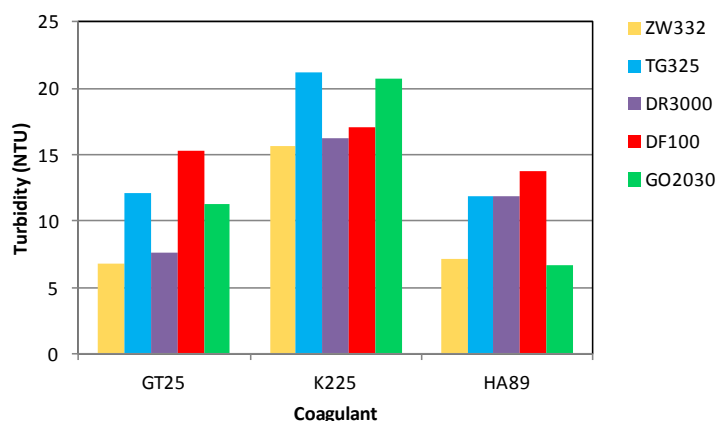


Figure VI.2. FTOP₈ turbidity after pre-treatment with three coagulants (1000mg·L⁻¹) and five flocculants (30 mg·L⁻¹).

It is observed that the lowest turbidity values were obtained for GT25 and HA89 coagulants. For GT25 coagulant the minimum turbidity (6.8 NTU) was obtained in combination with ZW332 flocculant (96.3% of turbidity reduction was achieved). For HA89 coagulant, GO2030 and also ZW332 flocculants yielded the highest turbidity reductions with 96.3 and 96.1%, respectively.

Once GT25 and ZW332 were selected, further jar-tests were carried out to determine the most appropriate concentrations. In the second test series, different amounts of GT25 (between 100-2000 mg·L⁻¹) were tested with ZW332 (30 mg·L⁻¹). This test was performed with FTOP₉ (turbidity = 328 NTU). Figure VI.3 illustrates these results.

The highest turbidity reduction (86.6%), involving the minimum chemicals concentration, was for 800 mg·L⁻¹ of GT25 and 30 mg·L⁻¹ of ZW332. For these concentrations, the jar-tests experiments varying pH (from 2 to 11) were performed with FTOP₂₀.

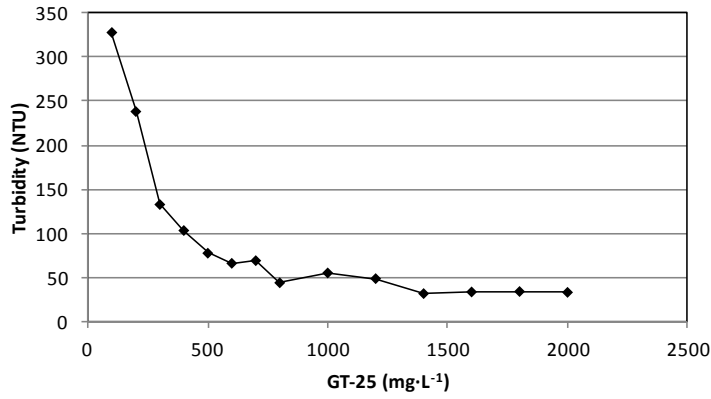


Figure VI.3. FTOP, turbidity after pre-treatment with GT25 (between 100-2000 mg·L⁻¹) + ZW332 (30 mg·L⁻¹).

Figure VI.4 shows the treatment efficiency in terms of SS, soluble COD, turbidity and T.Ph removal.

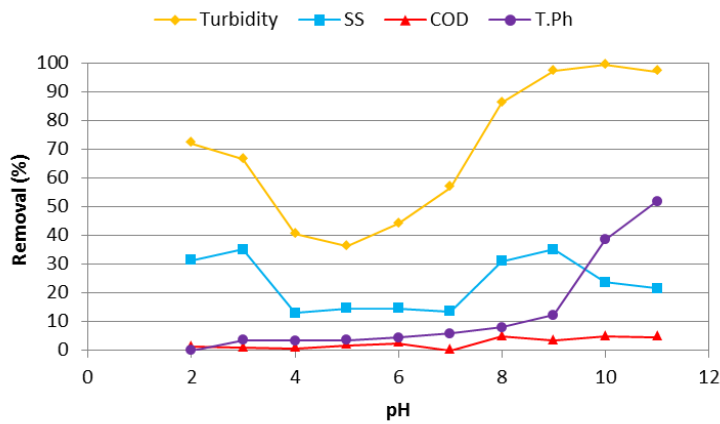


Figure VI.4. Removal percentage of turbidity, SS, soluble COD and T.Ph after pre-treatment with GT25 (800 mg·L⁻¹) + ZW332 (30 mg·L⁻¹) for different pH.

The pollutants removed in the tests at different pH values in the coagulant/flocculant treatment, showed a very similar behaviour to that observed in the pH adjustment/sedimentation tests. Turbidity was reduced by either increasing or decreasing pH of FTOP₂₀. The maximal turbidity reduction was 99.3% at pH = 10. The SS removal efficiencies remained constant (around 14%) between pH 4 to 7. The maximal removal efficiencies were at pH = 3 and pH = 9, in both cases around 35%. The low SS reduction, in comparison with the high turbidity removal efficiency, can be due to the low size and density of the SS. König et al. [22] obtained similar values in turbidity and COD removal efficiencies treating pickle wastewater with 8.2 g·L⁻¹ of chloride concentration with organoclays as flocculant. The removal efficiency of SS reported by these authors ranged between 59 and 73%.

Concerning the T.Ph, chemicals enhanced their elimination to above pH 8, due to their adsorption on the formed flocs in addition to hydroxytyrosol oxidation. At pH = 11, 51.9 % of T.Ph were eliminated, what also implied a certain soluble COD reduction.

Powder activated carbon (PAC) adsorption

The aim of the PAC addition was to eliminate polyphenols in the FTOP in order to avoid an inhibitory effect in a further biological treatment. It has to be commented that a further PAC separation from the treated wastewater was necessary. This operation would also eliminate a part of the SS. However, this study was focused on polyphenols and COD removal.

Adsorption is an appropriate process to separate the phenolic compounds from the wastewaters [23]. The use of acid cracking plus granular activated carbon adsorption was studied by Farabegoli et al. [24] previous to the biological treatment of olive mill wastewater (OMW). These authors reported that this pre-treatment enhanced the phenols removal in the biological reactor.

In our work, it was tried to separate partially phenolic compounds in order to pre-treat FTOP wastewater in view to a further biological treatment. The FTOP contains a great variety of organic compounds, including substances that also can be removed by adsorption together with the polyphenols. The acidic pH in the FTOP favours the phenols adsorption onto the activated carbon [25, 26]. This can be explained by the predominance of the anionic form [27] of the polyphenols in alkaline solutions, increasing the repulsion forces between phenol molecules and activated carbon, since PAC is also charged negatively at the alkaline pH values [28].

Table VI.4 shows the T.Ph removal efficiencies with the four tested PACs. The first test was performed with FTOP₁₅ (18.5 g·L⁻¹ of soluble COD and 1391 mg·L⁻¹ of T.Ph concentration). The PAC concentration was 4 g·L⁻¹ and the reaction time were 4 hours. The highest polyphenols removal was achieved by BM8 (66.9 %), followed by CCP80 (57.5 %). This was due to the PACs pore size. Mesoporous or microporous in the activated carbons are more appropriate than macroporous ones for the removal of low molecular weight polyphenols. Additionally, the phenolic compounds of the FTOP are weak acids whose separation is enhanced by alkaline functional groups on the PAC surface [29].

Table VI.4. Total phenols removal efficiencies in the adsorption test with FTOP₁₅ and 4 g·L⁻¹ PAC concentration (4h reaction time).

PAC	T.Ph removal (%)
Clarimex 061 CAE	49.8
Clarimex 061 GAE	33.8
CCP80	57.5
BM8	66.9

The aim of the second tests series was to determine the time required in the phenols adsorption with BM8, for reaching the equilibrium concentration in the

wastewater. For it, different amounts of BM8 (2, 4 and 6 g·L⁻¹) were mixed with FTOP₁₉ (14.1 g·L⁻¹ of soluble COD and 929 mg TY·L⁻¹ of T.Ph concentration) and the T.Ph concentration was analysed after 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 120 minutes. Figure VI.5 shows these results. It can be observed that the T.Ph adsorption was fast, since in the first 15 minutes most of polyphenols were adsorbed. From 60 minutes on, the T.Ph concentration in FTOP₁₉ for all tests, remained practically constant. Thus, the equilibrium adsorption time for BM8 was 60 minutes and the T.Ph removal efficiencies in equilibrium were around 30%, 63% and 75% for 2, 4 and 6 g BM8·L⁻¹, respectively.

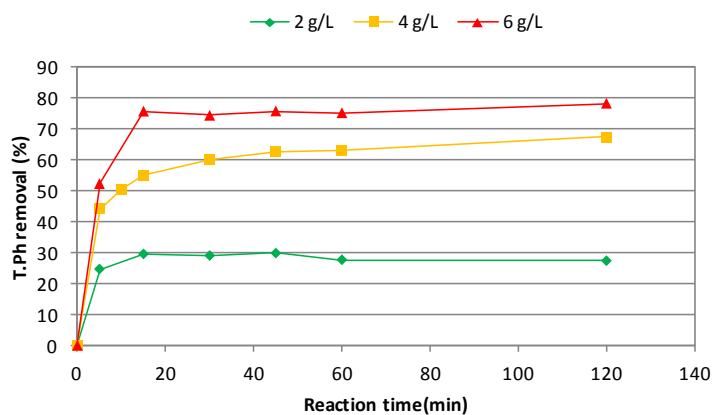


Figure VI.5. Total phenols percentage removal in FTOP₁₉ after PAC pre-treatment with 2 g·L⁻¹, 4 g·L⁻¹ and 6 g·L⁻¹ of BM8.

Isotherms representation leads to a better understanding of the adsorption process. Langmuir assumes a uniform surface and a single layer of adsorbed material [30] unlike Freundlich isotherm that assumes that adsorption is heterogeneous and there is not only a layer of adsorbed material [31]. The linear form of both isotherms equations are the following:

$$\text{Langmuir; } \frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L \cdot q_0} + \frac{1}{q_0} \cdot C_e \quad \text{Eq.(VI.1)}$$

$$\text{Freundlich; } \ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \cdot \ln C_e \quad \text{Eq.(VI.2)}$$

where C_e ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) is the T.Ph concentration at equilibrium, q_e ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the T.Ph mass adsorbed at equilibrium per g of BM8, q_0 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the maximal adsorption capacity and K_L ($\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$) is Langmuir coefficient. In Freundlich equation, n and K_f ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})^{-1/n}$) are both empirical coefficients. K_f indicates the adsorption capacity and n is related with the adsorption intensity. Thus, n higher than 1 means that the operating conditions are appropriate for the adsorption process [32, 33].

Figure VI.6 and Figure VI.7 show Langmuir and Freundlich isotherms for FTOP₂₀, respectively.

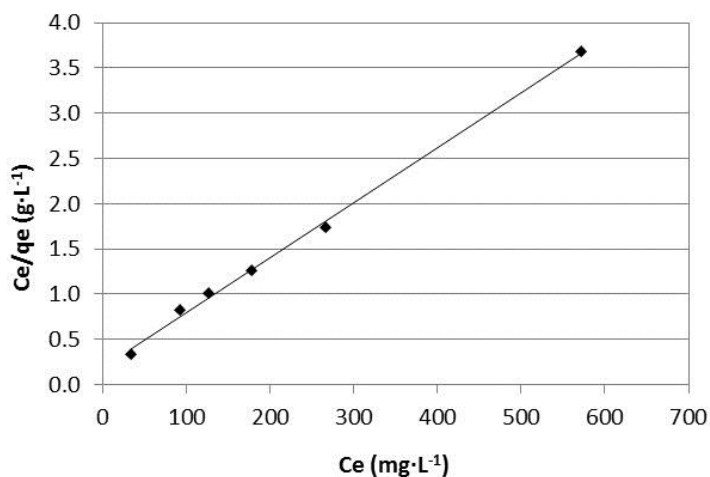


Figure VI.6. Langmuir isotherm for FTOP₂₀ (22°C).

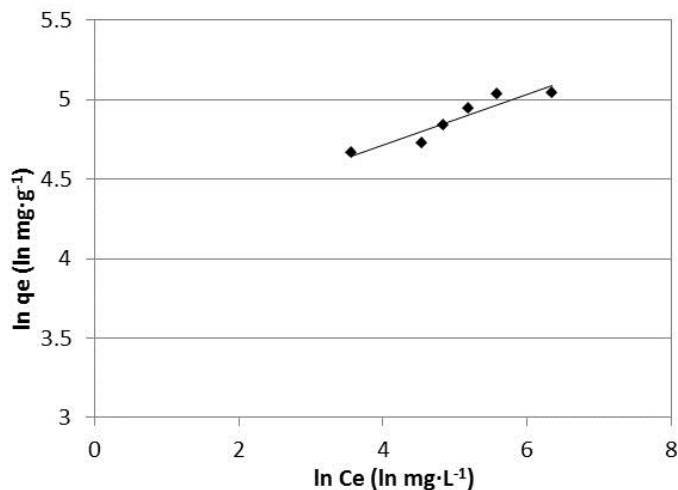


Figure VI.7. Freundlich isotherm for FTOP₂₀ (22°C).

The data obtained from the adsorption tests fitted to Langmuir equation was better than to Freundlich equation ($R^2 = 0.9973$ vs 0.8854). For Langmuir isotherm the calculated coefficients were: $q_0=163.934$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and $K_L=0.033$ ($\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$).

It has to be commented that the carbon is not a selective material for the adsorption. It means that the materials retained onto the PAC were not only polyphenols, also other organic compounds of the wastewater were adsorbed. For this reason, it was considered that tests had to be replicated with other FTOP, which containing more COD and T.Ph concentrations. In this way, FTOP₂₂ was analysed ($21.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for soluble COD and $1549 \text{ mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$ for T.Ph concentration). Figure VI.8 shows comparatively Langmuir isotherms for FTOP₂₀ and FTOP₂₂. It can be observed that all the data, considering both samples, fit to a straight line and the coefficient values were $q_0=175.439$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and $K_L=0.022$ ($\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$) with $R^2=0.9954$.

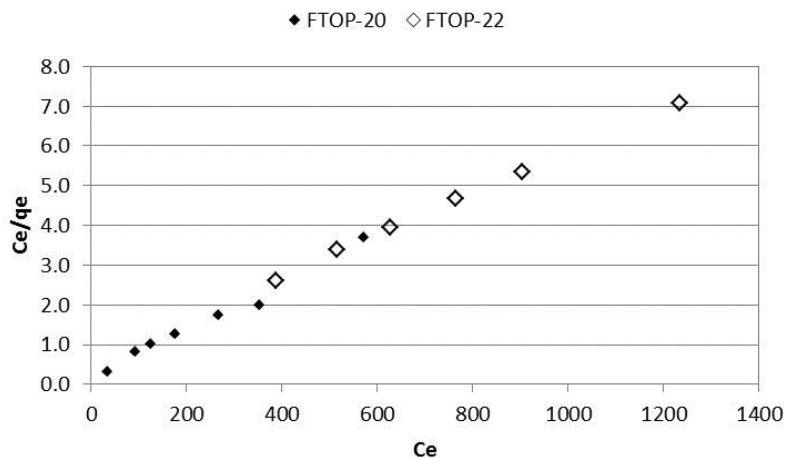


Figure VI.8. Langmuir isotherm for FTOP₂₀ and FTOP₂₂ (22°C).

VI.1.1.4. Conclusions

After characterizing 22 FTOPs samples, it can be concluded that their high conductivity (around $88 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), total phenols concentration (between 885 and $1536 \text{ mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$) and values of suspended solids and turbidity (around $1319 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 328 NTU, respectively) make very difficult their treatment. Thus, the selection of an appropriate pre-treatment is of paramount importance for the achievement of a successful final FTOP management.

The pre-treatment selection will depend on the final FTOP management. If no polyphenols elimination is required, in view of a further recovery (e.g. integrated membrane treatment for polyphenols recovery), the pH adjustment ($\text{pH} = 9$) and coagulation/flocculation at pH value of 9 are the best pre-treatments. For this pH conditions, both pre-treatments did only eliminate 10% of polyphenols. Also, the SS and turbidity removal efficiency with and without coagulant/flocculant addition were 35.0% and 33.1% and 97.2% and 82.5%,

respectively. These results show that the coagulation/flocculation chemicals slightly improved the pollutants removed. So, this little increases in the efficiency not enough to support the higher costs.

However, if the final FTOP treatment is the biological oxidation, the adsorption with PAC would be a treatment to be considered since high polyphenols removal efficiencies are achieved, what implies to reduce the biomass inhibition in the biological process. In the present work, the maximum amount in the T.Ph and soluble COD removal were 96.0% and 21% with $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of BM8. Besides, the PAC pre-treatment would enable to maintain the T.Ph concentration in feeding wastewater (increasing or decreasing the amount of BM8), in spite of variations of this parameter in FTOP samples.

VI.1.1.5. References

- [1] Kopsidas G.C., Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992), 629–631.
- [2] ASEMESA. Asociación de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. http://www.asesesa.es/content/datos_generales_del_sector. Last access date; December, (2013).
- [3] Marsilio V., Lanza B., Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity, *J. Sci. Food and Agric.* 76 (1998), 520–524.
- [4] Garrido-Fernández A., Brenes-Balbuena M., García-García P., Tratamiento de salmueras de fermentación de aceitunas verdes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, *Aceites y Grasas* 43 (1992), fascículo 5.

- [5] Romero-Barranco C., Brenes-Balbuena M., García-García P., Garrido-Fernández A., Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [6] Reid E., Liu X., Judd S.J., Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Membr. Sci.* 283 (2006), 164–171.
- [7] Moussavi G., Barikbin B., Mahmoudi M., The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR, *Chem. Eng. J.* 158 (2010), 498–504.
- [8] Haddadi A. and Shavandi M., Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas sp.* strain PH2-2 isolated from saline soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 29–34.
- [9] Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F., Ozer A., A review of waste management options in olive oil production, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34 (2004), 209–247.
- [10] Paraskeva P., Diamadopoulos E., Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006), 1475–1485.
- [11] Aytar, P., Gedikli, S., Sam, M., Farizoğlu, B., Çabuk, A., Sequential treatment of olive oil mill wastewater with adsorption and biological and photo-Fenton oxidation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013), 3060–3067.
- [12] Padovani, G., Pintucci, C., Carlozzi, P., Dephenolization of stored olive-mill wastewater, using four different adsorbing matrices to attain a low-cost feedstock for hydrogen photo-production, *Bioresour. Technol.* 138 (2013), 172–179.
- [13] Barbera, A.C., Maucieri, C., Ioppolo, A., Milani, M., Cavallaro, V., Effects of olive mill wastewater physico-chemical treatments on polyphenol abatement and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum Lam.*) germinability, *Water Res.* 52 (2014), 275–281.
- [14] Segovia-Bravo K.A., García-García P., Arroyo-López F.N., López-López A., Garrido-Fernández A., Ozonation process for the regeneration and recycling of

- Spanish green table olive fermentation brines, *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008), 63–472.
- [15] García-García P., López-López A., Moreno-Baquero J.M., Garrido-Fernández A., Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 17 (2011), 59–66.
- [16] APHA AWWA WEF, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, USA (2005).
- [17] El-Abbassi A., Khayet M., Hafidi A., Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [18] Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999), 152–178.
- [19] Charoenprasert S., Mitchell A., Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*), *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012), 7081–7095.
- [20] Parinos C.S., Stalikas C.D., Giannopoulos Th.S., Pilidis G.A., Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard Mater.* 145 (2007), 339–343.
- [21] Brenes M., Rejano L., Garcia P., Sanchez A.H., Garrido A., Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [22] König T. N., Shulami S., Rytwo G., Brine wastewater pre-treatment using clay minerals and organoclays as flocculants, *Appl. Clay Sci.* 67–68 (2012), 119–124.
- [23] Soto M.L, Moure A., Domínguez H., Parajó J.C., Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *J. Food Eng.* 105 (2011), 1–27.
- [24] Farabegoli G., Chiavola A., Rolle E., SBR treatment of olive mill wastewaters: dilution or pre-treatment?, *Water Sci. Technol.* 65 (9) (2012), 1684–1691.

- [25] Beker U., Ganbold B., Dertli H., Gülbayir D.D., Adsorption of phenol by activated carbon: Influence of activation methods and solution pH, *Energy Convers. Manage.* 51 (2010), 235–240.
- [26] Kumar S., Zafar M., Prajapati J.K., Kumar S., Kannepalli S., Modeling studies on simultaneous adsorption of phenol and resorcinol onto granular activated carbon from simulated aqueous solution, *J. Hazard Mater.* 185 (2011), 287–294.
- [27] Nadavala S.K., Swayampakula K., Boddu V.M., Abburi K., Biosorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads, *J. Hazard Mater.* 162 (2009), 482–489.
- [28] Guocheng L., Jiao H., Liu L., Hongwen M., Qinfang F., Limei W., Mingquan W., Yihe Z., The adsorption of phenol by lignite activated carbon, *Chin. J. Chem. Eng.* 19(3) (2011), 380–385.
- [29] Terzyk A.P., Molecular properties and intermolecular forces. Factors balancing the effect of carbon surface chemistry in adsorption of organics from dilute aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004), 9–29.
- [30] Weber T.W., Chakkravorti R.K., Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers, *AIChE J.* 20 (1974), 228–238.
- [31] Mohd Din A.T., Hameed B.H., Ahmad A.L., Batch adsorption of phenol onto physiochemical-activated coconut shell, *J. Hazard. Mater.* 161 (2009), 1522–1529.
- [32] McKay G., Blair H.S., Gardner J.R., Adsorption of dyes on chitin. I. Equilibrium studies, *J. Appl. Polym. Sci.* 27 (8) (1982), 3043–3057.
- [33] Saha T.K., Boumik N.C., Karmaker S., Ahmed M.G., Ichikawa H., Fukumori Y., Adsorption characteristics of reactive black 5 from aqueous solution onto chitosan, *Clean – Soil Air Water* 39 (10) (2011), 984–993.

VI.1.2. Recuperación de compuestos fenólicos de las FTOP para su valorización

Journal of Chemical Technology and Biotechnology [Explore this journal >](#)

Research Article

Adsorption of raw and treated by membranes fermentation brines from table olives processing for phenolic compounds separation and recovery

Eva Ferrer-Polonio [✉](#), José A Mendoza-Roca, Alicia Iborra-Clar, Laura Pastor-Alcañiz

First published: 25 September 2015 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/jctb.4807 [View/save citation](#)



View issue TOC
Volume 91, Issue 7
July 2016
Pages 2094–2102

This is the peer reviewed version of the following article: “Adsorption of raw and treated by membranes fermentation brines from table olives processing for phenolic compounds separation and recovery, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 91 (7) (2016), 2094-2102”, which has been published in final form at DOI: 10.1002/jctb.4807. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

Abstract

BACKGROUND: The fermentation brines from table olive processing are characterized by very high salinity and high organic matter concentration, which includes phenols of high value as hydroxytyrosol that is used by pharmaceutical and cosmetic industries.

RESULTS AND CONCLUSION: In this work, the adsorption with a phenols-selective resin (MN200) of raw and pre-treated by ultrafiltration or by ultrafiltration plus nanofiltration fermentation brine has been studied. The study included the adsorption and desorption process. Besides, the useful life of the resin was evaluated. The results indicated that resin MN200 above $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ yielded phenols separation efficiencies higher than 90%. However, the adsorption of nanofiltrated effluent separated phenols more selectively. The adsorption kinetics fitted properly to a pseudo-second order kinetics and Langmuir isotherm correctly model the adsorption process. The results of the intra-particle diffusion model show that the pore diffusion is not the only rate limiting step. Desorption process was carried out with ethanol and more than 85% of the phenolic compounds were recovered. The use of the resin during ten cycles showed that nanofiltrated effluent increased the useful time of the resin.

Keywords: Fermentation brines; Phenols adsorption; Phenols recovery; Polymeric resin; Table olive processing.

VI.1.2.1. Introduction

Olive oil and table olives are recognized as valuable sources of natural phenolic antioxidant compounds that provide health benefits. These natural antioxidants have applications against reactive species involved in aging and in inflammatory, coronary and degenerative diseases [1-3]. Therefore, the phenolic compounds from olives have applications as food additive, as pharmaceutical active substance and as a cosmetic ingredient.

The phenolic content of olive oil and oil mill wastewater has been thoroughly investigated. Thus, several studies about their phenolic compounds concentration can be found in the literature [4-7]. Nevertheless, there are only a few studies focused on the phenolic compounds of table olives effluents [8, 9].

Spain is the largest producer of table olives in the world, followed by Turkey, Egypt, Syria, Algeria, Argentina and Greece. The average world production was 2,472,700 tonnes, between 2009 and 2014, corresponding 524,700 to the Spain's production, i.e. 21% of the world production [10].

The aim of the table olive processing is to remove the bitterness from the fruit caused by oleuropein (characteristic polyphenol of the olives). This process entails three steps. Firstly, olives are submerged for 8-12 hours in sodium hydroxide solution (1-2% w/v), and oleuropein is hydrolysed [11]. Secondly, sodium hydroxide solution is removed, and two or three rinses cycles are performed to eliminating the excess alkali. In the final step, olives remain immersed in brine (4-8% w/v of sodium chloride) for several months.

During Spanish-style green olive processing there is an osmotic exchange between fruit and brine. Consequently, important changes in composition occur; mainly on soluble sugars, NaCl and phenolic compounds [12]. Thus, there is an important loss of phenolic compounds in olive fruit, due to the diffusion of these compounds to the brine. In this way, concentrations of protocatechuic acid, ferulic acid and oleuropein decrease in olives, meanwhile the phenols concentration increases in brines. The main phenolic compounds in wastewaters from the fermentation step of table olive processing (FTOP) are hydroxytyrosol (HTY) and tyrosol (TY) [13, 14]. The concentration of HTY is due to acid and enzymatic hydrolysis of oleuropein. TY may arise from the hydrolysis of ligstroside, a heterosidic ester of tyrosol and elenolic acid. The evolution of other phenolic compounds (caffeic, gallic, p-hydroxyphenylacetic, vanillic and benzoic acids) depends on the olive maturation stage [15]. HTY has the highest antioxidant capacity of these phenolic compounds. Besides, HTY has better properties than other natural antioxidants such as vitamin C, vitamin E or resveratrol [16].

The FTOP wastewater corresponds with 20% of the total wastewater volume generated in all stages of table olive processing, which is about 3.9–7.5 m³ per ton of green olives [17]. However, the FTOP contributes to 80-85% of the total pollution [18]. Therefore, it is of great interest to treat it separately. The FTOP

wastewater is an acidic stream (pH around 4) and its conductivity is very high, showing values close to $80 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Suspended solids (SS) concentration is also high (around $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), what implies high turbidity values. The concentrations of organic matter and total phenols are highly variable, and they depend primarily of processing method, cultivar and maturation degree [9]. The soluble COD can range between 6 and $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the total phenols concentration ranges among 500 and $1500 \text{ mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$.

The above mentioned characteristics make the FTOP wastewater treatment very difficult. The application of a biological process is complicated because the salinity shocks cause physical and biochemical changes of the activated sludge and the phenolic compounds can inhibit the biomass, primarily by bactericidal effect [19]. Other possible treatments are electro-coagulation [20], ozonation or Fenton's oxidation [21], but they are expensive and inappropriate for large wastewaters volumes. In addition, these treatments imply the phenols destruction and the valuable phenolic compounds would not be recovered.

Some techniques allowing phenol recovery or concentration from water solutions are membrane technologies and adsorption. Membrane processes, in particular ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis have been reported for many authors for concentrating the phenolic compounds from olive mill wastewater [21, 22], but they have not been reported for the FTOP wastewater. The adsorption process is one of the best techniques to eliminate the phenolic compounds in liquid-phase. There are several papers reporting the phenols adsorption efficiency with activated carbon [23, 24], new low-cost adsorbents [25-27] or polymer adsorbents [28, 29]. The most usual adsorbents for phenols separation in the water treatment are the activated carbons, but phenols recovery is difficult. Irreversible adsorption in carbon may be given by adsorbate bonding to specific functional groups on the active sites of the adsorbent or by oxidative polymerization of phenolic compounds onto the surface [25]. Nevertheless, the polymeric adsorbents have feasible regeneration under mild conditions and the most commonly used ones are based on polystyrene adsorbents crosslinked with divinylbenzene [30, 31].

In the present work, the phenols adsorption in the FTOP effluents has been studied with the non-ionic polymeric resin. Samples of both raw FTOP wastewater and FTOP effluents after membrane filtration (ultrafiltration and nanofiltration), were subjected to adsorption. The adsorption and desorption (by organic solvents) process of phenolic compounds were evaluated. Additionally, this study includes experiments for the resin reuse in different adsorption/desorption/activation cycles.

VI.1.2.2. Materials and Methods

Wastewater

The fermentation brine was provided by a table olive packaging industry located in Comunidad Valenciana (Spain). Experiments and characterization were carried out with two fermentation brine samples, which were previously filtered in a 60 µm sieve. Little pieces from olives that could be present in the FTOP and 35-40% of SS were removed in this step. The filtered samples were named FTOP-1 and FTOP-2. 15 L of FTOP-1 and FTOP-2 were ultrafiltered using a 5 kDa polyethersulfone membrane (UP005) supplied by Microdyn-Nadir. Transmembrane pressure (TMP) in the ultrafiltration was 2.5 bar. The ultrafiltrate samples were named UF-1 and UF-2. Finally, 10 L of UF-1 was filtered at a TMP of 15 bar with a nanofiltration membrane (NF245) supplied by Dow. The main characteristics of this membrane are the negligible rejection of monovalent ions and the molecular weight cut-off of 300 Da. The nanofiltrate permeate was named NF-1. Before their use, all wastewater samples were stored at a temperature of 4°C.

Resin

The adsorption tests were performed using MN200 resin. This resin was selected

from previous tests (data not shown). MN200 was non-ionic polymeric resin provided by Purolite Lt. It has a macroporous structure of polystyrene crosslinked with divinylbenzene and its physical appearance is spherical beads. Before being used on the adsorption experiments, MN200 was conditioned in sodium hydroxide solution (2% w/v) for 60 min (mixing at 150 rpm) and then was rinsed with distilled water (twice, 5 min mixing at 150 rpm).

As can be observed in Table VI.5, MN200 has a hydrophobic matrix and it has no properties for ion exchange.

Table VI.5. Physico-chemical characteristics of MN200 resin (data from supplier).

	Characteristics
Functional group	None
Ionic form	None
Moisture retention	57 – 61%
Mean diameter	535 ± 85 µm
Uniformity coefficient	1.4
Pore volume	1 – 1.1 mL·g ⁻¹
Surface area (min.)	900 m ² ·g ⁻¹
d₅₀, Meso and Macropores	800 Å
d₅₀, Micropores	15 Å
Specific gravity	1.04
Shipping Weight (approx.)	655 – 685 g·L ⁻¹

Hence, operating performance can be enhanced by the presence of electrolytes in the aqueous phase, increasing the differential hydrophilicity/organophilicity between the water and the adsorbent phase. As commented, the high NaCl concentration in the FTOP wastewater can improve adsorption process.

Analysis

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (Crison), respectively. The COD was analysed using kits and a Spectrophotometer DR600 (Hach Lange). The suspended solids (SS) were measured according to APHA, 2005 [32]. The colour was determined as the difference of absorbance at 440 and 700 nm according Castro and Brenes [33].

The total phenols (T.Ph) were measured spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method [34]. Sodium carbonate (20% w/v) from Panreac and Folin & Ciocalteu's reagent from Sigma Aldrich were used for it. The results were expressed as equivalent ppm of tyrosol ($\text{mg TY} \cdot \text{L}^{-1}$).

For phenolic profile measurement by high-performance liquid chromatography (HPLC), all samples were previously treated in order to extract the phenolic compounds according to El-Abbassi et al [35]. The extracts were brought to dryness in a rotary evaporator (Rotavapor R-114 from BÜCHI) at 40°C. The samples (7 mg) were reconstituted in 1 mL of MethHQ, where MethHQ was hydroquinone at $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in methanol. Hydroquinone was used as internal standard. The analyses were carried out with a Jasco HPLC system equipped with a MD-2018 Photodiode Array detector. The separation was carried out using a Phenomenex Kinetex 5u Biphenyl 100A column (4.6 x 250 mm, 5 μm). The optimal chromatographic conditions were established: flow rate of $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; injection volume of 10 μL ; solvent system were phase A (1 % acetic acid in water) and phase B (1 % acetic acid in methanol); gradient conditions: elution started at 5% of B and remained constant for 1 min, it linearly increased up to 80% of B in 25 min and returned to 5% of B in 2 min. This elution was held for 3 min before the next injection. The external calibration curves were obtained for different analytes in different concentrations, which were dissolved in MethHQ solution and injected in triplicate.

Adsorption process

The phenolic compounds adsorption was carried out with batch experiments (Flocumatic 4 jar-test apparatus from JP Selecta) at room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). MN200 concentrations in the jar-tests were 5, 10, 20, 30 and $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. MN200 was mixed with 200 mL of FTOP-1, FTOP-2, UF-1, UF-2 and NF-1. The experiments were performed for 180 min at a constant speed of 150 rpm.

The extent of adsorption was determined by measuring the residual amount of T.Ph in the liquid phase, throughout the experiment. The COD and colour were analyzed at the end of the experiments. The equilibrium adsorption time was calculated and adsorption kinetics of pseudo first-order reaction, pseudo second-order reaction and intra-particle diffusion model were analysed. Besides, the data were represented in order to find out whether they followed the behavior of Langmuir or Freundlich isotherms. Finally, the phenol adsorption yield was evaluated for the following parameters: resin dosage, T.Ph initial concentration in the samples and the pre-treatment performed.

After adsorption, MN200 resin was separated from the liquid phase. Then, it was washed twice with distilled water (5 min at 150 rpm) and dried in an oven for 3 hours at 50°C .

Desorption process

To select the organic solvent to carry out the desorption process, some batch experiments at room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) were performed using NF-1 aliquots. Ethanol and ethyl acetate were compared. Firstly, the adsorption process, using 500 mL of NF-1 with $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of MN200, was carried out. The desorption process was performed with 4 g of resin and 200 mL of each solvent, during 60 min at a constant speed of 150 rpm. Then, it was determined the amount of T.Ph concentration in the liquid phase to select the best organic solvent. For every resin used in the adsorption experiments (explained in

section 2.4) phenols recovery was carried out with the organic solvent selected. The experiments were performed at room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), for 60 min at a constant speed of 150 rpm. The equilibrium desorption time was calculated. Besides, the phenol desorption yield was evaluated for the following parameters: resin dosage, T.Ph initial concentration in the samples and the pre-treatment performed.

Useful life of MN200

Operating cycles were carried out in view of estimating the lifetime of MN200 resin. The aim of this experiment was to study the relationship between the service life of MN200 and three types of effluents: raw, ultrafiltered and nanofiltered FTOPs. The experiments were performed at room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) with $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of MN200 and 200 mL of FTOP-2, UF-2 and NF-1. Each cycle involved the following steps: initial conditioning or activation with NaOH (2% w/v), adsorption and desorption process. The adsorption and desorption process were performed for the equilibrium time at a constant speed of 150 rpm. After both treatments, MN200 was rinsed twice in distilled water (5 min at 150 rpm) and then was dried in an oven for 3 hours at 50°C .

VI.1.2.3. Results and Discussion

Wastewater characterization

The characterization of the wastewaters used in the experiments is shown in Table VI.6. Parameters were measured in triplicate and the standard deviation for each one also is presented in this table. The results confirm that the FTOP is a saline effluent (conductivities between 70 and $80 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) and acidic (pH around 4). It has a high organic matter content (COD_0 higher than $8500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) including high concentrations of phenolic compounds (C_0). It can be also

observed in this table that the performed membrane filtration hardly had significant influence on the pH and conductivity of the samples. Even in nanofiltration pre-treatment, there was only a slight decrease in the conductivity since monovalent ions (sodium chloride) were hardly rejected. Regarding the SS, they were completely removed in both pre-treatments with membranes. Ultrafiltration treatment partially removed COD, T.Ph and colour, from the FTOP samples. With additional nanofiltration, the elimination percentages of these parameters increased.

Table VI.6. Wastewaters characterization.

Sample	pH ^(*)	Cond ^(**) (mS.cm ⁻¹)	SS (mg·L ⁻¹)	COD (mg·L ⁻¹)	T. Ph (mg TY·L ⁻¹)	Colour
FTOP-1	4.4	79.2	1105 ± 56	9730 ± 65	1013 ± 8	0.46 ± 0.01
FTOP-2	4.2	79.8	1026 ± 33	8570 ± 42	791 ± 12	0.43 ± 0.01
UF-1	4.3	78.0	0	7662 ± 13	956 ± 9	0.25 ± 0.01
UF-2	4.2	80.5	0	7301 ± 23	722 ± 16	0.19 ± 0.01
NF-1	4.2	69.9	0	4970 ± 15	710 ± 16	0.17 ± 0.01

* pH standard deviations were between 0.1 and 0.2

** Conductivity standard deviations were between 0.3 and 1.2

The phenolic profile was determined by HPLC. The results confirmed that HTY was the main phenolic compound in all samples, and the second one was TY.

Adsorption process

Phenols, COD and colour adsorption

Table VI.7 shows the pH and conductivity in the liquid phase and the colour, COD and T.Ph concentration removal percentages after 180 minutes of adsorption process. Three resin dosages were tested: 10, 20 and 40 g·L⁻¹ of MN200. The experiments were carried out in triplicate.

As it can be seen in Table VI.7, the COD, T.Ph and colour removal efficiencies increased with increasing MN200 dosage, because there was an increase in the amount of adsorption active sites. In all samples analysed after adsorption process, the pH and conductivity values were higher than the initial parameters. This phenomenon was due to the fact that MN200 was conditioned in NaOH solution (according to section 2.2), remaining a residual amount adhered in its surface. During the adsorption process, NaOH was transferred into liquid phase; thereby pH and conductivity increased with increased MN200 dosage.

Table VI.7. Adsorption process (180 min, 150 rpm, 21±1 °C) with three MN200 dosages (10, 20 and 40 g·L⁻¹).

Sample	MN200 (g·L ⁻¹)	pH ^(*)	Cond ^(**) (mS·cm ⁻¹)	Removal (%)		
				T. Ph	COD	Colour
FTOP-1	10	4.8	80.8	59.8 ± 3.3	34.0 ± 1.2	76.6 ± 1.1
	20	4.9	81.0	83.7 ± 4.8	39.2 ± 0.8	90.1 ± 0.6
	40	5.2	81.3	94.1 ± 1.2	44.6 ± 1.9	95.6 ± 0.6
FTOP-2	10	4.5	81.4	82.1 ± 3.7	36.6 ± 1.5	74.6 ± 0.3
	20	4.7	81.1	93.2 ± 2.3	41.6 ± 1.4	71.3 ± 0.7
	40	4.9	82.5	97.3 ± 2.8	40.9 ± 2.3	76.9 ± 1.0
UF-1	10	4.6	74.2	78.3 ± 7.5	32.2 ± 3.9	77.9 ± 0.9
	20	4.8	78.7	91.4 ± 4.1	38.7 ± 3.0	90.0 ± 0.4
	40	5.1	79.1	97.3 ± 2.2	43.7 ± 3.9	93.0 ± 1.8
UF-2	10	4.5	85.1	87.4 ± 5.6	31.2 ± 2.1	84.0 ± 2.6
	20	4.7	85.6	95.4 ± 1.8	33.9 ± 0.9	91.8 ± 0.7
	40	5.0	83.9	98.3 ± 2.3	35.6 ± 3.1	95.4 ± 1.1
NF-1	10	4.5	68.2	88.4 ± 3.9	34.2 ± 0.8	88.7 ± 0.9
	20	4.7	68.9	97.3 ± 3.7	38.5 ± 0.2	90.3 ± 2.2
	40	5.1	70.1	99.3 ± 1.7	40.3 ± 2.0	95.2 ± 0.6

* pH standard deviations were between 0.1 and 0.2

** Conductivity standard deviations were between 0.2 and 1.4

If FTOP-1/FTOP-2 and UF-1/UF-2 samples are compared, it is observed that the T.Ph initial concentration (C_0) was related to the T.Ph removal. As expected, for each resin dosage, the phenols removal efficiencies increased with decreasing C_0 , since there was less solute for the same number of adsorption active sites.

Regarding the relationship between the pre-treatments performed and the adsorption process, it can be observed that the percentage of the T.Ph removed was very high independently from the pre-treatment used. However, considering the COD removed, which was a parameter that includes the phenols and other organic compounds, it can be verified that NF-1 sample adsorbat had higher percentage of phenols and fewer impurities than the other samples.

In order to a better explanation of the results, the theoretical COD of the T.Ph has been calculated. As T.Ph are expressed in $\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$ and the oxidation of 1 mol of TY requires 9.5 mol of O_2 , i.e. $2.2 \text{ mg O}_2\cdot\text{mgTY}^{-1}$ are needed. The theoretical COD concentration of the T.Ph adsorbed ($\text{COD}_{\text{Ph.ads}}$) has been presented in Table VI.8.

The $\text{COD}_{\text{Ph.ads}}$ was calculated by the equation Eq.(VI.3) and his percentage in total COD adsorbed (COD_{ads}) was calculated by Eq.(VI.4):

$$\text{COD}_{\text{Ph.ads}} = (C_0 - C_e) \cdot 2.2 = C_{\text{Ph.ads}} \cdot 2.2 \quad \text{Eq.(VI.3)}$$

$$\text{COD}_{\text{Ph.ads}}(\%) = \frac{\text{COD}_{\text{Ph.ads}}}{\text{COD}_{\text{ads}}} \cdot 100 \quad \text{Eq.(VI.4)}$$

where C_0 and C_e were the initial and equilibrium concentration of T.Ph ($\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$), respectively. The COD_{ads} was $\text{COD}_0 - \text{COD}_e$, where COD_0 and COD_e were the initial and equilibrium COD concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Table VI.8. Adsorption study of COD for three MN200 dosage (10, 20 and 40 g·L⁻¹) at equilibrium.

Sample	MN200 (g·L ⁻¹)	C _{Ph.ads} (mg·L ⁻¹)	COD _{Ph.ads} (mg·L ⁻¹)	COD _{Ph.ads} (%)
FTOP-1	10	606 ± 33.4	1333 ± 73.5	42.4 ± 0.8
	20	848 ± 48.6	1866 ± 107.0	47.6 ± 1.8
	40	953 ± 12.2	2097 ± 26.7	45.5 ± 1.4
FTOP-2	10	649 ± 29.3	1428 ± 64.4	45.6 ± 0.2
	20	738 ± 18.2	1624 ± 40.0	45.5 ± 0.4
	40	770 ± 22.1	1694 ± 48.7	43.1 ± 1.3
UF-1	10	748 ± 67.7	1646 ± 149.0	61.8 ± 1.6
	20	873 ± 37.0	1921 ± 81.5	60.1 ± 2.0
	40	930 ± 19.9	2047 ± 43.7	56.7 ± 3.9
UF-2	10	631 ± 40.4	1388 ± 89.0	60.6 ± 0.2
	20	689 ± 13.0	1516 ± 28.6	61.3 ± 0.5
	40	710 ± 16.6	1561 ± 36.5	60.0 ± 3.9
NF-1	10	627 ± 27.7	1379 ± 60.9	81.2 ± 1.7
	20	684 ± 26.3	1504 ± 57.8	78.7 ± 2.6
	40	705 ± 12.1	1551 ± 26.6	77.5 ± 2.5

Although MN200 has high affinity for phenolic compounds, this resin adsorbs other substances present in the aqueous phase. With nanofiltration it can be observed that the remaining non-phenolic COD after pre-treatment hardly compete on the resin active sites with phenols, enhancing the adsorption of the phenolic compounds.

Kinetics of phenol adsorption

Figure VI.9 shows the amount of the T.Ph adsorbed per g of MN200 resin (q_t in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) through the adsorption time, for three resin concentrations: 10, 20 y 40

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. It can be observed that the adsorption was very fast during the first minutes, because there were a lot of adsorption active sites in the resin. Then, the adsorption becomes slower near the equilibrium. As expected, initial adsorption was faster as MN200 concentration increased and the equilibrium was achieved earlier.

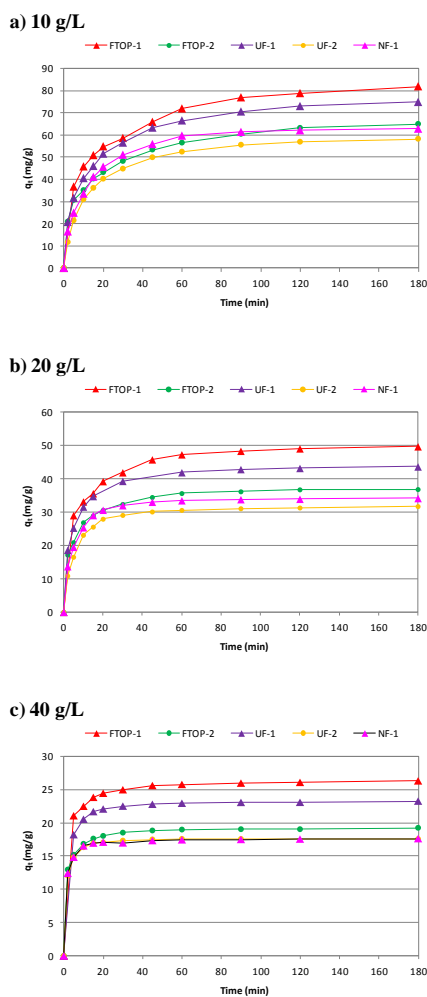


Figure VI.9. T.Ph concentration throughout the adsorption process (180 min, 150 rpm, 21 ± 1 °C) with three MN200 dosages: figure IV.9 a) $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, figure IV.9 b) $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and figure IV.9 c) $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Pseudo first-order and pseudo second-order

The kinetic parameters are helpful for the prediction of adsorption rate, which gives important information for designing and modelling the processes. Adsorption kinetics of phenolic compounds was studied through the testing of Lagergren (1898) and pseudo second-order [36] and pseudo second-order [37] models, in order to find correlations between adsorbed amounts and reaction time. Linear forms of Lagergren (pseudo first-order kinetic) and pseudo-second order kinetic equations are given in Eq.(VI.5) and Eq.(VI.6), respectively:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 \cdot t \quad \text{Eq.(VI.5)}$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad \text{Eq.(VI.6)}$$

where k_1 is the kinetic constant of pseudo first-order (min^{-1}), k_2 is the rate constant of pseudo second-order ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), and q_e and q_t are the amounts of adsorbed T.Ph per g of MN200 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) at equilibrium and at time t (min), respectively. Table VI.9 summarizes the parameters derived from the application of Eq.(VI.5) and Eq.(VI.6), with three resin dosages: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

According to the data from Table VI.9, q_e amounts calculated applying pseudo first-order kinetic model do not give reasonable values, since they were lower than the expected ones according to the experimental data. This can be observed in Figure VI.9, which the experimental data in the equilibrium time have been represented. Additionally, R^2 obtained from pseudo second-order kinetic was better than those obtained from pseudo first-order one, which values were above 0.98 in all cases. Also, the calculated q_e values were closer to the experimental data. Hence, the phenols adsorption with MN200 can be approximated more favourably by the pseudo second-order model. These results agree with previous studies reported by others authors for phenols adsorption with MN200

[38, 39]. On the other hand, it can be seen in Table VI.9 that the kinetic constant k_2 was related with C_0 and k_2 increased when C_0 decreased.

Table VI.9. Kinetic parameters for phenols adsorption with three MN200 dosage; 10, 20 and 40 g·L⁻¹.

Sample	MN200 (g·L ⁻¹)	Pseudo first-order			Pseudo second-order		
		q _e (mg/g)	k ₁ x 10 ² (min ⁻¹)	R ²	q _e (mg/g)	k ₂ x 10 ³ (g·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	R ²
FTOP-1	10	58.36	3.91	0.9596	66.67	0.88	0.9806
	20	40.79	4.86	0.9004	43.48	2.25	0.9918
	40	16.26	6.15	0.9295	24.27	10.05	0.9995
FTOP-2	10	61.68	5.12	0.8551	66.23	1.74	0.9962
	20	21.71	0.83	0.7502	37.88	6.39	0.9996
	40	2.91	4.01	0.8770	19.27	42.22	1.0000
UF-1	10	72.56	5.30	0.8824	77.52	1.44	0.9980
	20	26.10	5.92	0.9538	44.64	5.97	0.9999
	40	4.12	5.71	0.9794	23.36	35.16	1.0000
UF-2	10	57.41	5.39	0.5424	61.35	1.64	0.9996
	20	17.25	5.93	0.9560	32.47	7.93	0.9999
	40	2.17	4.55	0.8953	17.79	65.12	1.0000
NF-1	10	61.60	6.03	0.9514	66.67	1.76	0.9991
	20	14.69	5.76	0.9843	34.97	9.01	0.9999
	40	2.18	4.53	0.9248	17.67	68.16	1.0000

Intra-particle diffusion model

The phenols adsorption process can be controlled by one or more steps: film or external diffusion, pore diffusion, surface diffusion and adsorption on the pore

surface, or a combination of more than one step [40]. The intra-particle diffusion model relates the amount adsorbed at time by the Eq.(VI.7):

$$q_t = k_{id} \cdot t^{1/2} + \theta \quad \text{Eq.(VI.7)}$$

where k_{id} is the intra-particle diffusion rate constant ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1/2}$) and θ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) is a constant related to the thickness of the boundary layer: the larger is the value of θ , the greater is the boundary layer effect [41]. As an example, in Figure VI.10 the plot of q_t versus $t^{1/2}$, for NF-1 for three dosages MN200 (10, 20 and 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), is shown.

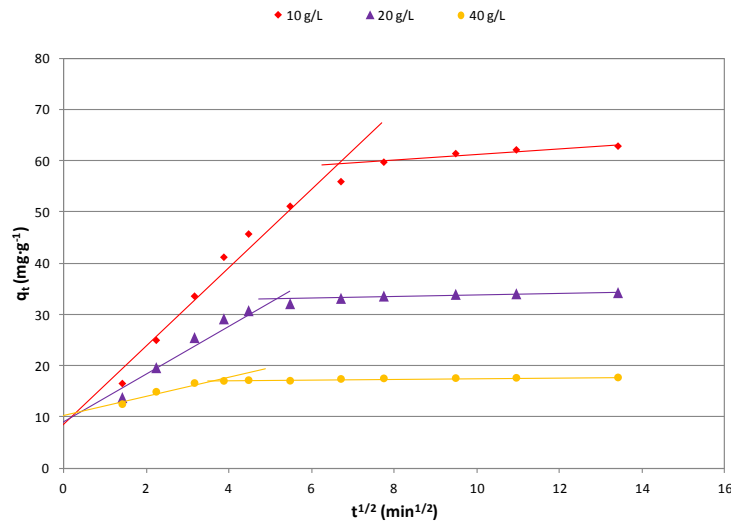


Figure VI.10. Intra-particle diffusion model from NF-1 with three MN200 dosage: 10, 20 and 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

It can be observed that the data do not fit to a straight line and exhibit multi-linear plots. Thus, the sorption process was not only controlled by intra-particle diffusion and external resistance to mass transfer was important in the first steps of adsorption. This is the reason why there was a deviation of straight lines from

the origin. Also, this initial period showed a slight curvature, usually attributed to boundary layer diffusion effects or external mass transfer effects [40]. For all samples and resin dosage analysed (data not shown) the data points were related by two straight lines, as seen in Figure VI.10. This agrees with studies reported by Valderrama et al. (2010) about the phenol adsorption in the liquid phase by MN200 [38]. In Figure VI.10 it can be observed that the adsorption equilibrium was achieved faster when the resin concentration increased.

Adsorption isotherms

Several models have been reported in papers to describe the experimental data, but the most frequently used were Langmuir and Freundlich isotherms. Langmuir model assumes a uniform surface and a single layer of adsorbed material [38] unlike Freundlich isotherm assumes that the adsorption process is heterogeneous and there is not only a layer of adsorbed material [42]. The linear form of Langmuir and Freundlich isotherms equations are given in Eq.(VI.1) and Eq.(VI.2), included in section VI.1.1.3. Both isotherms were performed for all samples and five resin dosage: 5, 10, 20, 30 and 40 g·L⁻¹. The fitted parameter values are listed in Table VI.10.

Assessing R² value, it is observed that the data obtained from the adsorption tests fitted to Langmuir equation are better than to Freundlich equation. These results are consistent with those reported by Caetano et al. (2009) for phenols adsorption with MN200 resin [39]. It can be seen in Table VI.10 that K_L increased with decreased the initial T.Ph concentration in the solution (C₀). This parameter is related to the efficiency of phenols adsorption and to the dimensionless equilibrium parameter R_L, through Eq.(VI.8):

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_0} \quad \text{Eq.(VI.8)}$$

The solute adsorption is considered as irreversible when $R = 0$, favourable when $0 < R < 1$ and unfavourable when $R > 1$ [40]. R_L values are presented in Table VI.10, where it can be observed that this parameter always was between 0 and 1. NF-1 presented the lowest R_L , which showed the best conditions for adsorption process.

Table VI.10. Isotherm parameters for T.Ph adsorption in FTOP-1, FTOP-2, UF-1, UF-2 and NF-1 on MN200 resin ($21 \pm 1^\circ\text{C}$).

Sample	Langmuir				Pseudo second-order		
	K_L ($\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$)	q_0 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	R_L	R^2	K_f ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})^{-1/n}$)	n	R^2
FTOP-1	0.0054	78.13	0.156	0.9987	2.87	2.05	0.9973
FTOP-2	0.0073	107.53	0.147	0.9989	3.25	1.82	0.9810
UF-1	0.0056	85.47	0.165	0.9992	2.42	1.84	0.9993
UF-2	0.0081	129.87	0.146	0.9986	3.10	1.63	0.9863
NF-1	0.0154	117.75	0.084	0.9941	4.10	1.68	0.9881

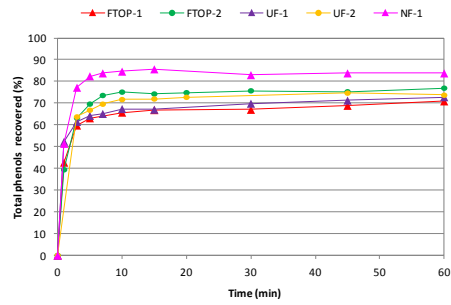
Desorption process

Organic solvent selection

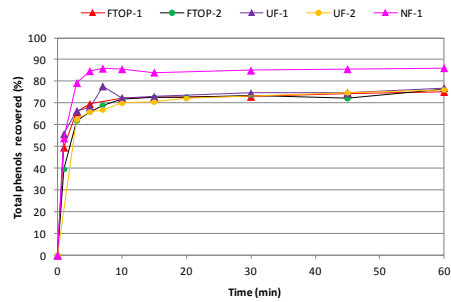
The phenols desorption efficiencies achieved for ethanol and ethyl acetate as liquid phase were 87.3 and 91.8%, respectively. The phenols desorption was very fast in the first minutes and at 5 minutes the 85.8 and 80.5% of T.Ph were recovered by the ethanol and ethyl acetate, respectively. In view of these results, and considering higher toxicity and price for ethyl acetate, ethanol was selected for performing the desorption experiments.

Phenols recovery

a) 10 g/L



b) 20 g/L



c) 40 g/L

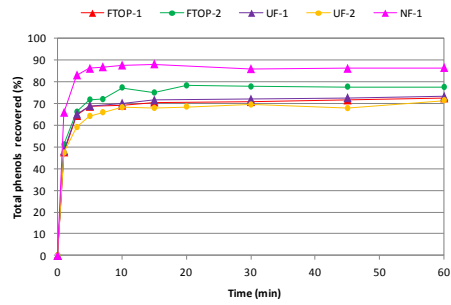


Figure VI.11. T.Ph concentration throughout the desorption process (60 min, 150 rpm, 21±1 °C) with three MN200 dosages: figure IV.11 a) 10 g·L⁻¹, figure IV.11 b) 20 g·L⁻¹ and figure IV.11 c) 40 g·L⁻¹.

In Figure VI.11, the percentage of T.Ph recovered by desorption process is presented for all resins used in the adsorption experiments performed. It can be observed that the desorption process was again very fast in the first minutes for all the cases surveyed and evolved quickly toward equilibrium. The T.Ph concentration in the equilibrium desorption time was achieved after 15 minutes in all the experiments performed. There were no relation between T.Ph concentration recovery and MN200 dosage. Nevertheless, the percentage of T.Ph recovered was related with the FTOP pre-treatment performed. For both FTOP and UF samples, the T.Ph concentration in ethanol phase were between 71-77%, while this amount increased near 85% for NF-1.

As commented in adsorption section, the solutes adsorbed from NF-1 had a higher phenols percentage. Therefore, there were fewer impurities retained in the resin and phenol desorption process was easier. The phenolic profile of NF-1 performed by HPLC is presented in Figure VI.12. In this figure the following chromatograms are compared: initial NF-1 sample (on top), NF-1 after adsorption with $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of MN200 (in the middle), and ethanol phase after desorption process (at the bottom). As it can be seen, after the adsorption process, TY was completely removed from NF-1 and only a few amount of HTY was detected. Regarding chromatogram after the desorption process, it observe that the phenolic profile was practically the same as the initial one.

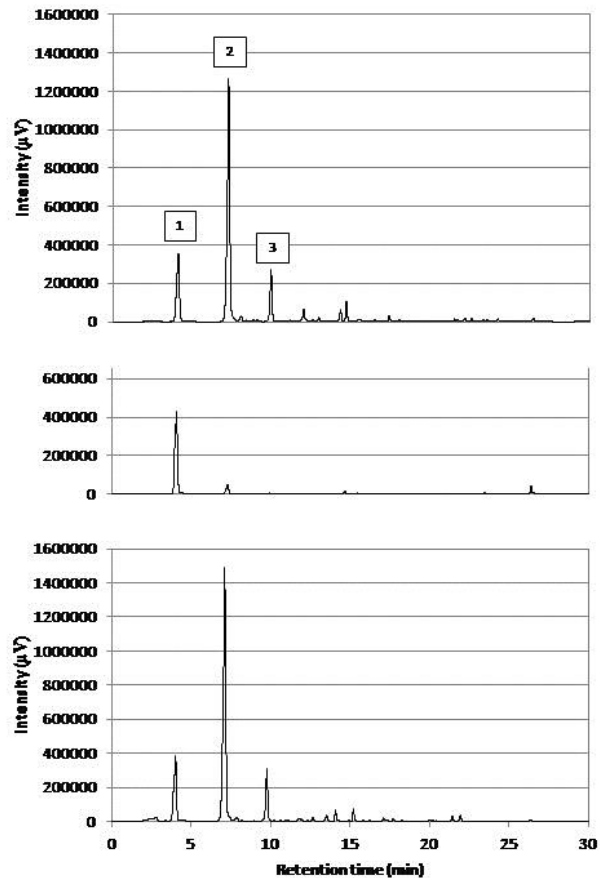


Figure VI.12. Phenolic profile in NF-1 (on top), NF-1 after adsorption by $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of MN200 (in the middle) and ethanol phase after desorption process (at the bottom). Peak identification: (1) Hidroquinone (internal std); (2) HTY; (3) TY.

Useful life of MN200

Ten adsorption/desorption/activation operating cycles have been carried out with FTOP-2, UF-2 and NF-1. These samples had similar C_0 , whereby only the influence of the FTOP pre-treatment in the useful life of MN200 was studied.

Throughout experiments, it can be stated that both phenols adsorption and desorption capacities of MN200 decreased with its use. In Table VI.11 the results for the T.Ph concentration percentage adsorbed and desorbed in the first and latest operating cycles are shown.

Table VI.11. T.Ph concentration percentage adsorbed and desorbed in the first and latest cycle in the experiments performed to study MN200 useful life.

Sample	Adsorption phenols (%)			Desorption phenols (%)		
	1° cycle	10° cycle	Lost efficiency in 10 cycles	1° cycle	10° cycle	Lost efficiency in 10 cycles
FTOP-2	95.8	87.9	7.9	81.8	69.7	12.1
UF-2	97.4	96.5	0.9	84.8	76.3	8.5
NF-1	98.2	97.4	0.8	91.7	87.2	4.5

After ten operating cycles it can be observed that the adsorption and desorption phenols performance decreased. The efficiency loss through the desorption process was higher than in the adsorption process. The effect of pre-treatment carried out was very important in the useful life of MN200. It can be seen in Table VI.11 that the greatest diminution in the adsorption and desorption efficiencies occurred for FTOP-2. This can be explained due to the highest values in the suspended solids and fats concentration in FTOP-2, which caused fouling in resin surface clogging the resin pores.

VI.1.2.4. Conclusions

The fermentation brines from table olive processing were characterized by containing valuable phenolic compounds, including hydroxytyrosol, which have high antioxidant capacity. In this work, the separation of phenols from

fermentation brines has been evaluated and the nonionic polymeric resin MN200 was selected.

The results were achieved for two raw FTOPs, two ultrafiltrated and one nanofiltrated samples. The adsorption process was described by Langmuir isotherm model and all samples tested were fitted properly to a pseudo-second order kinetics. The adsorption equilibrium time was related by MN200 dosage, since for 20 and 40 g·L⁻¹ around 90 and 60 min were necessary to achieve the equilibrium conditions, respectively. The phenol removal efficiencies higher than 90% were achieved when these resin concentrations were used. The phenols transport from the solution to MN200 surface is shown that was performed according two steps: the first step was due to the external resistance to mass transfer and the second one, being related to the micropore diffusion.

The results indicated that the adsorption for the most exhaustively pre-treated effluent was more selective. Only around 22% of the non-phenolic organic matter was separated together with phenols in NF-1 sample. The desorption process with ethanol was successful. In NF-1 sample more than 85% of phenolic compounds were recovered from the resin.

Finally, the evaluation of ten operation cycles with MN200 drives to establish that the adsorption capacity of the resin hardly decrease, meanwhile desorption efficiency decreases at a higher extent, except for the case of NF-1.

VI.1.2.5. References

- [1] Erlund I, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutr. Res.* 24 (2004), 851–874.
- [2] Odeh RM, Cornish LA, Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis, *Pharmacotherapy*, 15 (1995), 648–659.

- [3] Seifried EH, Anderson DE, Fisher EI and Milner JA, A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007), 567–579.
- [4] Garcia-Castello E, Cassano A, Criscuoli A, Conidi C and Drioli E, Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system, *Water Res.* 44 (2010), 3883–3892.
- [5] Fki I, Allouche N and Sayadi S, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: A potential alternative to synthetic antioxidants, *Food. Chem.* 93 (2005), 197–204.
- [6] Tuck KL and Hayball PJ, Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002), 636–644.
- [7] Sabatini N, Recent Patenets in Olive Oil Industry: New technologies for the recovery of phenols compounds from olive oil, olive oil industrial by-products and wastewaters, *Nutr. Agric. Food.* 2 (2010), 154–159.
- [8] Bouaziz M, Lassoued S, Bouallagui Z, Smaoui S, Gargoubi A, Dhouib A and Sayadi S, Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater, *Bioorganic. Med. Chem.* 16 (2008), 9238–9246.
- [9] Malheiro R, Sousa A, Casal S, Bento A and Pereira JA, Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives, *Food. Chem. Toxicol.* 49 (2011), 450–457.
- [10] ASEMESA. Asociación de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. http://www.asesesa.es/content/datos_generales_del_sector. Last access date; December, (2013).
- [11] Marsilio V and Lanza B, Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity, *J. Sci. Food. Agric.* 76 (1998), 520–524.
- [12] Ben Othman N, Roblain D, Chammen N, Thonart P and Hamdi M, Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives, *Food. Chem.* 116 (2009), 662–669.

- [13] Brenes M, Rejano L, Garcia P, Sanchez A and Garrido A, Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food. Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [14] Fendri I, Chamkha M, Bouaziz M, Labat M, Sayadi S and Abdelkafi S, Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013), 1–13.
- [15] Romero-Barranco C, Brenes-Balbuena M, García-García P and Garrido-Fernández A, Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food. Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [16] Miralles P, Chisvert A, Salvador A, Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015), 157–161.
- [17] Kopsidas GC, Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992), 629–631.
- [18] Garrido-Fernández A, Brenes-Balbuena M and García-García P, Treatment of brine fermentation of green olives, *Int. J. fats Oils* 3 (1992), 291–298.
- [19] Reid E, Liu X and Judd SJ, Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006), 164–171.
- [20] García-García P, López-López A, Moreno-Baquero JM and Garrido-Fernández A, Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 170 (2011), 59–66.
- [21] Kiril-Mert B, Yonar T, Yalili-Kiliç M and Kestioğlu K, Pre-treatment studies on olive oil mill effluent using physicochemical, Fenton and Fenton-like oxidations processes, *J. Hazard. Mater.* 174 (2010), 122–128.
- [22] Zirehpour A, Jahanshahi M and Rahimpour A, Unique membrane process integration for olive oil mill wastewater purification, *Sep. Purif. Technol.* 96 (2012), 124–131.
- [23] Cassano A, Conidi C and Drioli E, Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment, *Water Res.* 45 (2011), 3197–3204.

- [24] Stavropoulos GG, Samaras P and Sakellariopoulos GP, Effect of activated carbons modification on porosity, surface structure and phenol adsorption, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008), 414–421.
- [25] Soto ML, Moure A, Domínguez H and Parajó JC, Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *J. Food. Eng.* 105 (2011), 1–27.
- [26] Michailof C, Stavropoulos GG and Panayiotou C, Enhanced adsorption of phenolic compounds, commonly encountered in olive mill wastewaters, on olive husk derived activated carbons, *Bioresour. Technol.* 99 (2008), 6400–6408.
- [27] Aly AA, Hasan NY and Al-Farraj AS, Olive mill wastewater treatment using a simple zeolite-based low-cost method, *J. Environ. Manage.* 145 (2014), 341–348.
- [28] Ali I, Asim M and Khan T, Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater, *J. Environ. Manage.* 113 (2012), 170–183.
- [29] Ipek IY, Kabay N, Yüksel M, Yapici D and Yüksel Ü, Application of adsorption-ultrafiltration hybrid method for removal of phenol from water by hypercrosslinked polymer adsorbents, *Desalination* 306 (2012), 24–28.
- [30] Ipek IY, Yüksel S, Kabay N and Yüksel M, Investigation of process parameters for removal of bisphenol A (BPA) from water by polymeric adsorbents in adsorption-ultrafiltration hybrid system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014), 835–840.
- [31] Busca G, Berardinelli S, Resini C and Arrighi L, Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments, *J. Hazard. Mater.* 160 (2008), 265–288.
- [32] APHA AWWA WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, USA (2005).
- [33] Castro A and Brenes M, Fermentation of washing waters of spanish-style green olive processing, *Process. Biochem.* 36 (2011), 797–802.
- [34] Singleton V, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999), 152–178.

- [35] El- Abbassi A, Khayet M and Hafidi A, Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [36] Lagergren S, About the theory of so called adsorption of solute substances, *Ksver. Veterskapsakad. Handl.* 24 (1898), 1–6.
- [37] Ho YS and McKay G, Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochem.* 34 (1999), 451–465.
- [38] Valderrama C, Barrios JI, Caetano M, Farran A and Cortina JL, Kinetic evaluation of phenol/aniline mixtures adsorption from aqueous solutions onto activated carbon and hypercrosslinked polymeric resin (MN200), *React. Funct. Polym.* 70 (2010), 142–150.
- [39] Caetano M, Valderrama C, Farran A and Cortina JL, Phenol removal from aqueous solution by adsorption and ion exchange mechanisms onto polymeric resins, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009), 402–409.
- [40] Fierro V, Torné-Fernández V, Montané D and Celzard A, Adsorption of phenol onto activated carbons having different textural and surface properties, *Microporous Mesoporous Mater.* 111 (2008), 276–284.
- [41] Weber WJ Jr and Morris JC, Kinetics of Adsorption on Carbon from Solution, *J. Sanit. Eng. Div.* 89 (1963), 31–60.
- [42] Mohd AT, Hameed BH and Ahmad AL, Batch adsorption of phenol onto physiochemical-activated coconut shell, *J. Hazard. Mater.* 161 (2009), 1522–1529.


VI.2. TRATAMIENTO BIOLÓGICO

VI.2.1. Puesta en marcha



Chemical Engineering Journal

Volume 273, 1 August 2015, Pages 595–602



Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry

E. Ferrer-Polonio^a, J.A. Mendoza-Roca^a, A. Iborra-Clar^a, J.L. Alonso-Molina^b, L. Pastor-Alcañiz^c

[Show more](#)

doi:10.1016/j.cej.2015.03.062 [Get rights and content](#)

Abstract

The biological treatment of hypersaline effluents with high organic matter concentrations is difficult to carry out and it can require a long start-up phase. This is the case of the treatment of fermentation brines from table olive packaging (FTOP) industries. These effluents are characterized by conductivity values around $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, COD around $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and total phenols concentration around $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In this work, the FTOP has been treated in two sequencing batch reactors (SBRs) operated in parallel. In each SBR a different start-up strategy has been carried out. In SBR-2, biomass was previously acclimated to high salinity using simulated wastewater without phenolic compounds, meanwhile in SBR-1, the FTOP was added from the beginning of the start-up. The results indicated more operational problems in

SBR-2 consisting in a higher deflocculation that drove to high turbidity values in the effluent. Moreover, at the end of the start-up, SBR-1 reached higher COD removal efficiencies than SBR-2 (88% and 73%, respectively). In both reactors, an increase in *γ-Proteobacteria* in the microbial population was observed for increasing conductivities. In addition, the phenolic compounds were completely removed in both reactors at the end of the start-up, what implied very low toxicity values in the effluent.

Keywords: Fermentation brines; Hypersaline effluents; Polyphenols biodegradation; SBR; Table olives; Wastewater treatment.

VI.2.1.1. Introduction

The wastewaters from some industries are characterized by high organic matter and salts concentration. Their treatment by means of biological processes is always complicated, especially when the high wastewater conductivity is combined with some organic compounds, as phenolic compounds, that can inhibit biomass. The main types of industries that generate high salinity effluents are food processing industry (mainly pickled vegetables and fish processing industries), tanneries and petroleum industries [1].

It is well-known that salinity affects the correct performance of an activated sludge process. The effects on the sludge have been summarized in some review papers [1-3]. The salt concentrations above 1-2% may result in plasmolysis and loss of activity of cells. In addition, the physical properties of the activated sludge are affected, decreasing their hydrophobicity, filterability, settlement and bioflocculation [4, 5]. However, an acclimation of the microorganisms is possible by means of a gradual salinity increase. The acclimation will not be successful if salinity is increased too rapidly [6], what would imply the release of cellular material and consequently an increase in the soluble COD. On the other hand, a sudden decrease of salinity is also damaging for biomass. This

also implies that settling is affected, especially when NaCl concentration is higher than $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [7].

Some authors have reported the existence of a limiting salt concentration for the achievement of an appropriate organic matter removal with an adapted activated sludge [8]. According to them, the use of halophile microorganisms would be the key to enhance the process performance. Halophilic microorganisms are those that require salt for their survival and can be classified into moderate (3-15% NaCl) and extreme (15-30% NaCl) halophiles [9]. Other authors report slightly different NaCl ranges (5-20% for moderate and 20-30% for extreme halophiles) [10].

One of the hypersaline effluents coming from industry is the fermentation brine from table olive processing (FTOP). The finality of table olive processing is to make edible the olive fruit. This is performed by the following steps: 1) Debittering; treatment with sodium hydroxide solution (1-2% w/v) to remove the olive natural bitterness (in this stage, oleuropein is hydrolysed) [11]. 2) Rinsing cycles for eliminating the alkali excess. 3) Fermentation; olives are submerged in brine (4-8% w/v) of sodium chloride for several months. The wastewater volume generated in all stages is about $3.9\text{-}7.5 \text{ m}^3$ per ton of green olives [12]. The FTOP contributes to 80-85% of the global pollution of wastewater generated during the production in these types of agro-food industries [13]. However, it represents only 20% of the total volume. This is the reason why it is important to segregate the FTOP to treat it separately.

The FTOP is characterized by high conductivities (around $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) combined with high organic matter content (between 7 and $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of COD), and phenolic compounds (between 700 and $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). These features will entail very high environmental impacts if these effluents are not correctly managed [14]. The traditional management of these effluents consists in either their disposal in lagoons for water evaporation or their transport to large municipal wastewater treatment plants for their blending with the municipal wastewater. However, the increasing legislation strictness and environmental

awareness, have led to study different alternatives for the management of these effluents.

The biological treatment of olive oil mill wastewater has been reported in many research works [15, 16]. These effluents are characterized by COD ranges between 35 to 200 g·L⁻¹ (around 10% of this organic matter corresponds to phenolic compounds) and high total solid content. If the olive mill wastewaters (OMW) and the FTOP are compared, COD in the OMW is higher than COD in the FTOP. However, the conductivity of the FTOP is considerably higher than that of the OMW. In fact, the conductivity values of the FTOP are around 10 times higher than those reported for OMW. A direct biological treatment of the FTOP has not yet been reported in the literature. There are only a few works, in which the removal of the phenolic compounds from saline wastewater has been studied [17, 18], but they are performed with simulated water. However, there are several studies that consider the treatment of other table olive packaging effluents; as the global wastewater [19], the global wastewater excluding fermentation brines [18, 21], the alkaline debittering wastewaters [22, 23] and the olive washing water [24]. In other papers, the FTOP is treated by other techniques, such as electro-coagulation [25] or the biological treatment combined with chemical or electrochemical processes [26, 27].

The aim of this work is to perform a direct biological treatment of the FTOP wastewater from table olive packaging industry without previous dilution or physico-chemical treatment, by a gradual adaptation of activated sludge to high salinity and polyphenols concentration. The difficulties for the treatment of these wastewaters are not only focused on high salinities but also on the eventual inhibitory effect of the polyphenols concentration. The experiments were performed in two sequential biological reactors (SBRs) and two different start-up strategies have been compared.

VI.2.1.2. Materials and Methods

Analysis

For the tests, two different samples (FTOP-1 and FTOP-2) were used. The characterization of the FTOP included the analysis of pH, conductivity, turbidity, soluble COD (filtered to 0.45 μm), total phenols (Folin-Ciocalteu method), phenolic profile (analysis of simple phenolic compounds with UPLC-PDA analysis), total nitrogen (N_T), total phosphorous (P_T), sodium (Na^+), chloride (Cl^-), suspended solids (SS), volatile suspended solids (VSS) and total antioxidant activity (TAA).

For characterization of the SBRs effluents, pH, conductivity, turbidity, soluble COD (filtered to 0.45 μm) and total phenols (T.Ph) were monitored. In the last days of the start-up, in order to check the phenols degradation, the T.Ph, phenolic profile, TAA and toxicity were measured in the effluent.

The SS, VSS and microbial community analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) were measured to characterize the biomass in the SBRs.

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (Crison), respectively. The turbidity was determined with a Turbidimeter D-112 from Dinko Instruments. Suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were measured according to APHA, 2005 [28]. N_T , P_T , Na^+ , Cl^- and soluble COD were analyzed using kits and a Spectrophotometer DR600 (Hach Lange).

Phenolic compounds and total antioxidant activity

For phenols measurement, all samples were previously treated in order to extract them according to El-Abbassi et al. [29]. The extracts were brought to dryness in a rotary evaporator (Rotavapor R-114 from Büchi) at 40°C and the

residue was dissolved in methanol. The extracts obtained were used for the T.Ph and phenolic profile analysis. The T.Ph (simple phenolic and polyphenolic compounds) were measured spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method [30]. The results were expressed as ppm equivalent of tyrosol ($\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$). The phenolic profile was measured by liquid chromatography. UPLC-PDA analysis were carried out on Waters Acquity UPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a binary solvent manager, sample manager, column compartment, and 2996 PDA detector, connected to Waters Masslynx 4.1 software. The separation was carried out using a Waters BEH C18 column ($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$) at 40°C . The optimal chromatographic conditions were established: solvent system, phase A, 1 % formic acid in acetonitrile, and phase B, 1 % formic acid in water; gradient conditions were as follows: 100% B at 0 min for 1 min to 55% A in 25 min, then 100% A at 30 min, held for 5 min, returned to 100% B in 2 min, and equilibrated for 3 min before the next injection; flow rate of $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and injection volume of $5 \mu\text{L}$. Results were expressed as ppm of phenolic compound tested.

The total antioxidant activity (TAA) was determined by the modified version of ABTS assay reported by Cassano et al. [31]. The results were expressed in terms of mM trolox equivalents.

Toxicity

Microtox® was used for the estimation of the toxicity [32]. The light emission reduction of microorganisms *Vibrio fischeri*, in contact with the FTOP, was measured. In this test EC_{50} parameter was achieved. This parameter measured the effective contaminant concentration that reduces the intensity of light bacteria emission by 50% (after 15 minutes contact). The toxicity results have been expressed in toxicity units (TU), which is the inverse of EC_{50} multiplied by 100. The emission toxicity limit values for industrial wastewater discharges into the municipal sewer system according to regional authority (EPSAR) are 15

(maximum daily average concentration) and 30 (maximum instantaneous concentration) [33].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and microscopic observation for quantification Bacteria and Archaea

The samples were fixed in paraformaldehyde (4% at 4 °C) for Gram-negative organisms and in ethanol (50% at 4 °C) for Gram-positive [34]. The fixed biomass was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and re-suspended in a 1:1 (v/v) volume of PBS and absolute ethanol, and then stored at -20 °C. The fixed samples were immobilized on gelatin-coated glass slides, air-dried, and consecutively dehydrated in 50%, 80% and absolute ethanol. The hybridization buffer and probes were applied to the slide and incubated at 46 °C for 1-3 h. The excess probes were washed off by heating at 48°C for 15 min in a washing buffer [35]. The list of oligonucleotide probes [36] applied and respective formamide (FA) concentrations are shown in Table VI.12.

The microscopic observation was performed using an epifluorescence microscope Olympus BX50, equipped with a CCD camera (Olympus DP12). A minimum of 20 images of randomly chosen microscopy fields were taken for each probe-hybridized sample. The signals detected by FISH were quantified using automated bacteria quantification software [37] based on thresholding techniques using Matlab 7.1. The software-generated report states the percentage areas occupied by hybridized bacteria and the measurement uncertainty, i.e. the standard deviation divided by the square root of the number of fields examined.

Table VI.12. List of oligonucleotide probes applied and respective formamide concentrations.

Probe	Sequence	%FA	Organism
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Most bacteria
EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	35	<i>Planctomycetales</i>
EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	35	<i>Verrucomicrobiales</i>
EUB338IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	35	<i>Eubacteria</i>
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	35	<i>α-Proteobacteria</i>
CFX1223	CCATTGTAGCGTGTGTGTMG	35	<i>Chloroflexi</i>
GNSB941			
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	<i>β-Proteobacteria</i>
BET42a competitor	GCCTTCCCACATCGTT		
GAM42a	GCCTTCCC CATCGTTT	35	<i>γ-Proteobacteria</i>
GAM42a competitor	GCCTTCCCACCTTCGTTT		
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	<i>Firmicutes</i>
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC		
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC		
HGC69a	TATAGTTACCACCGCCGT	25	<i>Actinobacteria</i>
HGC69a competitor	TATAGTTACGGCCGCCGT		
CF319a	TGGTCCGTATCTCAGTAC	35	<i>Cytophaga</i>
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	35	<i>Archaea</i>

Isolation and identification of saline tolerant bacteria

The saline tolerant bacteria were isolated from SBR-1. The enrichment culture were obtained using a salinity wastewater medium (SWM) containing NaCl (70 g·L⁻¹). After 48 h culturing at shaking speed of 130 rpm·min⁻¹ and room temperature incubation, 1 mL from SWM was transferred with pipette onto the salt medium agar [38] in Petri dishes and it was incubated for 24-48 h at room temperature. Purified colonies were obtained by repeated streaking onto salt medium agar. The salt tolerant isolates were suspended in glycerol medium and stored at -20°C. 16S rRNA gene of the isolate was PCR amplified using bacterial universal primers F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') [39] and R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [40]. PCR products were purified using GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) and were sent to IBCMP (Valencia, Spain) for sequencing. 16S rRNA gene was amplified from genomic DNA, purified and sequenced and 16S rRNA fragment for H1 was sequenced and submitted to National Center for Biotechnology Information for BLAST analysis [41].

Biological reactors

The experiments were carried out in sequencing batch reactor (SBR). The SBRs presents many advantages in pilot-scale work: low construction and maintenance cost, robustness, single basin operation, better control of shock loads and flexibility in the operation process. In fact, they have been particularly used for the treatment of saline wastewater [9, 17, 42] so it is validated their suitability for the purpose of this study.

Two identical laboratory SBRs (Figure VI.13) were operated in parallel. In each SBR, mixing was carried out by a mechanical stirrer (Velp Scientifica), which was connected during all the reaction phase. The aeration was provided by a compressor Air 550 R Plus (Sera precision), which supplied an air flow rate of 550 L·h⁻¹, through a diffuser on the bottom of the reactors. An oximeter OXI 49

(Crison) measured the oxygen concentration in the reactor and this was regulated automatically between 1.5 and 2.5 mg·L⁻¹. According to the established phase duration, one of the peristaltic pumps (Aiguapres) switched on either to begin the fill or the drawing phase. The pumps switched off according to the level indicator.

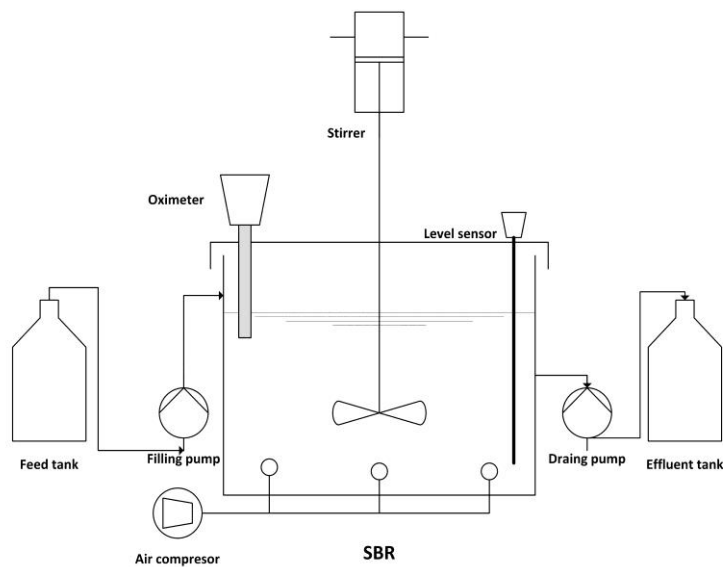


Figure VI.13. SBR scheme.

SBRs operation

Both SBRs (SBR-1 and SBR-2) were seeded with mixed liquor from a biological reactor treating landfill leachate (conductivity = 12 mS·cm⁻¹). This activated sludge presents two advantages over the conventional cultures. On the one hand, it was already acclimated at salinity concentration higher than that of

a municipal plant. On the other hand, leachates contain slowly degradable organic matter and even inhibitory substances; thereby the biomass was also adapted to complex organic substances. These features could make possible a faster biomass adaptation under conditions of increasing salinity and phenols.

The strategy of the start-up of SBR-1 consisted in feeding it with FTOP, in order to adapt the biomass increasing gradually both salinity and phenolic compounds. However, SBR-2 was previously adapted to high salinity. SBR-2 was fed with simulated wastewater (SWW), whose composition was: 20 g·L⁻¹ of casein peptone, 2.5 g·L⁻¹ of glucose, 2.5 g·L⁻¹ of dipotassium hydrogen phosphate anhydrous and 100 g·L⁻¹ of sodium chloride. The COD of this SWW was around 10 g·L⁻¹. Once the mixed liquor conductivity reached 60 mS·cm⁻¹ and the COD was removed above 85% (data not shown), the FTOP was fed to the reactor. This pre-acclimation procedure was achieved in 45 days. From this moment, began the comparison of two start-up strategies.

Table VI.13 shows the SBRs operation characteristics (identical operation for both SBRs once both reactors were fed with FTOP).

Table VI.13. SBRs operation characteristics.

Characteristics			
Operation		Cycle	
		Phase	Time
Reaction volume	6 L	Filling	2 min
Feed volume	150 mL·d ⁻¹	Anoxic reaction	60 h
Temperature	18-20°C	Aerobic reaction	21 h
Dissolved oxygen	1.5 – 2.5 mg·L ⁻¹	Sedimentation	1.5 h
Hydraulic retention time	40 days	Draw	2 min
Daily number of cycles	1	Idle	26 min
Operation days	108		

The SBRs were operated in 24 hours cycles. Each cycle consisted of the following steps: filling, reaction, sedimentation, draw and idle. The feed FTOP volume was 150 mL·d⁻¹ in both reactors, but the initial conductivity were 12 mS·cm⁻¹ in SBR-1 and 60 mS·cm⁻¹ in SBR-2 (the difference was due to the biomass pre-acclimation to salinity in SBR-2). Through the operation days, the initial conditions in the mixed liquors were changing. The salinity and phenols concentrations gradually increased in both reactors. The high hydraulic retention time (HRT = 40 days) was necessary in the starting-up period due to the biomass inhibition by the high salinity, phenolic compounds and COD concentrations. During the SBRs operation no sludge was withdrawn.

Table VI.14 shows the FTOP characteristics. FTOP-1 was fed in the first 48 days and FTOP-2 was used in the last 59 days. The parameters presented in this table were measured by triplicate and standard deviation was included.

Table VI.14. FTOP characteristics.

Characteristics	FTOP-1	FTOP-2
pH	3.9 ± 0.02	4.0 ± 0.02
Conductivity (mS·cm ⁻¹)	90.3 ± 0.3	94.2 ± 0.2
COD (g·L ⁻¹)	14.13 ± 0.13	17.70 ± 0.09
N _T (mg·L ⁻¹)	270 ± 7	365 ± 10
P _T (mg·L ⁻¹)	62 ± 3	75 ± 7
SS (mg·L ⁻¹)	1010 ± 18	936 ± 32
Cl ⁻ (g·L ⁻¹)	47.97 ± 0.22	50.00 ± 0.33
Na ⁺ (g·L ⁻¹)	81.50 ± 0.20	81.50 ± 0.19
T.Ph (mg TY·L ⁻¹)	929 ± 8	1109 ± 11
TAA (mM trolox)	13.4 ± 0.3	11.1 ± 0.3

As it can be observed, the FTOP is characterized by acidic pH (around 4). The conductivity is very high (above 90 mS·cm⁻¹) due mainly to the sodium chloride

added for olives conservation. The suspended solids concentration is also high (around $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), what implies high turbidity values. Additionally, high COD and T.Ph concentrations are observed.

The necessity of nutrients in wastewater was evaluated by the relationship: COD/N/P in amounts of 250/5/1. According Table VI.14, it can observe that no external nutrient addition was needed in the experiments.

VI.2.1.3. Results and Discussion

SBR-1 performance

Figure VI.14 shows the evolution of the COD removal efficiency, conductivity and turbidity values in the effluent for 108 days. During this time the pH effluent was between 8.2 and 8.5. The mixed liquor temperature was between $18 - 20^\circ\text{C}$. In this figure it can be observed that the conductivity in SBR-1 had changed from 12 to $59 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ after 43 operating days. In spite of the conductivity increase, the COD removal efficiency remained around 90% (COD effluent around $1700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

From the 54th to 80th day, SBR-1 conductivity went on increasing up to $83 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. During this period, the COD removal efficiency had been slightly reduced down to 85%. That was because the COD concentration in FTOP-2 was higher than FTOP-1. From the 81st to 108th day, the COD removal efficiency increased to $87.1\% \pm 1.5$ due to the increases in the MLSS concentration (Figure VI.15), since no sludge withdrawal was carried out. Also, SBR-1 conductivity increased to $91 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, which was near to the FTOP wastewater conductivity. In this way, it can be stated that the start-up of the reactor had finished.

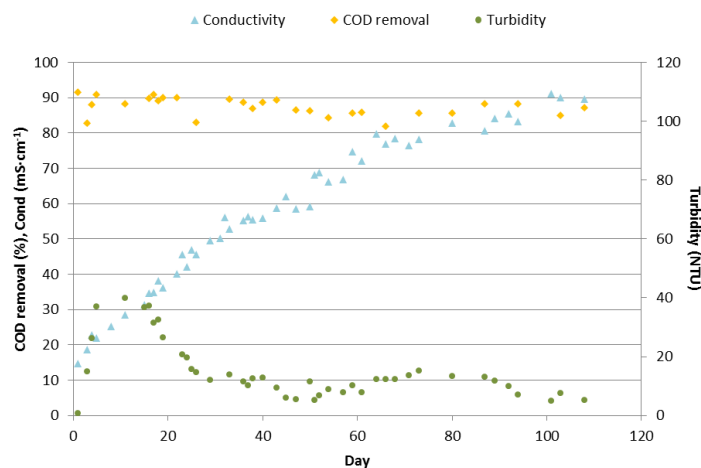


Figure VI.14. COD removal efficiency (%), conductivity ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) and Turbidity (NTU) of SBR-1 effluent.

Figure VI.15 shows the parameters measured in the mixed liquor samples from SBR-1. The F/M ratio was calculated by Eq.(VI.9) [43]:

$$\frac{F}{M} = \frac{\text{COD}_0 \cdot Q}{V_R \cdot \text{MLVSS}} \quad \text{Eq.(VI.9)}$$

where COD_0 is the initial COD in FTOP-1 or FTOP-2 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Q is the daily wastewater volume fed to SBR ($\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$) and V_R was the reaction volume (L).

In the first days, the F/M ratio was around $0.09 \text{ kg COD}\cdot\text{kg MLVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. This parameter increased to $0.14 \text{ kg COD}\cdot\text{kg MLVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the 15th day, because there was a MLVSS drastic reduction from 3900 to $2500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. This phenomenon can be explained because the floc disaggregation occurred during the first days, due to the osmotic shock. In particular, an increase in the effluent turbidity was observed (turbidity reached 39 NTU) due to the presence of biomass in the effluent, which may be caused by cell lysis and reduction of the

populations of protozoa and filamentous organisms required for proper flocculation [18].

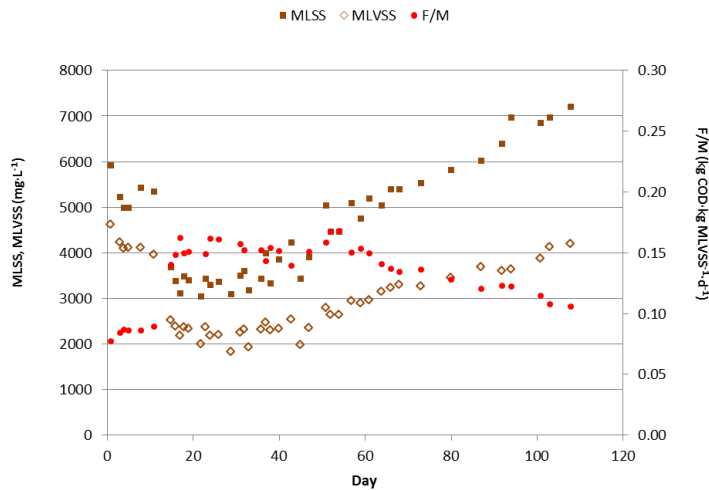


Figure VI.15. MLSS, MLVSS and F/M ratio in SBR-1.

As expected, the MLSS also decreased from 5900 to 3100 mg·L⁻¹. From the 17th to 47th day, the MLVSS remained around 2300 mg·L⁻¹ and the F/M ratio was between 0.14-0.16 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. Turbidity remained between 5 and 10 NTU. From the 47th to 108th day, the MLSS and MLVSS increased progressively up to 7200 and 4200 mg·L⁻¹, respectively. From this period on, the F/M ratio decreased to 0.10 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. This organic load value lies in the range commonly used for the design and operation of biological reactors treating wastewaters from agro-industries [43]. Thus, it can be concluded that the COD removal efficiency can be as high as in non-saline wastewater.

Other authors [44] reported that the COD removal efficiencies were reduced from 90% to 63% when the influent salinity was higher than 50 g·L⁻¹. These

authors worked with a SBR treating soaking wastewater from a tannery. Thus, the type of wastewater and, consequently, its characteristics could exert an additional influence on the SBR performance. In the case of the FTOP wastewater, high performance in SBR-1 was possible due to the presence of high concentrations of biodegradable COD like volatile organic acids and glucose.

SBR-2 performance

Figure VI.16 show the evolution of the COD removal efficiency in the reactor operation and the conductivity values of the reactor effluent. Figure VI.17 illustrates the parameters characterizing the mixed liquor in SBR-2.

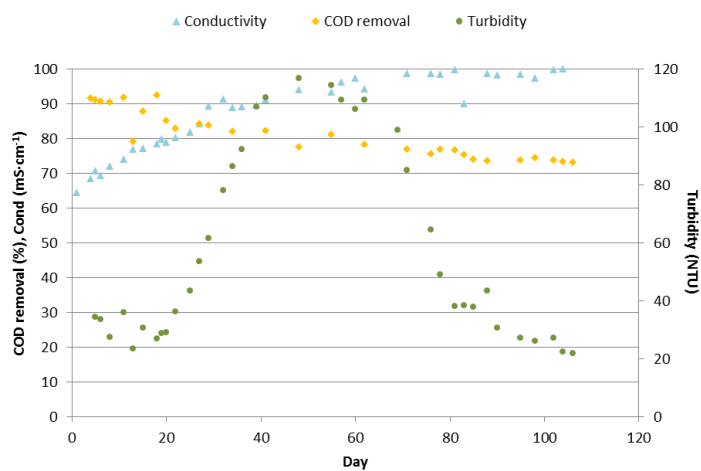


Figure VI.16. COD removal efficiency (%), conductivity (mS·cm⁻¹) and turbidity (NTU) of SBR-2 effluent.

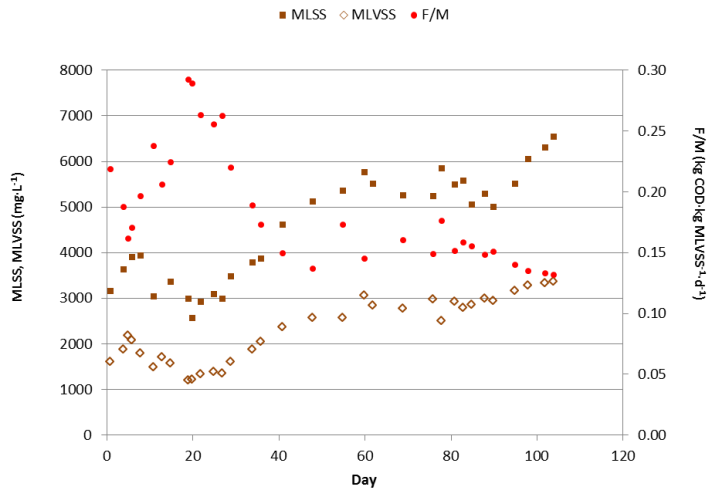


Figure VI.17. MLSS, MLVSS and F/M ratio in SBR-2.

The mixed liquor temperature was between 20 - 22 °C. As in SBR-1, the pH effluent was between 8.2 and 8.5. After 20 operating days, SBR-2 conductivity had changed from 64 to 83 mS·cm⁻¹ and the COD removal efficiency decreased from 91 to 85% (COD effluent around 2100 mg·L⁻¹).

The COD removal efficiency loss was due because in this period the SSLM and MLVSS decreased. This phenomenon can be explained by the negative initial effect of the phenolic compounds on the biomass previously acclimated to high salinity conditions. The MLSS decreased from 3900 to 2500 mg·L⁻¹ and the MLVSS from 2100 to 1200 mg·L⁻¹. Accordingly, the F/M ratio increased from 0.22 to 0.29 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹.

From the 21st to 60th day, the biomass was gradually adapted to phenolic compounds and both SSLM and SSVLM increased to 5500 and 2600 mg·L⁻¹, respectively. The F/M ratio decreased to 0.14 progressively. Nevertheless, the COD removal efficiency decreased to 78% due to the COD concentration in FTOP-2 was higher than FTOP-1. From the 61st to 108th, the MLSS and MLVSS increased slowly until 6500 mg·L⁻¹ and 3400 mg·L⁻¹, respectively. For

this period the COD removal efficiency remained around $74.5\% \pm 1.4$ and the F/M ratio was near $0.15 \pm 0.01 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

From the 20th to 48th day, the turbidity increased from 29 to 117 NTU. Unlike SBR-1, it was not associated with a MLSS diminution in SBR-2, but changes in biomass population drove to a release of cellular material, what implied an increase in the effluent turbidity. From the 49th day, the biomass was gradually adapted to the phenolic compounds presence and the turbidity decreased down to 20 NTU in the last days. However, the COD removal efficiency, which decreased to 74% in 48th day, remained in this value although the MLSS increased gradually up to $6500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Comparison of the performance of the reactors

The behavior of two reactors related to the pH variation was the same. It can seem surprising that pH above 8 was maintained in the reactors when they were fed with the FTOP, whose pH is 4. This low pH was due to the organic acids, formic and acetic acid, which are produced in high concentrations in the fermentation process. In addition, the action of *Lactobacters* converts the olives sugars into lactic acid, which also contributes to pH decrease [45]. They were degraded in the biological process and the pH consequently increases [46].

The F/M ratio was different in both reactors for the first 40 days of operation. However, from that day on, the F/M ratio resulted similar in both reactors (as it can be observed in Figure VI.15 and Figure VI.17), reaching $0.14 \pm 0.02 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in SBR-1 and $0.15 \pm 0.01 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in SBR-2.

When the COD removal efficiencies are compared in both reactors, it can be observed that SBR-1 performance hardly diminished with the operation time, meanwhile the pre-adapted to salinity SBR-2 yielded lower COD removal efficiencies than SBR-1. The extremely high conductivity values (near 100

$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) and the different start-up strategy, drove to reactor performance reduction. At the end of the start-up, the COD removal efficiencies were near $74.5\% \pm 1.4$ in SBR-2 and $87.1\% \pm 1.5$ in SBR-1.

In Figure VI.18 the relationship MLVSS/MLSS in both reactors is presented.

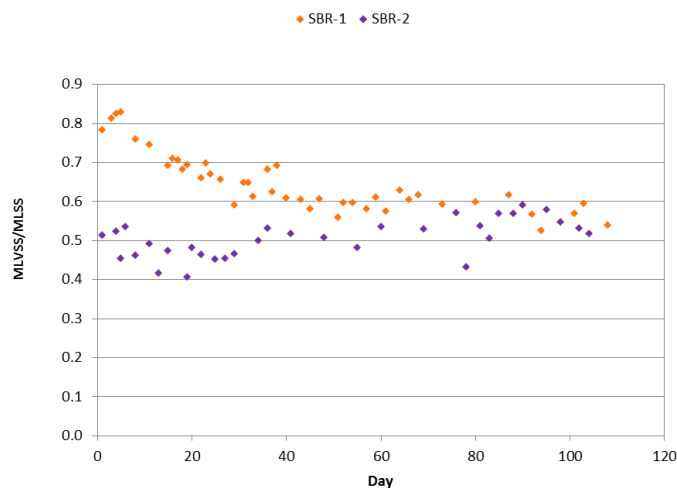


Figure VI.18. MLVSS/MLSS ratio from SBR-1 and SBR-2.

It can be seen that the MLVSS/MLSS ratio in the first days in SBR-1 was 0.81. From the 4th to 43th day the MLVSS/MLSS ratio decreased to 0.60. This indicates accumulation of inorganic compounds inside the microbial flocs when the salinity increased [47] (conductivity changed from 12 to 59 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). In SBR-2, the initial MLVSS/MLSS ratio was around 0.51 (conductivity was 58.7 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). This value was lower than that achieved in SBR-1 for the same conductivity. This can explain that the COD removal efficiency was higher in SBR-1 than in SBR-2, since the amount of microorganisms that potentially could degrade the organic matter was higher in SBR-1. From the 44th day, the MLVSS/MLSS ratio were similar in both reactors; 0.59 ± 0.03 in SBR-1 and 0.53 ± 0.04 in SBR-2. These low values can be explained by the high sludge

retention time, which enhances the cell endogenous respiration, that is, bacteria oxidize their own cellular material. It has to be pointed out that the sludge retention time in SBR-2 was higher than in SBR-1, since sludge came from the pre-adaptation period. It justifies the lower volatile percentage of the mixed liquor in SBR-2 in comparison with that measured in SBR-1.

Phenolic compounds removal, TAA and toxicity of the effluents

In the FTOP samples used as feed for the SBRs, only HTY and TY were identified, that is, no other polyphenols compounds were detected. This agrees with Brenes et al. [48] and Fendri et al. [49]. These authors reported that some phenolic compounds such as caffeic acid and p-cumaric acid disappear during the fermentation stage. However, HTY and TY concentrations remain practically constant. HTY is the main product of oleuropein hydrolysis, therefore its concentration is predominant in the FTOP wastewater [48, 50]. Table VI.15 shows the concentrations of total phenols, HTY and TY, TAA and toxicity of both FTOP samples and the SBRs effluents in the last days of the start-up (100th day). It can be stated that the phenolic compounds were removed in both SBRs. In fact, 97.8% and 97.0% of the T.Ph concentration were removed at the end of the start-up in SBR-1 and SBR-2, respectively. This was confirmed by UPLC-PDA analysis. In Table VI.15 it can be observed that the presence of HTY and TY was not detected. In the same way, the TAA was removed at a high extent (80%).

Table VI.15. Total phenols, HTY and TY concentration, TAA and toxicity.

	FTOP-1	FTOP-2	SBR-1	SBR-2
T.Ph (mg TY·L ⁻¹)	929 ± 8	1109 ± 11	24 ± 2	33 ± 2
HTY (mg HTY·L ⁻¹)	553 ± 37	613 ± 25	n.d	n.d
TY (mg TY·L ⁻¹)	82 ± 6	76 ± 7	n.d	0.77 ± 0.1
TAA (mM trolox)	13.4 ± 0.3	11.1 ± 0.3	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Toxicity (UT)	38.8 ± 0.2	40.0 ± 0.8	3.6 ± 0.2	3.1 ± 0.3

n.d. = not detected

However, in a complex wastewater and with no pure bacterial cultures it is not possible to confirm that the polyphenols have been degraded completely to carbon dioxide and water. Although phenols have been hardly detected in the SBRs effluents, formation of other compounds as quinones could also occur. The toxicity analyses help confirming that no dangerous intermediate products have been formed. The toxicity of FTOP-1 and FTOP-2 were 38.8 and 40.0 TU, respectively. After biological treatment, the effluent toxicity decreased to 3.6 TU in SBR-1 and 3.1 TU in SBR-2.

Microbial community analysis

Figure VI.19, Figure VI.20 and Figure VI.21 show the evolution of the bacteria and archaea population during the tests (46th, 66th and 108th, respectively) from the active biomass in SBR-1 and SBR-2. In these figures, the percentages and their uncertainty of the bacteria phyla and archaea isolated from the total population are represented. The conductivity values of every sample can be observed in the corresponding figure caption.

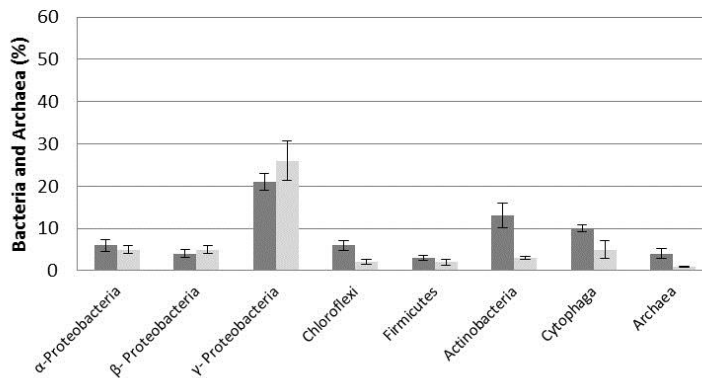


Figure VI.19. Quantification Bacteria and Archaea from the 46th day; SBR-1 (58.3 mS·cm⁻¹), SBR-2 (77.0 mS·cm⁻¹).

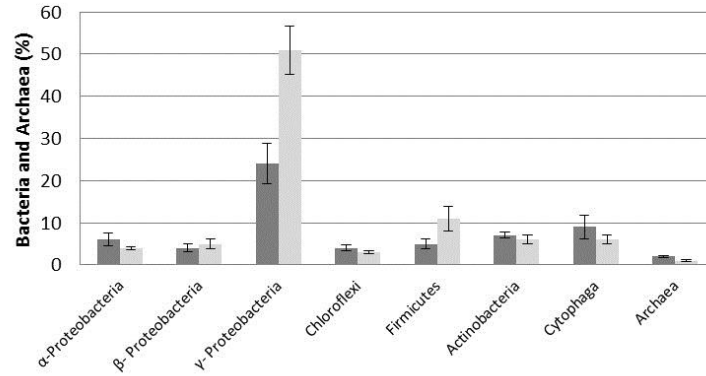


Figure VI.20. Quantification Bacteria and Archaea from the 66th day; SBR-1 (76.7 mS·cm⁻¹), SBR-2 (88.7 mS·cm⁻¹).

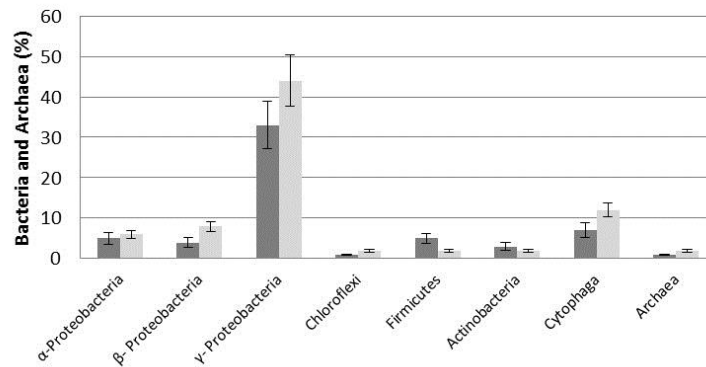


Figure VI.21. Quantification Bacteria and Archaea from 108th day; SBR-1 (89.3 mS·cm⁻¹), SBR-2 (98.5 mS·cm⁻¹).

It can be observed that *Proteobacteria* are dominant in both reactors with subclass gamma (γ) playing the main role. These results agree with those

obtained by other authors for saline waters [51, 52]. Thus, Park et al. [51] reported that 47% of the bacteria in Korean solar saltern were affiliated with γ -*Proteobacteria*. At the end of the start-up, there were 33% and 44% of γ -*Proteobacteria* in SBR-1 and SBR-2, respectively. γ -*Proteobacteria* amounts increased with the reactor salinity increased, though they slightly decreased in SBR-2 when conductivity was near $100 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. There is a non-negligible presence of Gram-positive bacteria. *Firmicutes* and *Actinobacteria* phylla were variable, but in both reactors reached a maximum around 13%. *Archaea* population was not relevant. *Phylum Chloroflexi* amounts decreased (from 6 to 1%) with the reactor salinity increased in SBR-1, meanwhile it remained constant in SBR-2 (around 2%). Finally, it has to be commented that the average percentage of *Phylum Cytophaga* also decreased slightly in SBR-1 (from 10 to 7%), meanwhile it increased in SBR-2 (from 5 to 12%).

As γ -*Proteobacteria* was the predominant microorganisms, the following step consisted in identifying the most important strain among them. Thus, the salt-tolerant strain (H1) was obtained. It can survive in the salinity up to 7%. Alignment of the strain indicated that the partial 16S rRNA sequence of H1 is 99% identical to *Salinicola sp.*

VI.2.1.4. Conclusions

The FTOP biological treatment is very complicated because the salinity shocks cause physical and biochemical changes in the activated sludge. Also, the phenolic compounds can inhibit the biomass, primarily by bactericidal effect. To achieve a successful treatment of this kind of effluents, a gradual acclimation of the biomass is required.

Two studied start-up strategies led to some differences in reactors performance. Thus, the COD removal efficiencies were slightly lower in the SBR with a biomass pre-adapted to salinity (SBR-2) than in SBR-1. Besides, deflocculation occurred at a higher extent. Therefore, according to this study, the best

implementation strategy is one that performs the simultaneous adaptation to the presence of salt and phenolic compounds. After 108 days of SBRs operation, the COD removal efficiencies were 88% in SBR-1 and 75% in SBR-2, and the T.Ph concentration were almost completely removed in spite of the high salinity (between 90 and 100 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), which implied very low toxicity values in the effluent. Concerning biomass population, an increase in *γ -Proteobacteria* in the microbial population for increasing conductivities was observed in both reactors. A *γ -Proteobacteria* strain, a salt-tolerant one, was obtained and its partial 16S rRNA sequence was 99% identical to *Salinicola sp.*

In view of these results, the augmentation of this strain has been achieved without pre-adaptation to salinity. Then, for a full-scale start-up of this type of reactors, a simultaneous adaptation to salinity and phenols is recommendable. Although further research has to be carried out to reduce the HRT in the reactor, the process could be economically feasible since the FTOPs volumes are not very high and they depend on the season; thereby reactors with appropriate sizes could be implemented in spite of the high HRTs.

VI.2.1.5. References

- [1] Lefebvre O., Moletta R., Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review, *Water Res.* 40 (2006), 3671–3682.
- [2] McAdam E.J., Judd S.J., Biological treatment of ion-exchange brine regenerant for re-use: A review, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008), 264-272.
- [3] Chowdhury P., Viraraghavan T., Srinivasan A., Biological treatment processes for fish processing wastewater – A review, *Bioresour. Technol.* 101 (2010), 439–449.
- [4] Reid E., Liu X., Judd S.J., Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006), 164–171.

- [5] Kargi F., Dincer A.R., Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation Fikret, *Enzym. Microb. Technol.* 19 (1996), 529–537.
- [6] Wang J.L., Zhan X.M., Feng Y.C., Qian Y., Effect of salinity variations on the performance of activated sludge system, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005), 5–8.
- [7] Mesquita D.P., Amaral A.L., Ferreira E.C., Coelho M.A.Z., Study of salinewastewater influence on activated sludge flocs through automated image analysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009), 554–560.
- [8] Dinçer A.R., Kargi F., Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater, *Process Biochem.* 36 (2001), 901–906.
- [9] Woolard C.R., Irvine R.L., Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor, *Water Res.* 29(4) (1995), 1159–1168.
- [10] Le Borgne S., Paniagua D., Vázquez-Duhalt R., Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (2008), 74–92.
- [11] Marsilio V., Lanza B., Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998), 520–524.
- [12] Kopsidas G.C., Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992), 629–631.
- [13] Garrido-Fernández A., Fernández-Díez M. J., Adams M.R., *Table olives. Production and processing*, Published by Chapman and Hall, London, 1997.
- [14] Romero-Barranco C., Brenes-Balbuena M., García-García P., Garrido-Fernández A., Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [15] Chiavola A., Farabegoli G., Antonetti F., Biological treatment of olive mill wastewater in a sequencing batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 85 (2014), 71–78.

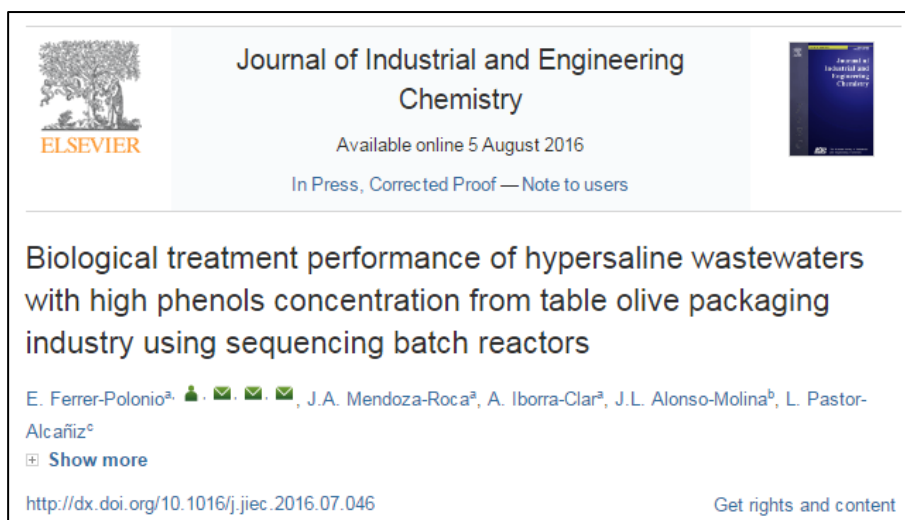
- [16] Günay A., Çetin M., Determination of aerobic biodegradation kinetics of olive oil mill wastewater, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 237–242.
- [17] Moussavi G., Barikbin B., Mahmoudi M., The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR. *Chem. Eng. J.* 158 (2010), 498–504.
- [18] Wang Y.F., Wang X.L., Li H., Lin K.F., Wang P., Yang J., Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93 (2014), 138–144.
- [19] Beltrán J., Gonzalez T., Garcia J., Kinetics of the biodegradation of green table olive wastewaters by aerobic and anaerobic treatments, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008), 839–845.
- [20] Brenes M., García P., Romero C., Garrido A., Treatment of green table olive waste waters by an activated-sludge process, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (2000), 459–463.
- [21] Rivas F.J., Beltrán F.J., Alvarez P., Frades J., Gimeno O., Joint aerobic biodegradation of wastewater from table olive manufacturing industries and urban wastewater, *Bioprocess Eng.* 23 (2000), 283–286.
- [22] Aggelis G.G., Gavala H.N., Lyberatos G., Combined and Separate Aerobic and Anaerobic Biotreatment of Green Olive Debittering Wastewater, *J. Agr. Eng. Res.* 80 (2001), 283–292.
- [23] Kotsou M., Kyriacou A., Lasaridi K.E., Pilidis G., Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater, *Process Biochem.* 39 (2004), 1653–1660.
- [24] Maza-Márquez P., Martínez-Toledo M.V., González-López J., Rodelas B., Juárez-Jiménez B., Fenice M., Biodegradation of olive washing wastewater pollutants by highly efficient phenol-degrading strains selected from adapted bacterial community, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82 (2013), 192–198.
- [25] García-García P., López-López A., Moreno-Baquero J.M., Garrido-Fernández A., Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 170 (2011), 59–66.

- [26] Benítez F.J., Acero J.L., Leal A.I. Purification of storage brines from the preservation of table olives, *J. Hazard. Mater.* B96 (2003), 155–169.
- [27] Kyriacou A., Lasaridi K.E., Kotsou M., Balis C., Pilidis G., Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater, *Process Biochem.* 40 (2005), 1401–1408.
- [28] APHA AWWA WEF, 2005, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- [29] El-Abbassi A., Khayet M., Hafidi A., Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [30] Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999), 152–178.
- [31] Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E., Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment, *Water Res.* 45 (2011), 3197–3204.
- [32] ASTM 1995 Standard test method for assessing the microbial detoxification of chemically contaminated water and soil using a toxicity test with a luminescent marine bacterium. D-5660-95.
- [33] EPSAR, Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales. Modelos de ordenanza de vertidos a la red municipal de alcantarillados. Generalitat Valenciana (1996).
- [34] Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.H., Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions, *Syst. Appl. Microbiol.* 15 (1992), 593–600.
- [35] Amann R., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A., Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990), 1919–1925.
- [36] Loy A, Horn M, Wagner M., ProbeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003), 514–516.

- [37] Borrás L., Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. (2008).
- [38] Zhang X., Gao J., Zhao F., Zhao Y., Li Z., Characterization of a salt-tolerant bacterium *Bacillus* sp. from a membrane bioreactor for saline wastewater treatment, *J. Environ. Sci.* 26 (2014), 1639–1374.
- [39] Chêneby D., Philippot L., Hartmann A., Hénelut C., Germon J.C., 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils, *FEMS Microb. Ecol.* 24 (2000), 121–128.
- [40] Wang G.C.Y., Wang Y., The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species, *Microbiology*, 142 (1996), 1107–1114.
- [41] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Last access date; September (2014).
- [42] Uygur A., Kargi F., Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor, *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004), 313–318.
- [43] W. Wesley Eckenfelder, Petr Grau, Activated sludge process design and control: theory and practice, Ed. Technomic Publishing AG, Lancaster, Pennsylvania, (1992), 156–159.
- [44] Lefebvre O., Vasudevan N., Torrijos M., Thanasekaran K., Moletta R., Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor, *Water Res.* 39 (2005), 1471–1480.
- [45] Parinos C.S., Stalikas C.D., Giannopoulos Th.S., Pilidis G.A., Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007), 339–343.
- [46] Assas N., Ayed L., Marouani L., Hamdi M., Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*, *Process Biochem.* 38 (2002), 361–365.

- [47] Abdollahzadeh E., Bonakdarpour B., Pakzadeh M., Treatment of hypersaline produced water employing a moderately halophilic bacterial consortium in a membrane bioreactor: Effect of salt concentration on organic removal performance, mixed liquor characteristics and membrane fouling, *Bioresour. Technol.* 164 (2014), 203–213.
- [48] Brenes M., Rejano L., Garcia P., Sanchez A.H., Garrido A., Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [49] Fendri I., Chamkha M., Bouaziz M., Labat M., Sayadi S., Abdelkafi S. Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013), 181–193.
- [50] Bouaziz M., Lassoued S., Bouallagui Z., Smaoui S., Gargoubi A., Dhouib A., Sayadi S., Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008), 9238–9246.
- [51] Park, Soo-Je; Kang, Cheol-Hee; Rhee, Sung-Keun. Characterization of the microbial diversity in a Korean solar saltern by 16S rRNA gene analysis, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2006), 1640–1645.
- [52] Caton T.M., Witte L.R., Ngyuen H.D., Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma, *Microbiol. Ecol.* 48 (2004), 449–462.

VI.2.2. Optimización del rendimiento de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos



Journal of Industrial and Engineering Chemistry

Available online 5 August 2016

In Press, Corrected Proof — Note to users

Biological treatment performance of hypersaline wastewaters with high phenols concentration from table olive packaging industry using sequencing batch reactors

E. Ferrer-Polonio^a, J.A. Mendoza-Roca^a, A. Iborra-Clar^a, J.L. Alonso-Molina^b, L. Pastor-Alcañiz^c

[Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.07.046> [Get rights and content](#)

Abstract

Biological treatment of hypersaline wastewaters such as fermentation brine from table olive processing (FTOP), was carried out using four sequential biological reactors (SBRs). These wastewaters were characterized by conductivities higher than $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ together with COD and total phenols concentration values of more than $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. In order to increase the organic removal efficiency and to reduce the hydraulic retention time (HRT), extra nutrients were added and pre-treatment by adsorption was performed. Results showed that the COD/N/P relationship, in the FTOP, of 250/5/1 was appropriate for the biological process reaching COD removal efficiencies of around 80%. The FTOP adsorption pre-treatment with powder activated carbon for the reduction of phenols concentration to $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ led to a HRT reduction from 40 to 15 days, maintaining the COD and

total phenols removal percentages around 78% and 97%, respectively. On the other hand, *γ-Proteobacteria* was the main bacterial class, representing around 74% of the microbial community in the reactors.

Keywords: Hypersaline effluents; Phenols removal; Table olives; SBR.

VI.2.2.1. Introduction

Industrial activity related to olive processing is concentrated on Mediterranean countries such as Spain, Italy, Greek, Tunisia and Morocco [1]. The average world production of table olives, between 2010 and 2015, was 2,531,600 tonnes [2].

Table olive processing (TOP) is performed in three steps: 1) Debittering; olives are submerged in a NaOH solution (1-2% w/v) during 8-12 hours, and the natural olive bitterness is removed, because oleuropein is hydrolysed. 2) Rinsing; to eliminate the alkali excess. 3) Fermentation; olives are submerged in brine (4–8% w/v) of NaCl for several months. During this time lactic fermentation is performed and the organoleptic properties of olives are improved [3]. Throughout the TOP, large quantities of wastewater (about 3.9–7.5 m³ per ton of green olives) are produced [1]. Usually, these effluents are stored in evaporation ponds (risk of surface and groundwater contamination, bad odors...) or even discharged into the sea or rivers. Strict environmental regulations have led to the research on the appropriate treatment of this industrial wastewater.

Wastewater generated in the fermentation brine of table olive processing (FTOP) only represents 20% of the total volume within the global industry. Nevertheless, these effluents contribute to 85% of the global wastewater pollution [1, 4]. Therefore, if FTOPs are treated separately, the overall management of wastewater will be improved.

The FTOP is an acidic effluent (pH around 4) with a very high conductivity (between 70-90 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) and high organic matter concentration (between 7 and 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in terms of COD), which includes phenolic compounds in concentrations between 700 and 1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. These variations are mainly due to the olive characteristics (variety, maturation degree...) and to the olive processing [5].

Unlike the biological treatment of olive oil mill wastewaters, which have been studied in many investigations [6, 7], there are only a few authors dealing with the FTOP effluents. Some authors have reported results on the treatment of the global wastewater [8], the alkaline wastewaters [9, 10] and the washing water [11]. However, there is a lack of results regarding FTOP biological treatment. There has also been very few works focusing on the removal of the COD and phenolic compounds from other saline wastewaters. Moreover, the studies that have been carried out used simulated wastewater [12, 13]. It is known that the biological treatment of hypersaline wastewater involves great difficulties [14-16], since high salt concentrations can produce plasmolysis and loss of cells activity. In the same way, hydrophobicity and settlement properties of the activated sludge will decrease. In addition, phenolic compounds can inhibit the biomass because of their bactericidal effect [17, 18]. Thus, the reduction of phenol concentration before the biological treatment could enhance the process performance. For it, adsorption can be tested, since other authors reported successful results of this technique for phenols removal and other organic compounds like dyes from other wastewaters [19-25].

The aim of this work is to perform a direct biological treatment of FTOP wastewater in order to reduce the COD and phenol compounds. The previous biomass acclimation was already reported [26]. In that work COD removal efficiencies were around 88% and phenols were almost completely removed. However, to achieve these results a high hydraulic retention time (HRT = 40 days) was required. In the present work, two strategies were carried out to reduce the HRT to get an economically viable full-scale treatment: extra nutrients were added to the FTOP (nitrogen and phosphorous) and the

concentration of COD and phenols in the FTOP were reduced by a previous adsorption with powder activated carbon (PAC).

VI.2.2.2. Materials and Methods

Wastewater

Fermentation brine was provided by a table olive packaging industry located in Comunidad Valenciana (Spain). Experiments were carried out with four fermentation brine samples, named from FTOP-1 to FTOP-4. The FTOPs were previously filtered in a 60 μm sieve in order to reduce the suspended solids concentration. Additionally, some FTOPs were treated with PAC and these samples were named FTOP-_{PAC}. Before their use, all wastewater samples were stored at 4°C. Table VI.16 shows the main characteristics of the different samples of FTOP and FTOP-_{PAC} wastewaters used in the experiments. The parameters were measured in triplicate and the average value has been presented. Filtration was necessary for PAC removal after the adsorption process, which eliminated suspended solids as shown in the table.

It can be observed that the FTOPs are acidic effluents. The pH in these five samples was 4.2 ± 0.4 . FTOP-1, FTOP-2 and FTOP-2_{PAC} had very similar conductivities, around $94 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, meanwhile this parameter decreased in FTOP-3_{PAC} and FTOP-4_{PAC} to $79 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (lower concentration of NaCl into the brine preparation). FTOP-2_{PAC} was treated with the PAC to obtain a total phenols concentration of $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Similarly, FTOP-3_{PAC} and FTOP-4_{PAC} were treated with PAC to reduce the total phenols concentration to $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The adsorption process also reduced the COD considerably. Thus, COD values of 6710 and $5465 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ were reached. On the other hand, only FTOP-2 required additional nutrients to achieve the relationship COD/N/P of 250/5/1. The mass of urea and KH_2PO_4 required to meet the stoichiometric ratio of 250/5/1 and 10% in excess of this values was calculated.

Table VI.16. FTOPs characteristics.

	FTOP-1	FTOP-2	FTOP-2_{PAC}	FTOP-3_{PAC}	FTOP-4_{PAC}
pH	4.0 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2
Cond (mS·cm ⁻¹)	94.2 ± 0.2	94.1 ± 0.1	94.1 ± 0.3	78.8 ± 0.3	79.0 ± 0.1
COD (g·L ⁻¹)	17.7 ± 0.1	21.5 ± 0.1	16.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1	5.5 ± 0.1
N _T (mg·L ⁻¹)	365 ± 3	352 ± 2	320 ± 8	205 ± 12	247 ± 7
P _T (mg·L ⁻¹)	75 ± 1	76 ± 2	65 ± 2	35 ± 5	23 ± 2
Cl ⁻ (g·L ⁻¹)	50.0 ± 0.3	44.9 ± 0.3	44.9 ± 0.1	38.5 ± 0.1	40.2 ± 0.1
T.Ph (mg TY·L ⁻¹)	1109 ± 23	1550 ± 34	400 ± 12	200 ± 13	200 ± 4
SS (mg·L ⁻¹)	936 ± 15	1237 ± 43	408 ± 21	250 ± 9	407 ± 11
VSS (mg·L ⁻¹)	466 ± 8	511 ± 22	182 ± 12	117 ± 11	203 ± 9

The HPLC analysis of the FTOPs showed that the main phenolic compounds in all of the samples were hydroxytyrosol and tyrosol. These results agree with those reported by other authors [27, 28]. Hydroxytyrosol concentration is explained by the acid and enzymatic hydrolysis of oleuropein. Tyrosol may be produced from the hydrolysis of ligstroside. The presence of other phenolic compounds such as caffeic, gallic, p-hydroxyphenylacetic, vanillic..., depend on the cultivar and olive maturation stage [29].

Analysis

The FTOP samples were characterized by the following analysis: pH, conductivity, soluble COD (filtered to 0.45 μm), total phenols (T.Ph), phenolic profile (analysis of simple phenolic compounds with HPLC), chloride (Cl⁻), total nitrogen (N_T), total phosphorus (P_T), turbidity, suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS).

The parameters measured in the effluents from the SBRs were: pH, conductivity, soluble COD (filtered to 0.45 μm), turbidity, T.Ph and phenolic profile. In the SBRs mixed liquor suspended solids (MLSS) and volatile suspended solids (MLVSS) were measured and the ratio MLVSS/MLSS was calculated.

The percentages of COD and T.Ph removed during the biologic treatment were calculated from experimental measurements and according to the following equations:

$$\text{COD removal (\%)} = \frac{\text{COD}_0 - \text{COD}_{\text{effluent}}}{\text{COD}_0} \cdot 100 \quad \text{Eq.(VI.10)}$$

$$\text{T. Ph removal (\%)} = \frac{\text{T. Ph}_0 - \text{T. Ph}_{\text{effluent}}}{\text{T. Ph}_0} \cdot 100 \quad \text{Eq.(VI.11)}$$

where COD_0 and T.Ph_0 were the concentration values ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for these parameters in FTOP and $\text{COD}_{\text{effluent}}$ and $\text{T.Ph}_{\text{effluent}}$ were the concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for these parameters in the effluent. Also, food-to-microorganism ratio (F/M) was calculated by Eq.(VI.9) (subsection VI.2.1.3).

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (CRISON), respectively. Turbidity was determined with a Turbidimeter D-112 from DINKO INSTRUMENTS. The SS and VSS, in the FTOP and mixed liquor, were measured according to APHA, 2005 [31]. Total nitrogen, total phosphorus, chloride and soluble COD were analyzed using kits and a Spectrophotometer DR600 (HACH LANGE) after the appropriate dilutions to avoid interferences.

Phenolic compounds

The FTOPs and SBRs effluents were previously treated in order to extract phenols according to El-Abbassi et al. (2011) [32]. The extracts were dried in a rotary evaporator (Rotavapor R-114 from BÜCHI) at 40°C and the residue was

dissolved in methanol. T.Ph were measured spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu method [33]. Sodium carbonate (20% w/v) from PANREAC and Folin & Ciocalteu's reagent from Sigma Aldrich were used for it. The phenolic profile was measured by liquid chromatography. The analysis was carried out with a Jasco HPLC system equipped with a MD-2018 Photodiode Array detector. The separation was carried out using a Phenomenex Kinetex 5u Biphenyl 100A column (4.6 x 250 mm, 5 μ m). The optimal chromatographic conditions were established: flow rate of 1.5 mL \cdot min⁻¹; injection volume of 10 μ L; solvent system were phase A (1 % acetic acid in water) and phase B (1 % acetic acid in methanol); gradient conditions: the elution started at 5% of B and remained constant for 1 min, it linearly increased up to 80% of B in 25 min and returned to 5% of B in 2 min. The detailed procedure for samples preparations and external calibration by different analytes can be found in a previous work [26].

γ -Proteobacteria quantification

According to the results obtained in the process start-up and to the fact that the predominant class was *γ -Proteobacteria*, it was decided to consider the percentage of this bacterial subclass as biological indicator, in order to relate it with the operational changes, the COD and the phenols removal efficiencies. *γ -Proteobacteria* percentage in the biomass was measured by FISH technique. For it, the oligonucleotide probe GAM42a with the sequence GCCTCCCACATCGTTT was used. Microscopic observation was carried out using an epifluorescence microscope Olympus BX50, equipped with a CCD camera (Olympus DP12). The detailed procedure can be found in Ferrer-Polonio et al. (2015).

Biological reactors

The experiments were carried out in four sequencing batch reactors: SBR-1, SBR-2, SBR-3 and SBR-4. SBRs were operated in 24 hours cycles. Table VI.17

summarizes the HRT, V_R and daily volume fed to the four reactors. In this table, the duration of each phase of the cycle is also included. In the oxic reaction phase, the oxygen concentration ranged between 1.5 and 2.5 mg·L⁻¹.

Table VI.17. SBRs operation characteristics.

Operation characteristics	SBR-1	SBR-2	SBR-3	SBR-4
Reaction volume (L)	6	6	3	3
Feed volume (mL·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	25	33	33	67
HRT (days)	40	30	30	15
Cycle characteristics				
Phase	Time			
Filling	2 min			
Reaction (anaerobic/aerobic)	1 h / 21 h			
Sedimentation	1.5 h			
Draw	2 min			
Idle	26 min			

SBR-1 start-up was carried out in a previous work, where the mechanical components and scheme of the SBR plant (identical for all SBRs) can be found [26]. This reactor was operated for 166 days. The start-up strategy for SBR-2 consisted of filling it gradually with withdrawn sludge from SBR-1 and FTOP until achieving 6 L of V_R . The volume of the added FTOP was calculated daily for maintaining the same organic load ratio as in SBR-1 until V_R was 6 L. At the start-up, neither sludge nor treated water was withdrawn from the SBR. After 33 days, SBR-2 reached the targeted volume. SBR-2 was operated during 133 days. After that, SBR-2 was split into two new reactors, SBR-3 and SBR-4 (116 operating days), to achieve more quickly two reactors with mixed liquors of identical characteristics. The reaction volume in both reactors was 3L, adapting the feed/draw volumes to the new V_R . Figure VI.22 illustrates the time distribution of the SBRs operation in the experiments.

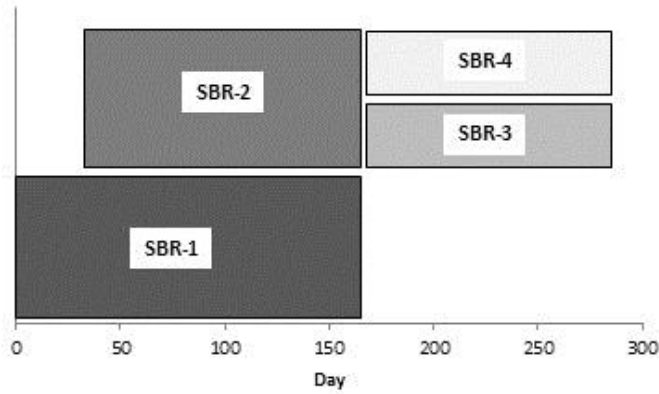


Figure VI.22. SBRs experimental time.

The sludge retention time (SRT) values for the four SBRs were different due to the variation of the F/M ratio and HRT parameters. Thus, the SRT was around 90 days for SBR-1, 75 days for SBR-2 and SBR-3 and 43 for SBR-4. The high values for the SRT are caused by the low sludge production. This can be explained by the high salinity in mixed liquor that leads to high energy consumption for cell maintenance instead of cell growing.

Hydraulic retention time reduction

First strategy: The effect of nutrients addition in FTOP on process efficiency

The requirement of nutrients (nitrogen and phosphorous) in wastewater was evaluated comparing with the relationship: COD/N/P of 250/5/1 [34]. According to COD, N_T and P_T calculated in the FTOPs and FTOP_{-PAC}, the external nutrients to be added were calculated in order to obtain the required

amounts. The chemicals used to provide nitrogen and phosphorus were $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (urea) and KH_2PO_4 , respectively. Besides, 10% of nutrients excess were added in SBR-1, during the last 48 days, in order to compare the COD and total phenols removal efficiencies under stoichiometric conditions (250/5/1) and under excess of N and P.

Second strategy: The effect of adsorption treatment with powder activated carbon (PAC) to reduce COD and phenols concentrations in FTOP

Adsorption is an appropriate process to remove the COD and phenolic compounds from wastewaters [35]. Another advantage of PAC pre-treatment is that it achieves a more stable composition of FTOP, since the concentration of COD and phenolic compounds are variable. It depends on several factors such as cultivar [5, 36] and maturation degree [37]. Also, these parameters are closely linked to olive processing, mainly to the debittering and fermentation processes [36, 38].

In a previous work, the COD and phenols adsorption in the FTOPs with four different PACs were reported [39]. Table 3 shows the main characteristics of these carbons and the T.Ph removal percentages achieved after 4 hours of adsorption time with $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of each PAC. The FTOP used in these tests had a T.Ph. concentration of $1391 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The selected PAC (BM8 from PUROLITE) has been used for this work. Pre-treatment was performed in a jar-test equipment. PAC was mixed with 0.5 L of FTOP under the following operational conditions; stirring rate of 150 rpm during 60 minutes at room temperature. After the adsorption process, PAC was separated from the FTOP by filtration (cellulose filter of $40 \mu\text{m}$ sieve). The experiment with FTOP-PAC was carried out in SBR-2, SBR-3 and SBR-4.

For SBR-2 the PAC concentration was calculated to achieve $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of total phenols concentration in FTOP2-PAC. To keep a similar F/M ratio in SBR-1 and SBR-2, the HRT in SBR-2 was decreased to 30 days. SBR-1 and SBR-2

performances were compared during a 132 days period. SBR-3 and SBR-4 were fed with FTOP-3_{PAC} and FTOP-4_{PAC}, which were treated with higher PAC amounts to achieve 200 mg·L⁻¹ of total phenols concentration. In these reactors different HRT and organic load values were set to evaluate the effect of these parameters on the reactors performance. Thus, the HRT was 30 days in the SBR-3 and 15 days in the SBR-4. Therefore, these SBRs were operated with different F/M ratio.

Statistical analysis

According to the experimental procedure described, some parameters of the reactors performance have been studied. These parameters were the relationship COD/N/P, the HRT and the F/M ratio. To study the statistical significance of these factors for the COD removal yield, an ANOVA simple analysis (confidence level of 95 %) was carried out with STATGRAPHICS Centurion XVI.

The variance analysis of the HRT and F/M ratio were carried out with 74 experimental values registered during the experimental time in the four reactors. Nevertheless, only experimental values of SBR-1 (22 data) were evaluated to achieve the variance analysis for the relationship COD/N/P in the FTOPs, because in the other reactors the value of this parameter was always the stoichiometric one.

As stated above, the dependent variable was the removal percentage of the effluent COD. Three levels were evaluated for the HRT: 40, 30 and 15 days. Due to the F/M ratio data scattering, this parameter was split into three ranges of values: Range A) F/M ratio > 0.185, Range B) 0.184 > F/M ratio > 0.089 and Range C) F/M ratio < 0.088. The relationship COD/N/P was classified into three categories: “low”, “stoichiometric” or “excess” according to nitrogen and phosphorus concentration and COD in the FTOP.

VI.2.2.3. Results and Discussion

The effect of nutrients addition in the performance

The effect of adding nutrients on the FTOP process efficiency was evaluated in SBR-1. The experimental period was 166 days and during this time the HRT was 40 days. This reactor was fed with FTOP-1 and FTOP-2. SBR-1 was operated at room temperature and effluent pH remained at values of 8.2 ± 0.1 . This pH could seem very high if it is considered that the pH of the FTOPs was around 4. This phenomenon can be explained as the FTOPs contain organic acids (mainly lactic, malic, formic and acetic acid) [22], which throughout the biological treatment are oxidized to CO_2 and H_2O . Thus, the pH values of the ML and the effluent increase. The pH in ML also remained constant while feeding due to the small FTOP volume added into reactor (low volume exchange ratio).

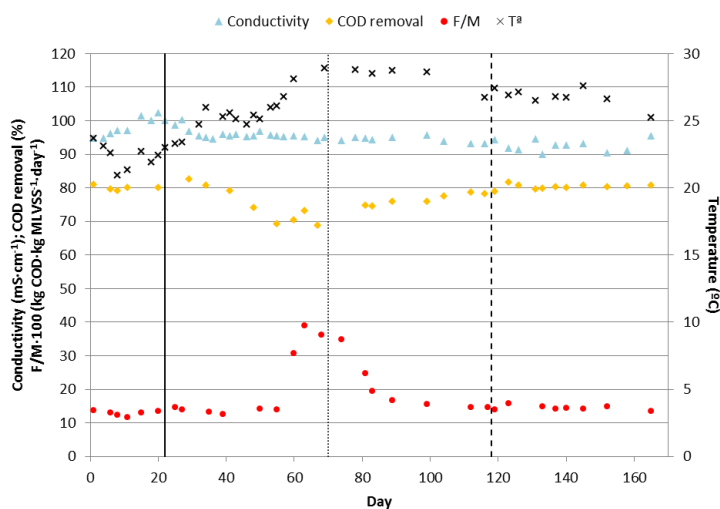


Figure VI.23. SBR-1: Conductivity, temperature, COD removal efficiency and F/M ratio. Vertical lines: [—] FTOP-2, [.....] FTOP-2 + nutrients ratio 250/5/1, [- - -] FTOP-2+10% excess nutrients.

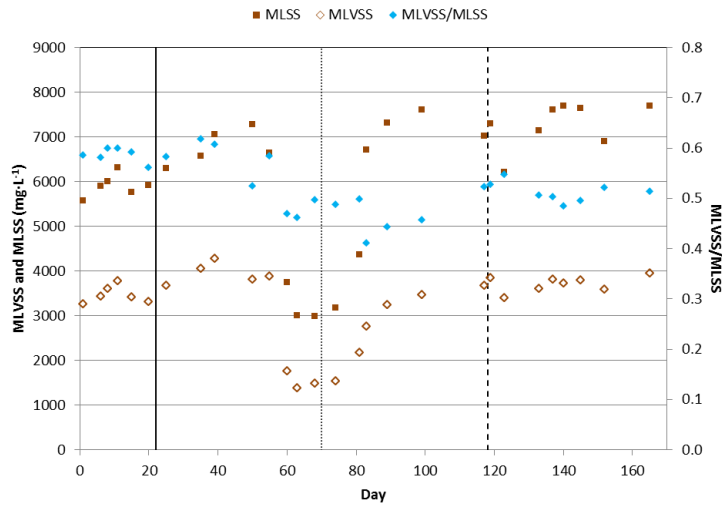


Figure VI.24. SBR-1: MLSS, MLVSS and MLVSS/MLSS ratio. Vertical lines: [—] FTOP-2, [.....] FTOP-2+nutrients ratio 250/5/1, [- - -] FTOP-2 + 10% excess nutrients.

Figure VI.23 represents the conductivity, temperature, COD removal efficiency and the F/M ratio in SBR-1. In Figure VI.24 the evolution of the MLSS, MLVSS and the ratio MLVSS/MLSS can be seen. The vertical lines in both figures indicates the FTOP change: FTOP-1 was fed during the first 22 days, FTOP-2 without nutrient addition from the 23rd to 69th, FTOP-2 with nutrient addition until reaching the ratio COD/N/P of 250/5/1, from the 70th to 117th and the last 48 days FTOP-2 after adding 10% on nutrients excess was fed.

Temperature was varying slightly throughout the experimental time as the experiment was carried out at room temperature. Regarding effluent conductivity, it can be observed that this parameter remained around 95 mS·cm⁻¹ from FTOP-2 feeding. While FTOP-1 was fed to SBR-1, the COD removal efficiency remained around 80%. The sudden increase in the feed COD, when FTOP-2 was fed, implied a fast increase of the MLSS above 4000 mg·L⁻¹ in the first

days. In spite of this, COD removal efficiency went on to decrease to a value of 68.8% (between 41st to 69th days). This fast decline in SBR-1 performance was mainly due to the fact that nitrogen and phosphorous concentrations in FTOP-2 were lower than what is required for the stoichiometric nutrient ratio and thus the microbial activity was limited [34]. The result was that the MLSS and MLVSS concentrations decreased markedly from the 41st day until nutrients were added. Through this period the MLSS decreased from 7050 to 2990 mg·L⁻¹ and the MLVSS from 4280 to 1490 mg·L⁻¹. It was due to the cell death caused by the lack of nutrients. As expected, the F/M ratio was increased from an average value of 0.133 ± 0.008 to $0.362 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in the 68th day, because of MLVSS decrease.

From 70th day, nutrients were added in FTOP-2 in a ratio of 250/5/1 (COD/N/P). It can be observed in Figure VI.23, that from that day on, the COD removal efficiency, MLSS and MLVSS increased to reach values of 80%, 7028 mg·L⁻¹ and 3670 mg·L⁻¹ (117th day), respectively.

From the 118th day a 10% nutrients excess was added in FTOP-2. During 48 days COD removal was maintained at $80.3 \pm 0.7\%$, the F/M ratio was $0.144 \pm 0.007 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, MLSS ranged between 6310 and 7140 mg·L⁻¹, and MLVSS ranged between 3600 and 2960 mg·L⁻¹. These values show that the excess of nutrients did not improve the SBR-1 performance. In contrast, other authors reported that for the biological treatment of hypersaline wastewater more nitrogen and phosphorous should be added. Moussavi et al. [1] recommended a ratio of 150/5/1 to treat synthetic saline wastewater containing phenol using an aerobic granular SBR. Dinçer and Kargi [40] suggested 100/10/1 for synthetic saline wastewater in a rotating biological disc system. Nevertheless, for FTOPs the additional expense in nutrients would not be justified.

The relationship MLVSS/MLSS in SBR-1 in the first 41 days was 0.59 ± 0.02 . From the 42nd to 83rd day the ratio of MLVSS/MLSS decreased to 0.41, because the low nutrients concentration in FTOP-2 increased the flocs mineralization. After 47 days of adding nutrients, the ratio of MLVSS/MLSS increased to 0.52

(117th day), which was maintained in 0.51 ± 0.01 . This low MLVSS/MLSS ratio is explained by the high amount of MLSS, between 6500 and 7500 mg·L⁻¹, which enhances endogenous respiration. As expected, it can be observed that the sludge settleability was maintained during the experimental period, despite the high MLSS, due to the formation of aerobic granules. Although no data on the size of the granules was reported, their formation was evident during the reactors start-up by direct observation of the sedimentation phase of the SBR cycles. Aerobic granulation in SBRs has been already reported by many researchers [41], including saline wastewater [42, 43]. These microbial structures are denser and consequently settle faster. However, their formation mechanism is a complex topic and no relationship has been found between granule growth and bacterial species, morphology and adaptation mechanism.

On the other hand, the total phenols removal was also affected by nutrients concentration. From FTOP-2 addition without nutrients enrichment, the percentage of total removed phenols decreased from 97.7% to 84.9% in the 53th day. Once nitrogen and phosphorous were added, phenols performance increased to 98.5% on the 147th day, which was maintained until the end of the experiment. These results agree with those reported [40]. In that work, authors increased the phenols removal performance from 60% to 78%, after nutrients addition (KH₂PO₄ and NH₄NO₃) in olive mill wastewater, which was also treated in a SBR.

As a conclusion, it can be stated that the limiting factor for increasing the COD and total phenols removal efficiency is not the nutrient addition, once stoichiometric dosing is performed. For this reason, a pretreatment with activated carbon was proposed in order to reduce the non-biodegradable COD.

Effect of adsorption treatment in the FTOP. Influence of the F/M ratio on reactor performance

Reactors performance with and without PAC pre-treatment

The experimental period of operation of SBR-2 was 132 days. This reactor was fed with FTOP-2 in the first 45th days (HTR = 40 days). From that day on, it was fed with FTOP-2_{PAC}. To keep the daily COD load, the HRT was reduced to 30 days. After the adsorption pre-treatment the ratio COD/N/P was found to be the stoichiometric one. The SBR-2 was also operated at room temperature and as in SBR-1, pH effluent remained at 8.6 ± 0.3 .

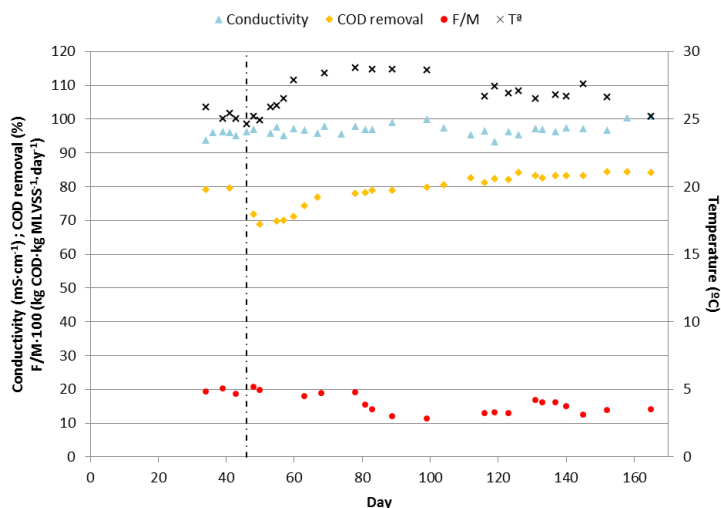


Figure VI.25. SBR-2: Conductivity, temperature, COD removal efficiency and F/M ratio. Vertical lines: [- · -] FTOP-2_{PAC}.

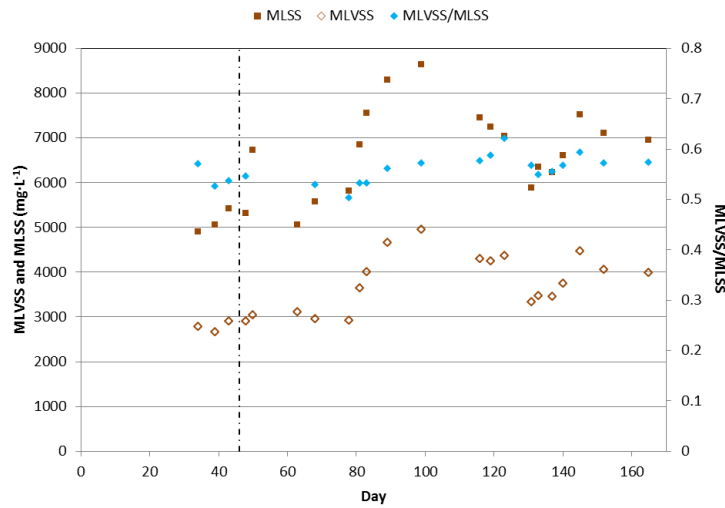


Figure VI.26. SBR-2: MLSS, MLVSS and F/M ratio. Vertical lines: [- · -] FTOP-2_{PAC}.

Figure VI.25 shows the conductivity, temperature, COD removal efficiency and the F/M ratio in SBR-2. In Figure VI.26 the evolution of MLSS, MLVSS and the ratio of MLVSS/MLSS in SBR-2 can be observed. The vertical lines show the change of FTOP-2 (without PAC pre-treatment) and FTOP-2_{PAC} in both figures. As both SBR-2 and SBR-1 were operated at a room temperature, the temperature profile in SBR-2 was identical to SBR-1. The effluent conductivity, which remained at $96.7 \pm 1.6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, was similar to that obtained in SBR-1, since the FTOP feeding both reactors was the same.

While FTOP-2 was fed in the first days, the COD removal in SBR-2 was similar to that achieved in SBR-1 (around 80%). Nevertheless, when FTOP-2_{PAC} was added, it can be observed that the COD removal decreased. This phenomenon was not due to a decrease in the reactor performance, but to the decrease of the influent COD. If Eq.(VI.10) is applied, the COD in FTOP-2_{PAC} was lower than FTOP-2, but the effluent COD in the first days was still very similar to that achieved when FTOP-2 had been fed. Therefore, it was observed that the COD

removal efficiency went down to 68.8%. Afterwards, the COD removal yield gradually increased reaching values around 80% after a few days.

In the first 78 days, the F/M ratio in SBR-2 was 0.193 ± 0.009 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹, which was higher than in SBR-1 (around 0.133 in the first 55 days). This was due to the fact that the MLSS and MLVSS concentrations in SBR-2 were smaller than those of SBR-1. To increase them up to similar values to those registered in SBR-1, no sludge was withdrawn until the 99th day. From the 89th to 166th day practically equal F/M ratios were maintained in both reactors. If the performances in both reactors from the 89th day (when operational parameters became similar) are compared, it can be observed that the COD removal efficiency in SBR-2 was higher than in SBR-1; $83.5 \pm 0.6\%$ in SBR-2 and $79.3 \pm 1.7\%$ in SBR-1, despite the HRT was reduced 10 days. This can be explained as the ratio of MLVSS/MLSS in SBR-2 (0.56 ± 0.03) was higher than in the SBR-1 (0.51 ± 0.02) and this means that more bacterial cells could contribute to the organic matter removal.

Total phenols removal in SBR-2 was above 97% during all the experimental period; thereby no effect of the adsorption pre-treatment and diminution of the HRT in SBR on phenols removal efficiency were observed.

The effect of HRT reduction and the influence of F/M ratio on the process performance

The experimental period with SBR-3 and SBR-4 were 116 days, during which FTOP-3_{PAC} and FTOP-4_{PAC} were fed (no nutrients were added). The HRT in SBR-3 was maintained in 30 days and it was reduced to 15 days in SBR-4. During experimental time, the pH remained around 8.7 ± 0.1 and 8.6 ± 0.1 in SBR-3 and SBR-4, respectively. Conductivity was around $88 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ in both reactors and the temperature ranged between 18 and 24°C.

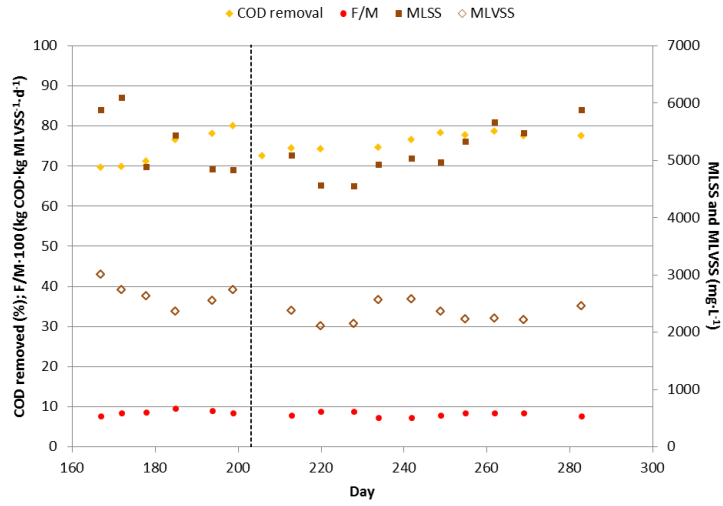


Figure VI.27. SBR-3: COD removal, F/M ratio, MLSS and MLVSS. Vertical lines: [- - -] FTOP-4_{PAC}.

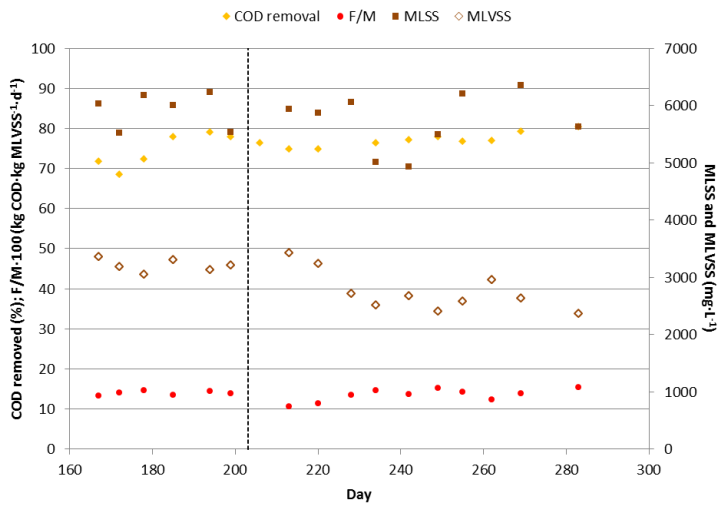


Figure VI.28. SBR-3: COD removal, F/M ratio, MLSS and MLVSS. Vertical lines: [- - -] FTOP-4_{PAC}.

In Figure VI.27 and Figure VI.28, the evolution of COD removal, F/M, MLSS and MLVSS of SBR-3 and SBR-4, respectively, can be seen. The vertical line shows the change from FTOP-3_{PAC} to FTOP-4_{PAC}.

In these figures, it can be seen the initial decrease in the COD removal efficiency, because the effluent COD was not yet adapted to the new influent COD. For the remaining experimental time, the COD removal yield was similar in both reactors despite the HRT was the half in SBR-4. In the last 50 days, the COD removal percentage remained in $77.1 \pm 1.4\%$ and $77.8 \pm 1.5\%$ in SBR-3 and SBR-4, respectively. The MLSS and MLVSS were higher for SBR-4 than SBR-3 during the 116 experimental days, since at the same time sludge withdrawal was carried out in both reactors. This was due to the differences between the F/M ratios.

The F/M was maintained in 0.081 ± 0.007 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ in SBR-3 and 0.135 ± 0.012 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ in SBR-4. The organic removal efficiency, sludge properties and microbial composition are influenced by the F/M ratio. Higher F/M values imply that the metabolic activity and microbial growth are improved [44]. Conversely, if F/M ratio is too low the cell growth is limited [45]. Specialized literature reports values between 0.05 and 0.30 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ for sequential reactors [45] and around 0.07-0.08 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ to treat wastewater containing 400 mg·L⁻¹ of total phenols, 1400 mg·L⁻¹ of COD and 20 g·L⁻¹ of chlorides [46].

Regarding total phenols removal, the concentration in the effluent was below 6 mg TY·L⁻¹ in both reactors, which implies around 97% of removal efficiencies. The phenolic profiles for FTOP-4_{PAC} and SBR-4 effluent, at the end of experimental days, are shown in Figure VI.29. In this figure it can be observed that HTY and TY were the main phenolic compounds in FTOP-4_{PAC} (as in the others FTOPs). Hydroquinone was used as an internal standard. The phenolic compounds were degraded through the biological treatment as observed in the HPLC analysis of the effluent from SBR-4, which confirms the results of total phenols measurement analysed by Folin-Ciocalteu method.

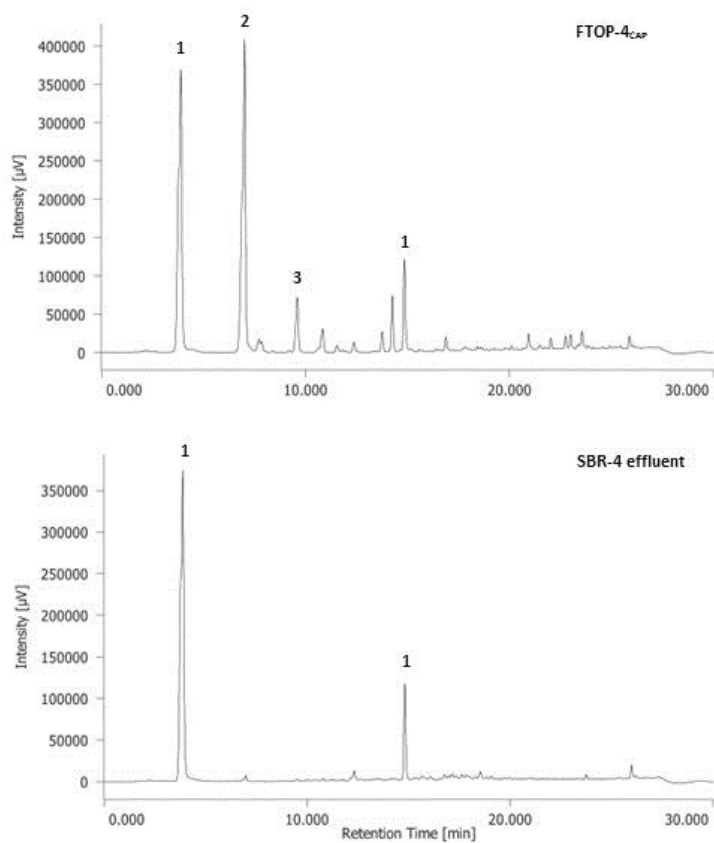


Figure VI.29. FTOP-4_{PAC} and SBR-4 effluent phenolic profile. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.

Microbial community analysis

As commented in methodology section, *γ-Proteobacteria* was quantified in the SBRs. In Figure VI.30, the percentage and uncertainty of this bacterial class, isolated from the total population, is represented.

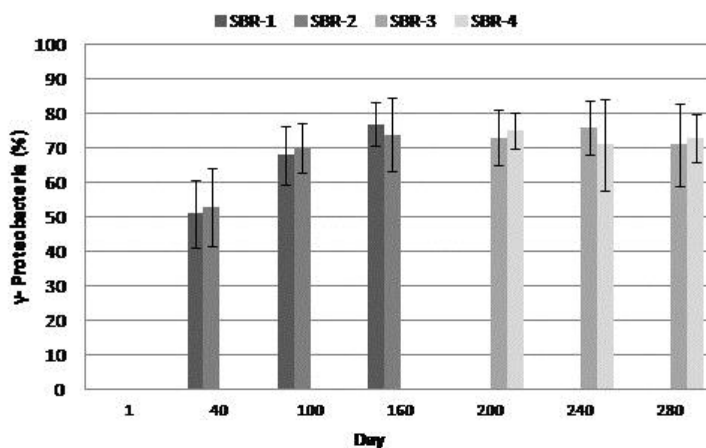


Figure VI.30. Quantification of γ -Proteobacteria in the SBRs.

It can be seen that γ -Proteobacteria was the predominant class in the microbial community of the four SBRs during all the experiments. In the period from 40th to 160th day, γ -Proteobacteria percentage increased in SBR-1 and SBR-2 from 51% and 53% to 77% and 74%, respectively. In SBR-3 and SBR-4 the percentages remained in $73.3 \pm 2.5\%$ and $73.0 \pm 2.0\%$. Thus, it can be concluded that independently of the nutrients added and on the tested HRT, the percentage of γ -Proteobacteria in the microbial community remained unaltered. The main role of γ -Proteobacteria in the hypersaline environments has also been reported in other research works [47, 48]. Dosta et al. [49] treated hypersaline wastewaters with phenolic content by MBR system, also reporting that γ -Proteobacteria was the predominant bacterial class in the microbial community. Other authors as Wang et al. [12] studied the SBR performance in the removal of phenol under conditions of high salinity ($80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). These researchers also concluded that Proteobacteria strains were able to tolerate high concentration of phenolic compounds ($1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Statistical analysis

The p-values obtained for the variances analysis of HRT, F/M ratio and relationship COD/N/P, when COD removal percentage was the dependent parameter, were 0.3681, 0.0004 and 0.0678, respectively. These results showed that the F/M ratio was the only statistically significant factor since the p-value was lower than 0.05. It is important to note that the relationship COD/N/P in the FTOP took a p-value near to this set limit.

VI.2.2.4. Conclusions

In this work, it can be concluded that the biological treatment of FTOP is technically feasible since the SBRs have treated the FTOP during 10 months successfully. The main conclusions are the following:

- The appropriate relationship COD/N/P in the FTOP is 250/5/1. An excess of organic matter in relation to nutrients, implied a COD removal efficiency diminution. An excess of nutrients over 250/5/1 ratio did not improve the COD and total phenols removal efficiency.
- The PAC adsorption was an effective pre-treatment to reduce the COD and phenolic compounds in the FTOPs, which can lead to reduce the HRT of the reactors. Another advantage of PAC treatment is the achievement of more homogeneous SBR influents in terms of composition. The PAC concentration can be varied according to the initial COD and phenols values and the required final concentrations.
- The experiments proved that the F/M ratio have to be around $0.14 \text{ kg COD} \cdot \text{kg MLVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for the FTOPs treatment.
- The adsorption pre-treatment let the HRT to reduce from 40 to 15 days maintaining the biological treatment performance. Thus, the COD and

total phenols removal percentages were around 78% and 97%, respectively.

- *γ-Proteobacteria* was the main bacterial class, which represented around 74% of the microbial community, in the four SBR studied.

VI.2.2.5. References

- [1] G. Moussavi, B. Barikbin, M. Mahmoudi, Chem. Eng. J. 158 (2010), 498–504.
- [2] ASEMESA. Asociación Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. (http://www.asesesa.es/content/datos_generales_del_sector. Last accesses; December (2014).
- [3] V. Marsilio, B. Lanza, J. Sci. Food Agric. 76 (1998), 520–524.
- [4] A. Garrido-Fernández, M.J. Fernández-Díez, M.R. Adams, Table olives. Production and processing, Chapman and Hall, London, 1997, pp. 496.
- [5] R. Malheiro, A. Sousa, S. Casal, A. Bento, J.A. Pereira, Food Chem. Toxicol. 49 (2011) 450–457.
- [6] A. Chiavola, G. Farabegoli, F. Antonetti, Biochem. Eng. J. 85 (2014,) 71–78.
- [7] A. Günay, M. Çetin, Int. Biodeterior. Biodegrad. 85 (2013), 237–242.
- [8] J. Beltrán, T. Gonzalez, J. Garcia, J. Hazard. Mater. 154 (2008), 839–845.
- [9] G.G. Aggelis, H.N. Gavala, G. Lyberatos, J. Agr. Eng. Res. 80 (2001), 283–292.
- [10] M. Kotsou, A. Kyriacou, K.E. Lasaridi, G. Pilidis, Process Biochem. 39 (2004), 1653–1660.
- [11] P. Maza-Márquez, M.V. Martínez-Toledo, J. González-López, B. Rodelas, B. Juárez-Jiménez, M. Fenice, Int. Biodeterior. Biodegrad. 82 (2013), 192–198.

- [12] Y.F.Wang, X.L. Wang, H. Li, K.F. Lin, P. Wang, J. Yang, Y.D. Liu, Z.Y. Sun, L.H. Fan, Z.M. Wu, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93 (2014), 138–144.
- [13] A. Haddadi, M. Shavandi, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 29–34.
- [14] B.M. Peyton, T. Wilson, D.R. Yonge, *Water Res.* 36 (2002), 4811–4820.
- [15] F. Kargi, A.R. Dincer, *Enzym. Microb. Technol.* 19 (1996), 529–537.
- [16] M. Behnood, B. Nasernejad, M. Nikazar, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014), 1879–1885.
- [17] H. El-Naas Muftah, Al-Zuhair Sulaiman, M. Souzan, *J. Ind. Eng. Chem.* 16 (2010), 267–272.
- [18] S. Sivasubramanian, S. Karthick Raja Namasivayam, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015), 243–252.
- [19] A. Mittal, J. Mittal, A. Malviya, D. Kaur, V.K. Gupta, *J. Colloid Interface Sci.* 342 (2) (2010), 518–527.
- [20] A. Mittal, D. Kaur, A. Malviya, J. Mittal, V.K. Gupta, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2) (2009), 345–354.
- [21] A. Mittal, J. Mittal, A. Malviya, V.K., Gupta, *J. Colloid Interface Sci.* 340 (1) (2009), 16–26.
- [22] V.K. Gupta, I. Ali, T.A. Saleh, A. Nayaka, S. Agarwal, *RSC Advances*, 2 (16) (2012), 6380–6388.
- [23] A. K. Jain, V. K. Gupta, A. Bhatnagar, Suhas, *Sep. Sci. Technol.*, 38 (2) (2003), 463–481.
- [24] T.A. Saleh, V.K. Gupta, *Adv. Colloid Interface Sci.* 211 (2014), 92–100.
- [25] V.K. Gupta, R. Kumar, A. Nayak, T.A. Saleh, M.A. Barakat, *Adv. Colloid Interface Sci.* 193–194 (2013), 24–34.
- [26] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, J.L. Alonso-Molina, L. Pastor-Alcañiz, *Chem. Eng. J.* 273 (2015), 595–602.

- [27] I. Fendri, M. Chamkha, M. Bouaziz, M. Labat, S. Sayadi, S. Abdelkafi, *Environ. Technol.* 34 (2013), 1–13.
- [28] C. Romero-Barranco, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido-Fernández, *J. Food Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [29] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, Th.S. Giannopoulos, G.A. Pilidis, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007), 339–343.
- [30] W.W Eckenfelder, P. Grau, *Activated sludge process designs and control: theory and practice*, Ed. Technomic Publishing AG, Lancaster, Pennsylvania, 1992, pp. 156–159.
- [31] APHA AWWA WEF, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, 2005.
- [32] A. El-Abbassi, M. Khayet, A. Hafidi, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [33] V. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, *Methods Enzymol.* 299 (1999), 152–178.
- [34] Metcalf & Eddy, G. Tchobanoglous, H.D. Stensel, R. Tsuchihashi, F. Burton, *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*, fourth ed., McGraw-Hill, New York, 2003, pp. 1830.
- [35] M.L. Soto, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, *J. Food Eng.* 105 (2011), 1–27.
- [36] H. Kiai, A. Hafidi, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2) (2014), 663–670.
- [37] D. Ryan, K. Robards, S. Lavee, *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (1999), 265–274.
- [38] M. Brenes, L. Rejano, P. Garcia, A.H. Sanchez, A. Garrido, *J. Agric Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [39] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, L. Pastor-Alcañiz, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (1) (2016), 131–137.
- [40] A.R. Dinçer, F. Kargi, *Process Biochem.* 36 (2001), 901–906.

- [41] D.J. Lee, Y.Y. Chen, K.Y. Show, C.G. Whiteley, J.H. Tay, *Biotechnol. Adv.* 28 (6) (2010), 919–934.
- [42] E. Taheri, M.H. Khiadani Hajian, M.M. Amin, M. Nikaeen, A. Hassanzadeh, *Bioresour. Technol.* 111 (2012), 21–26.
- [43] S.F. Corsino, M. Capodici, C. Morici, M. Torregrossa, G. Viviani, *Water Research*, 88 (2016), 329–336.
- [44] J. Lobos, C. Wisniewski, M. Heran, A. Grasmick, *J. Memb. Sci.* 317 (1–2) (2008), 71–77.
- [45] Y. Liu, H. Liu, L. Cui, K. Zhang, *Desalination*, 297 (2012), 97–103.
- [46] S. Teruel-Fernández, *Tratamiento biológico de aguas residuales industriales en medio salino. Metodología de la puesta en marcha y análisis de la adaptación de los fangos activos*, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 2001.
- [47] Q.L. Wu, G. Zwart, M. Schauer, M. Kamst-van Agterveld, M.W. Hahn, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006), 5478–5485.
- [48] S.J. Park, C.H. Kang, S.K. Rhee, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2006), 1640–1645.
- [49] J. Dosta, J.M. Nieto, J. Vila, M. Grifoll, J. Mata-Álvarez, *Bioresour. Technol.* 102 (2011), 4013–4020.

VI.2.3. Influencia de los parámetros operacionales sobre la eliminación de la materia orgánica y la población protista del fango activo

Este artículo se ha enviado a la revista Journal of Industrial and Engineering Chemistry. Esta revista está situada en el primer cuartil de las disciplinas de ingeniería ambiental, ciencias ambientales y recursos hídricos (índice de impacto de 4,179 según el Journal Citation Reports en 2015).



Abstract

Biological treatment of fermentation brines from table olive processing (FTOP) entails many difficulties due to their very high salinity and high COD concentration, which include some phenolic compounds. These extreme conditions limit the biodiversity of the microbial population appearing in this biological treatment. Experiments treating FTOP were performed in laboratory sequencing batch reactors (SBR) changing operating conditions of the SBRs during their operation, in order to study the effects on the SBR performance and on the protist population. During this experiments setup the dominant ciliate

population was *Pseudocohnilembus persalinus*. This ciliate population was reduced at certain moments and then an important flagellate population of the genus *Chilomastix* was the main or even the only growing protist in the plant. The statistical study showed the best operational conditions to achieve the highest COD removal efficiencies. This study demonstrates as well the effects of the operating parameters on the protist populations and their relationship of these to COD removal efficiencies.

Keywords: *Pseudocohnilembus*; *Chilomastix*; hypersaline wastewater; SBR; table olives.

VI.2.3.1. Introduction

Management of hypersaline wastewaters containing also organic matter is very complicated. This type of effluents can be found in some industries such as food-processing, leather and petroleum industries [1]. One particular case is the fermentation brine from the table olive processing (FTOP). Spanish style table olive processing consists of three steps: debittering, washing and fermentation. The wastewater volume generated in this process is about 3.9–7.5 m³ per tonne of green olives, corresponding the 20% of this volume to FTOP [2]. The olive harvesting is mainly carried out in autumn; therefore the main wastewater volume of the olive processing is generated in this period (debittering and washing effluents). Nevertheless, the FTOP and the packing solutions are produced during all the year [3, 4]. The main FTOP characteristics are their high salinity (conductivity around 80 mS·cm⁻¹) and high COD concentration due to oil and greases, remaining sugars after fermentation, phenolic compounds and volatile organic acids [5]. The COD and the phenolic compounds concentrations in the FTOP depend on the olive maturity [6], cultivar [7, 8] and fermentation time [9]. Consequently, it can be stated that these effluents are very difficult to manage and traditionally they have been

either disposed in evaporation ponds or transported to large wastewater treatment plants for their dilution. Nevertheless, nowadays more stringent environmental legislation compels to look for environmental-friendly solutions. One of them is the biological treatment.

The aerobic biological treatment of the organic matter in the industrial saline wastewater is very complex [10, 11]. The negative effects of high salt concentrations on conventional activated sludge are well known. Under these conditions, the floc stability (hydrophobicity, filterability, settlement...) [12] and the COD removal efficiency [1, 13] decrease. Uygur and Kargi [14] reported the deterioration of the biological process when salinity increased up to 6%. This deterioration could be observed by the increase of the COD in the treated wastewater due to loss of bacterial activity and plasmolysis. Additionally, the bactericidal effects of the phenolic compounds on the microorganisms, further hampers the biological process [15, 16]. Thus, in order to perform a successfully FTOP biological treatment, a slow and gradual process start-up and high hydraulic retention times to overcome the loss of enzymatic activity would be needed [17].

The biomass of biological reactors treating hypersaline wastewaters is formed mainly by bacteria. Salvadó et al. [18] studied the effect of salt addition on the protozoan and metazoan population of a conventional activated sludge. These authors concluded that neither metazoa nor protozoa were found in the activated sludge after 24 h from the addition of $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of NaCl. The same effect was reported by Bassin et al. [19], who decreased the limiting salinity to $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Thus, the existence of ciliate in the microbial community of a biological reactor treating hypersaline wastewater is not frequent.

Pseudocohnilembus is a genus of free-living scuticociliates described mainly in marine or brackish environmental conditions [20-27]. Table VI.18 summarizes *Pseudocohnilembus* species described to date and their environmental locations.

Table VI.18. *Pseudocohnilembus* species descriptions, environmental locations and cyst presence reported to date.

Species	Environment	Cysts	Publication
<i>P. persalinus</i>		Yes	
<i>P. hargisi</i>	Salt Lake Marine (Shore)	-	[20]
<i>P. longisetus</i>		Yes	
<i>P. marinus</i>	Marine	-	[21]
<i>P. hargisi</i>	Tidal marsh	-	[22]
<i>P. putrinus</i> (Kahl, 1928) nov.comb.	Soil	-	
<i>P. pusillus</i> I (Quennerstedt, 1869) nov. comb.	Freshwater	-	[23]
<i>P. pusillus</i> II (Quennerstedt, 1869) nov. comb.	Tide pool	-	
<i>P. marinus</i> (Thompson, 1966)	Salt Lake	-	
<i>P. cantabricus</i>	Marine	-	[24]
<i>P. pusillus</i>	Salt Lake	Yes	[25]
<i>P. hargisi</i>	Marine	-	[26]
<i>P. hargisi</i>	Marine	-	[27]
<i>P. hargisi</i>	Shrimp culturing pond	-	[39]
<i>P. hargisi</i>	Marine	-	[40]
<i>P. longisetus</i>	Fish farm	Yes	
<i>P. persalinus</i>	Marine (pathogenic)	Yes	[33]
<i>P. persalinus</i>	Marine	-	[41]

Furthermore, some of these species have been recently described as pathogenic in mollusks and fish [28-33]. Only two species of this genus have been cited or found in fresh-waters (*P. putrinum* and *P. pusillus*) [23, 34, 35] and from these only *Pseudocohnilembus pusillus* has been found in wastewater [36-38].

In this work a population of this genus was found in the mixed liquor of five laboratory sequencing batch reactors (SBRs) treating FTOP. Populations were followed almost for ten months to assess possible relationships of the protist dynamics in the plant with the physical-chemical or operational conditions of the SBRs.

VI.2.3.2. Material and Methods

Wastewater samples processed in the SBRs

Four different FTOP samples provided by a table olive processing company located in Comunitat Valenciana (Spain) were used as feed for the SBRs in the sampling period. Each sample was stored at 4°C until its use. It was checked that wastewater characteristics had not been changed before its use. Table VI.19 summarizes the average values of the measured parameters (by triplicate) of each FTOP sample

It can be observed that the FTOPs are acidic wastewaters, which is due to the volatile acids such as lactic, formic, malic and acetic acid [5]. The high conductivity values are due to the NaCl used in the fermentation brine preparation, which contain around 8% of salt [3, 4]. The high total phenols content is explained by the polyphenols transfer, mainly ligstroside and oleuropein [42], from the olive to the wastewater. These compounds become tyrosol and hydroxytyrosol after their hydrolysis (during debittering process), which are the main phenolic compounds in the FTOP [4, 42]. Thus, the inhibition of the biological process and the characteristics of the biomass would not depend only on the hypersaline conditions but on the presence of high

concentration of phenols, whose bactericidal effects are known [43, 44]. The variability of the FTOP characteristics has already been described in the introduction section.

Table VI.19. FTOP characteristics.

Characteristics (*)	FTOP-1	FTOP-2	FTOP-3	FTOP-4
Sampling	1-2	3-6	7-9	10-12
pH	3.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2
Cond (mS·cm ⁻¹)	94.1 ± 0.1	74.2 ± 0.3	78.8 ± 0.3	79.0 ± 0.1
COD (g·L ⁻¹)	21.50 ± 0.08	14.15 ± 0.06	7.60 ± 0.02	6.23 ± 0.03
N _T (mg·L ⁻¹)	352 ± 2	301 ± 8	205 ± 12	247 ± 7
P _T (mg·L ⁻¹)	76 ± 2	43 ± 2	35 ± 5	23 ± 2
Cl ⁻ (g·L ⁻¹)	44.93 ± 0.32	33.41 ± 0.24	38.48 ± 0.09	40.17 ± 0.11
T.Ph (mg TY·L ⁻¹)	1550 ± 34	885 ± 12	567 ± 13	425 ± 4
SS (mg·L ⁻¹)	1237 ± 43	971 ± 26	762 ± 9	1236 ± 11
VSS (mg·L ⁻¹)	511 ± 22	523 ± 15	402 ± 13	598 ± 9

* The parameters are explained in the Analysis subsection. Values represent mean ± standard deviation

Table VI.19 also shows which FTOP was fed to the SBRs in the different samplings carried out to identify and quantify the protist population. Samplings were performed every three weeks to a total of 12.

In SBR-3, SBR-3A and SBR-3B, the used FTOPs were the same FTOPs reported in Table VI.19 after pre-treatment with powder activated carbon (PAC), in order to reduce by adsorption the COD and the total phenols (T.Ph) concentration. The adsorption treatment was performed to obtain a T.Ph concentration of 400 mg TY·L⁻¹ in FTOP-1 and FTOP-2 and 200 mg TY·L⁻¹ in FTOP-3 and FTOP-4. The mean COD reduction percentage achieved in the four pre-treated FTOP was 15.9 ± 4.8%.

Biological reactors

The SBRs were operated during 293 days. The first samples to perform the protist analysis were taken after 48 days from the beginning of their planned operation. It is important to mention that the biomass was previously adapted to the FTOP as described in Ferrer-Polonio et al. [17]. Thus, adapted drawn sludge was seeded in the reactors for these experiments. In a first experimental period (Step-1, 173 days), three SBRs (named SBR-1, SBR-2 and SBR-3) were operated in parallel (until sampling 6). From this day on, SBR-3 was split into two new reactors (SBR-3A and SBR-3B) and a new experimental period (Step-2) was started. In Step-2, four SBRs (SBR-1, SBR-2, SBR-3A and SBR-3B) were operated in parallel. Figure VI.31 shows the SBRs operation through the experimental time.

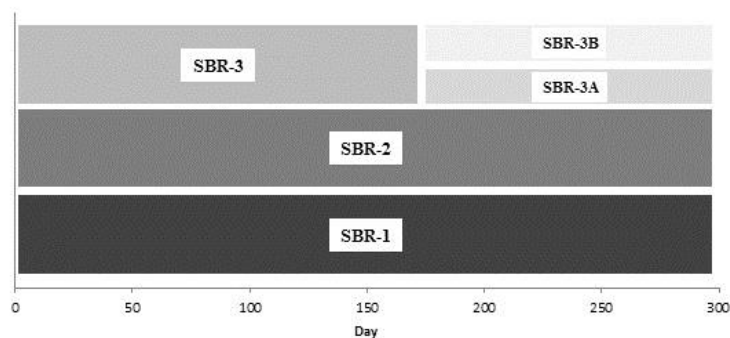


Figure VI.31. SBRs operational time.

All the bioreactors were identically equipped (reported in Ferrer-Polonio et al. [17]). Nevertheless, SBR-1, SBR-2 and SBR-3 worked with a reaction volume of 6L while SBR-3A and SBR-3B had a reaction volume of 3 L. All the SBRs were operated with 24 hours cycles including the following phases: filling (2 min), anoxic reaction (1 h), aerobic reaction (21 h), settling (1.5 h), drawing (2 min) and idle (26 min).

The variables selected in the operation of the reactors, to study their effect on the protist population and the reactors performance, were the hydraulic retention time (HRT), the temperature, the F/M ratio and the pre-treatment of the FTOP. Table VI.20 summarizes the operational characteristics of the SBRs used.

Table VI.20. Operational conditions in the SBRs.

	SBR-1	SBR-2	SBR-3	SBR-3A	SBR-3B
STEP-1 (0-173 days; sampling 1-6; FTOP-1 and FTOP-2)					
HRT (days)	40	40	30	-	-
T ^a (°C)	ambient	30±1	ambient	-	-
F/M	≈ 0.13	≈ 0.13	≈ 0.13	-	-
Adsorp. Treat.	non	non	yes	-	-
STEP-2 (174-293 days; sampling 7-12; FTOP-3 and FTOP-4)					
HRT (days)	19	32	-	30	15
T ^a (°C)	ambient	30±1	-	ambient	ambient
F/M	≈ 0.13	≈ 0.08	-	≈ 0.08	≈ 0.13
Adsorp. Treat.	non	non	-	yes	yes

The temperature was maintained constant in SBR-2 using an external heating system, but it was not controlled in the rest of the reactors. SBR-1 and SBR-2 were fed with the FTOPs reported in Table VI.19, while the other SBRs used pre-treated FTOP, according to the method explained in subsection 2.1.

In Step-1, the HRT was adjusted to 30 days in SBR-3 to keep a similar F/M ratio in three reactors (pretreated feed used in SBR-3 had lower COD). The HRT values were lowered by feeding higher FTOP volumes. In Step-2, the same F/M ratio as Step-1 was maintained in SBR-1 and SBR-3B. The reduction in the HRT in SBR-1 to 19 days was possible without reducing the process

performance, due to the reduction of the COD in FTOP-3 and FTOP-4. In SBR-3B, the HRT was 15 days. On the other hand, the F/M ratio in SBR-2 and SBR-3A was reduced by 40% varying the HRT.

Analysis

The FTOP parameters reported in Table VI.19 were measured after reception. On the other hand, the effluent and the mixed liquor of each SBR were characterized twice a week. The parameters measured were: pH, conductivity, soluble COD (filtered to 0.45 μm), mixed liquor suspended solids (MLSS) and mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS). The food-to-microorganism ratio (F/M ratio) was calculated using the following equation [45]:

$$F/M = \frac{\text{COD}_0 \cdot Q}{V_R \cdot \text{MLVSS}} \quad \text{Eq.(VI.12)}$$

where COD_0 was the chemical oxygen demand of the FTOP used ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), Q was the flow rate fed into the SBR ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$), V_R was the reaction volume (L) and the MLVSS was measured as $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Furthermore, the observed sludge yield (Y_{obs}) was calculated to evaluate the biomass growth [Eq.(VI.13)]. This parameter is the amount of the biomass formed per mass unit of substrate used in the biochemical process [46, 47].

$$Y_{\text{obs}} = \frac{\text{MLVSS}_{\text{produced}}}{\text{COD}_{\text{removed}}} = \frac{(\text{MLVSS}_j - \text{MLVSS}_i) \cdot (V_R/t) + X_e \cdot (V_d/t)}{(\text{COD}_0 - \text{COD}_e) \cdot (V_d/t)} \quad \text{Eq.(VI.13)}$$

where t is the time interval between two days “i” and “j”(no sludge was withdrawn in between), X_e was the mean volatile suspended solids concentrations in the effluent ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) in this time span, V_d was the influent/effluent volume (L) and COD_e was the mean chemical oxygen demand measured in the effluent at the time interval t .

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (both from Crison), respectively. The SS, VSS, MLSS and MLVSS were measured according to APHA, 2005 [48]. The N_T , P_T , Cl^- and soluble COD concentration were analyzed using kits and a Spectrophotometer DR600 (Hach Lange), after the appropriate dilutions to avoid interferences.

Biological analysis

Samples of the mixed liquors (20 mL) were taken every three weeks in each SBR for the biological analysis. These samples were preserved straight away after collection with acidified Lugol solution (20% v/v) to enumerate protists. Fixed samples were kept refrigerated (4°C) until counting procedure was carried out. Some of the samples collected were kept alive to identify protists; these samples were maintained in the lab at room temperature.

Ciliates enumeration was carried out on 1 mL aliquots of the fixed samples in a Sedgewick-Rafter counting chamber when abundance was low. When ciliate abundances were high counting procedures were carried out on 25 μ L aliquots. In this case, coverslips were sealed to the slide with Vaseline to set a smaller counting chamber and to avoid sample evaporation during the enumeration. Triplicate counting procedures were carried out for every sample. Flagellates appearance was recorded during the ciliates counting procedures when observed since they only appeared in just a few dates.

Ciliates identification was done on live observation of mixed liquor samples or on cultures from these samples. Large quantities of ciliates appeared to survive in the samples where high numbers of bacteria and organic matter was present. Culturing procedures were attempted with the unfixed original samples using a culture media prepared with sodium chloride solutions on mineral water or with filtered mixed liquor. These cultures were prepared at the same conductivity measured in the original samples. Cultures were inoculated with the original

sample plus a wheat grain or wheat media, which were added to promote bacterial growth. However, no stability or long term maintenance was possible within these cultures and ciliates eventually disappeared. Live observations were carried out in these samples to assess characteristics of the protists found. Measurements of the live cells were carried out on photographs taken at x40 under phase contrast or DIC microscopy (in an Olympus BX50 and a Nikon Eclipse 80i microscopes respectively). During these procedures, ciliates were also stained with silver impregnation protocols to resolve ciliary and infraciliary patterns necessary for proper ciliates identification. Cells were collected directly from samples or cultures with a micropipette and then these were suspended in a small volume (0.5 mL) of 0.2 μm filtered wastewater in an excavated slide. Fixation was then carried out with two drops of commercial formalin (37%). Fixed ciliates were washed with distilled water at least three times. Final volume was reduced to a small drop with fixed ciliates and then the silver carbonate staining procedure [49], modified for small volumes, was developed adding at least 1 mL of the silver carbonate mix in the same excavated slide. The excavated slide was set in a water bath at 65°C until the staining mixture changed color as in the ordinary silver carbonate methodology [49]. Stained ciliates were collected with a micropipette and observed under a Nikon Eclipse 80i microscope for proper species identification.

Flagellates identification was done on fixed samples taking into account cell shape, size, flagella number, flagella insertion and karyomastigont position.

Statistical analysis

A matrix with raw data of physical-chemical variables (influent, mixed liquor and effluent), biological variables (ciliate counts and presence/absence of flagellates) and operational characteristics (HRT, temperature and F/M ratio) was arranged for statistical analysis. The included influent parameters were the COD and T.Ph masses fed per day and liter of reactor volume ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$). These influent parameters were referred to the reaction volume since

experiments were performed with SBRs of different reaction volume (6 and 3 L). The MLVSS concentration was selected as parameter of the mixed liquor. Finally, the effluent variables considered were: pH, conductivity ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), COD concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in the effluent and the COD removal efficiency (%). The Y_{obs} was not included in the statistical analysis because there were insufficient data coinciding with sampling days.

Analysis was carried out with Statgraphics Centurion XVII v.17.1.12 and SPAD v8.0 software packages. ANOVA, Multiple Linear Regression Analysis, Logistic Regression and Multivariate Analysis (PCA and Hierarchical Cluster Analysis) were carried out. Principal Component Analysis (PCA) was used for the ordination of samplings based only on physical-chemical variables, then factors from this analysis accounting for at least an explained 88% cumulative percentage were selected for Hierarchical Cluster Analysis (RECIP module in SPAD v.7.0) using then physical-chemical variables to explain cluster partitions; description and characterization of sampling clusters were assessed with a χ -test to define biological and/or physical-chemical variables significantly associated to them.

VI.2.3.3. Results and Discussion

Identification of the protist population

A large population of the ciliate *Pseudocohnilembus* sp. was found in the mixed liquor of the different laboratory SBRs treating the FTOP. Initially, this ciliate was the dominant and only protist population present reaching over 50,000 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ in some of the sampling dates of Step-1. Eventually a heterotrophic flagellate appeared sometimes with minimal numbers, which in turn became the dominant population just on one sampling date when the ciliate disappeared completely in SBR-2 (sampling 6). The limited presence of eukaryotes in the autochthonous microbial community of industrial hypersaline wastewater treatments has also been noted previously by other authors [50, 51]. The

absence of protists in the biological wastewater treatments, especially ciliates, produces low quality effluents with higher turbidity. This is due to the fact that these microorganisms are important bacterial predators and also promote flocculation [52, 53]. Therefore it was interesting to investigate the dynamics and function of these protists and their relationship to other physical-chemical factors as well as performance in the SBR.

A threefold approach was used to study this ciliate and its variability within the SBRs. Firstly, the taxonomic identity of the ciliate and the flagellate appearing as main protist populations in the systems was assessed; secondly, the population development and variability in the SBRs were followed to find significant differences among them and finally, the relationships of the protist population dynamics and the physical-chemical and/or operational conditions in the plants were evaluated.

The ciliates observed in live samples from the SBRs were tentatively identified as *Pseudocohnilembus* sp. This ciliate during the study showed two different life stages: trophic and cyst stages (Figure VI.32).

The trophic forms of this species had spindle to pyriform shape with a narrow anterior end and a rounded posterior end. As it has been observed previously in other species of this genus [25, 54], the cells became smaller and more elongated with starvation, with the anterior end bending to the right. A single caudal cilium could be observed in the posterior pole. Contractile vacuole was located terminally also in the posterior pole of the cell. The cyst was rounded to ovoid with a thick cover very refractile under DIC; contractile vacuole was usually visible within many cysts, which allowed locating the posterior pole of the early cyst morphogenesis. The ciliates contributed to the appearance of large flocs in the mixed liquor due to the gregarious behavior of this ciliate species during the cyst formation. Large numbers of cysts usually appeared associated in flocs as it has been observed by other authors [25] and flocs in this case were usually packed with cysts.



Figure VI.32. Live observation of vegetative (trophic) and cyst stages under DIC microscopy (x40). (a-c): Trophic stage; the ciliates fed on bacteria predated actively on the surface of the flocs. Contractile vacuoles (CV) and caudal cilium (CC) in the posterior pole. Bacteria can be observed in the digestive vacuoles (arrow in c). (d-g): The cyst stages. Contractile vacuole (CV) visible (g). Scale Bars: 10 μm .

The mean size of the trophic stage had 26.1 x 9.5 μm (lugol's fixed; n=130), while cysts had 15.0 x 10.8 μm (lugol's fixed; n=4). After silver carbonate impregnation (Figure VI.33), the ciliates showed nine bipolar somatic kineties, with dikinetids in the anterior end of the cell and monokinetids in the posterior end of the cell. The contractile vacuole pore was located at the end of the third somatic kinety. The oral infraciliation with a mean length of 12.6 μm (lugol's fixed; n=33) was composed by a haplokinety, almost straight, with a paroral membrane and three polykineties: a polykinety 1 (Pk1) long with a posterior end which is continuous with the haplokinety. Pk1 is also running parallel to the polykinety 2 (Pk2) and it is almost perpendicular to the polykinety 3 (Pk3). Large rounded macronuclei are located over the equatorial plane of the cell and small micronuclei are generally attached on the anterior area of the macronuclei.

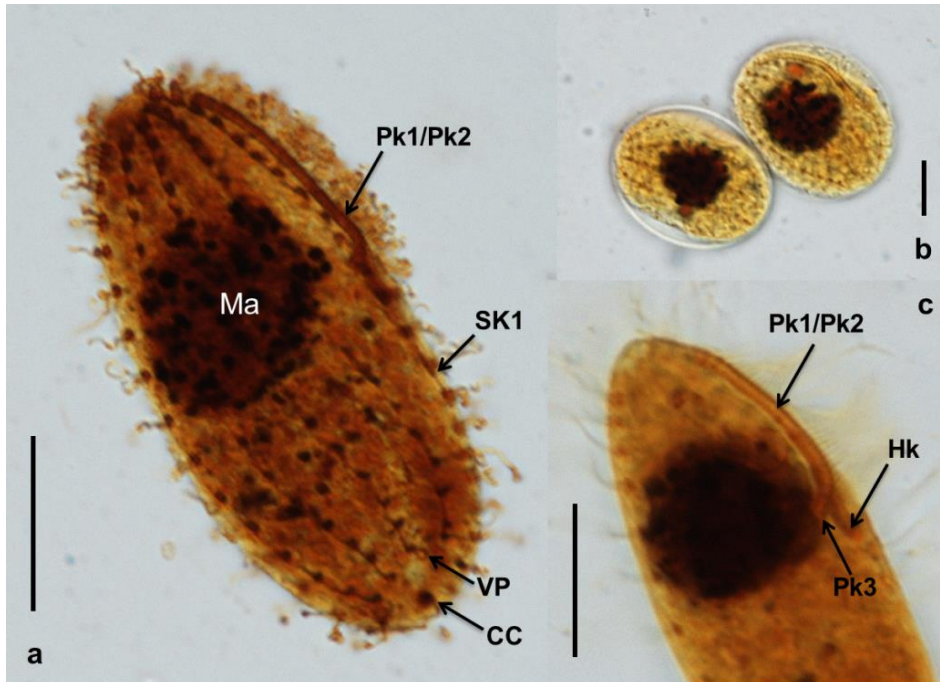


Figure VI.33. Silver carbonate staining of the trophic and cyst stages. Bright field (x100 and x40). (a). Trophic stage right side of the cell and oral area; arrow shows the position of the contractile vacuole pore (VP), the caudal complex (CC), the somatic kinety 1 (Sk1), the polikineties 1 and 2 (Pk1/Pk2) from the oral area and the macronuclei (Ma) (x100). (b). Cyst stages with cells already showing infraciliary patterns on the surface of the cell; macronuclei and micronuclei are visible (x40). (c). Detail of the infraciliature from the oral area with the posterior end of the haplokunety and the oral polikineties 1, 2 and 3. Scale Bars: 10 μ m.

Several works have noted previously the difficulties to identify species in this genus, mainly because of the structure of the oral area, which is difficult to discern and also because there are great variations in the number of kineties and basal bodies and in the number and position of contractile vacuole pores [41]. The comparison of the ciliate found in these SBRs with previously described

species of the genus *Pseudocohnilembus* (Table VI.18) allows finding closer similarities to two different species described in the literature: *Pseudocohnilembus persalinus* and *Pseudocohnilembus pusillus*. Foissner et al. [23] synonymized *P. persalinus* and *P. longiseta* [20] with the previously described species *P. pusillus*. After the work carried out by Song [26, 41] however, Foissner et al. [55] agreed to keep *P. persalinus* as a different species. The lower number of basal bodies in all somatic kineties in *P. persalinus* compared to *P. pusillus* (e.g. ca. 12 vs.19 on average respectively) was cited as one of the differential characteristics [26].

P. persalinus shows a high morphological variability with many morphotypes that seem to represent populations of the same species [26, 41]. However, there are not clear morphological comparisons in the literature of *P. persalinus* and *P. pusillus* to recognize the differences between them, except the already cited number of basal bodies in the somatic kineties, which is higher in *P. pusillus*. Nowadays, *P. persalinus* is cited as a different species even in recent literature [28] while the most recent citation of *P. pusillus* [25] do not include a detailed morphological account of this species.

Given the similarities we have found with the detailed descriptions of species of *P. persalinus*, especially considering the prominent polykinety 3 cited by Song [41] and also observed in our species even though this is a larger one (Table VI.21), this brackish ciliate species from the SBRs is identified as *Pseudocohnilembus persalinus*. However, it has to be pointed out that most literature references of *P. persalinus* do not include the presence of cysts as a characteristic of this species. However, the original description of this species by Evans and Thompson [20] from a brackish environment indicated that cysts were present as in the ciliate found in these SBRs. The presence of cyst is also a characteristic in *Pseudocohnilembus pusillus* [25] although previous authors did not record this characteristic either.

Table VI.21. Morphometric data for *Pseudocohnilembus* species (dimensions in μm).

Species	Length	Width	Cyst	Macronuclear nodules	Environ.	Publication
	Range Mean	Range Mean				
<i>P. persalinus</i> ^a	20.0-38.0 -	10.0-18.0 -	Yes	1	Salt Lake	[20]
<i>P. pusillus</i> I ^b	29.0-42.0 34.5	15.0-26.0 20.8	-	1	Freshwater (dungheap)	[23]
<i>P. pusillus</i> II ^a	25.0-39.0 31.3	12.0-20.0 15.4	-	1	Marine (tide pool)	
<i>P. pusillus</i> ^c	24.6-32.3 27.7	7.7-12.3 10.0	Yes 15.5	1	Salt Lake	[25]
<i>P. persalinus</i> I ^c	25.0-37.0 29.9	15.0-26.0 20.3	-	1	Marine	[41]
<i>P. persalinus</i> II ^c	29.0-43.0 33.7	16.0-23.0 18.9	-	1	Marine	
<i>P. persalinus</i> ^a	22.0-32.0 -	11.0-16.0 -	Yes	-	Fish farm (pathogenic)	[33]
<i>P. persalinus</i> ^d	21.7-32.6 27.5	8.6-14.9 10.4	Yes 15.0	1	SBR	This work

Staining methodologies: a.- Silver nitrate (wet); b.- Silver nitrate (dry); c.-Protargol; d.- In vivo

Further molecular work would be necessary to confirm this identification, comparing this species with cysts in their life cycle with those species already identified as *P. persalinus* without cysts or undescribed cysts in the molecular databases. In Table VI.21 some characteristics of *P. pusillus*, *P. persalinus* described in the literature and the *Pseudocohnilembus* species found in the SBRs are compared. This is the first citation of *Pseudocohnilembus persalinus* in a wastewater environment with hypersaline conditions. This ciliate was originally the only protist population present and survived the extreme conditions found in the reactors reaching extremely high abundances (over 58,000 cells·mL⁻¹). This is an indication of the high adaptability to the extreme environment where it was surviving.

The other protist found in the SBRs was a heterotrophic flagellate with a pyriform shape and four anterior flagella (Figure VI.34).

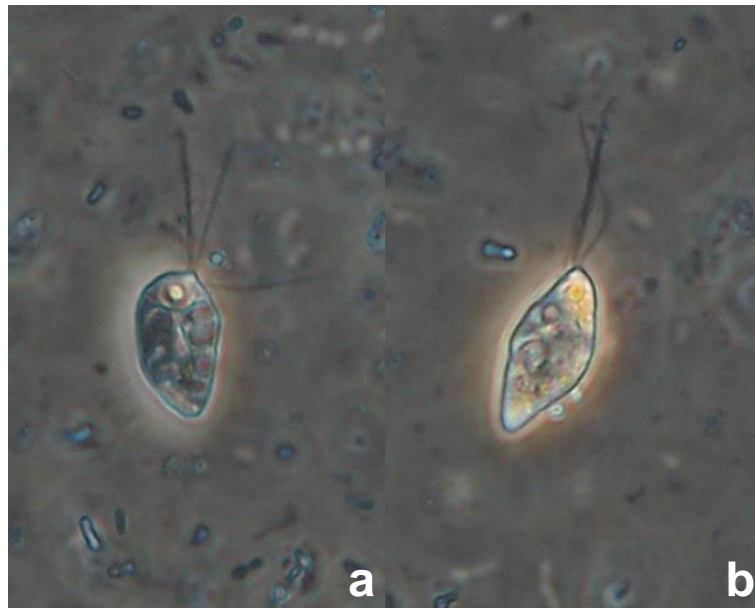


Figure VI.34. Lugol's fixed flagellate. Phase contrast microscopy (x100 and x40). (a-b). Three of the four flagella are clearly visible as well as the karyomastigont with the nucleus, under the flagellar insertion. Scale Bars: 10 μ m.

This flagellate also showed a feeding groove and in some cases it could also be observed an anterior papilla next to the flagellar insertions. This flagellate had as well a cyst stage. The mean size of the trophic stage cell was $17.0 \times 8.8 \mu\text{m}$ (lugol's fixed; $n=57$) and the size of the cyst stage was between $7.5\text{-}8.0 \mu\text{m}$. The flagella were all about the same length, with a mean length of $17 \mu\text{m}$ (lugol's fixed; $n=47$). A single nucleus could be observed under the flagellar bases (karyomastigont). This flagellate resembled a *Retortamonadida* species in the shape of the cell, the anterior single nucleus, the presence of a single ventral feeding groove. However, it was clearly different in the presence of four flagella instead of two. The other genus included in this group has only two flagella, therefore we identified this flagellates as a *Chilomastix* sp.. This genus is included within the *Fornicata* clade [56] and the *Excavata* supergroup. These flagellates are all heterotrophic flagellates with one or two karyomastigonts per cell. In this case, the flagellate observed in the SBRs had a trophic stage with one karyomastigont, four flagella and a cyst stage as in the case of *Chilomastix*. The observations so far would not allow fulfilling species identification any further, but this is a free-living flagellate, unlike what it is found in most species from *Chilomastix* which are in general endobionts. However, free-living *Chilomastix* species have been encountered ranging from freshwater to marine habitats from sites with little or no oxygen and/or rich in hydrogen sulphide [57-59]. The presence of this flagellate in these high salinity SBRs is also, as in the case of the ciliate, a special environmental characteristics to point out. This flagellate was predated on bacteria.

Influence of the studied parameters on the SBR performance and on the protist population

Table VI.22 shows the average value and standard deviations for the parameters chosen for the statistical analysis of the sampling days, for each SBR in Step-1 and Step-2.

Table VI.22. Average values \pm standard deviations of some parameters of influent, mixed liquor, effluent and operational process during Step-1 and Step-2 in the sampling days.

STEP-1 (0-173 days)					
		SBR-1	SBR-2	SBR-3	
	HRT (days)	40	40	30	
Operation	T ^a (°C)	23.8 \pm 4.0	31.1 \pm 1.2	23.8 \pm 4.0	
	F/M(gCOD·gVSS ⁻¹ ·d ⁻¹)	0.12 \pm 0.02	0.15 \pm 0.04	0.12 \pm 0.02	
Influent	COD (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	415 \pm 95	415 \pm 95	445 \pm 87	
	T.Ph (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	28 \pm 9	28 \pm 9	11 \pm 2	
ML	MLVSS (g·L ⁻¹)	3.3 \pm 0.5	2.8 \pm 0.3	3.6 \pm 0.4	
Effluent	pH	8.3 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1	8.9 \pm 0.9	
	Cond (mS·cm ⁻¹)	89.0 \pm 4.7	101.0 \pm 1.9	96.0 \pm 2.6	
	COD (mg·L ⁻¹)	3411 \pm 411	4716 \pm 1267	2434 \pm 274	
STEP-2 (174-293 days)					
		SBR-1	SBR-2	SBR-3A	SBR-3B
	HRT (days)	19	32	30	15
Operation	T ^a (°C)	20.8 \pm 2.3	30.4 \pm 0.6	20.8 \pm 2.3	20.8 \pm 2.3
	F/M(gCOD·gVSS ⁻¹ ·d ⁻¹)	0.12 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01
Influent	COD (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	368 \pm 8	221 \pm 65	203 \pm 23	404 \pm 45
	T.Ph (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	25 \pm 2	15 \pm 3	7 \pm 0	13 \pm 0
ML	MLVSS (g·L ⁻¹)	3.1 \pm 0.3	2.4 \pm 0.1	2.5 \pm 0.3	3.0 \pm 0.5
Effluent	pH	8.2 \pm 0.3	8.6 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1
	Cond (mS·cm ⁻¹)	88.9 \pm 0.5	91.9 \pm 4.7	90.8 \pm 3.5	92.3 \pm 4.2
	COD (mg·L ⁻¹)	1661 \pm 422	2340 \pm 870	1585 \pm 10	1483 \pm 368

The COD and T.Ph values reported in the influent row are the amount of these parameters fed in each reactor per day of reactor volume, which were calculated with the following equation:

$$\text{COD or T.Ph (mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{(\text{COD}_0 \text{ or T.Ph}_0) \cdot V_d}{V_R \cdot 1\text{day}} \quad \text{Eq.(VI.14)}$$

As it can be observed, in SBR-2 the mixed liquor temperature was maintained around 30°C throughout the experiment, while the other SBRs worked at room temperature. In Step-1, the average F/M ratio was around 0.13 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. Nevertheless, in SBR-2 this parameter was higher because the average MLVSS was lower than those achieved in the other two reactors. In Step-2, the same value of F/M ratio was maintained in SBR-1 and SBR-3B, while in SBR-2 and SBR-3A decreased to 0.08 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. To achieve these F/M ratios, the HRT was varied in each reactor.

SBR performance

In this section, the reactors performances are analyzed through the COD removal percentage, whose evolution in the SBRs can be observed in Figure VI.35. In this figure, the vertical lines indicate the FTOP change and the gray area is the experimental time for Step-1.

In all the reactors the COD removal percentage decreased when a new FTOP was fed, however this behavior was not due to a decrease in the reactors performance. The COD of the FTOP used in this work was decreasing from FTOP-1 to FTOP-4; therefore the effluent COD also diminished according to it. Nevertheless, the system required several days to achieve the stationary conditions for the new wastewater fed.

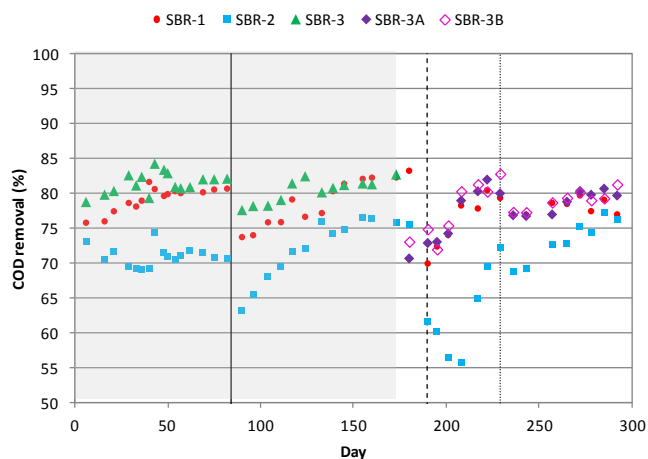


Figure VI.35. Evolution of COD removal percentage in the SBRs. Vertical lines: [—] FTOP-2, [- - -] FTOP-3 and [·····] FTOP-4. Grey area = experimental time for Step-1.

In Step-1, the average COD removal percentages in SBR-1, SBR-2 and SBR-3 were $78.9 \pm 2.5\%$, 71.4 ± 3.1 and $81.9 \pm 1.7\%$, respectively. Some authors have reported that the optimum bacterial activity is between 30-35°C [50, 51]. However, SBR-2 had the lowest performance surprisingly. This reactor had the highest conductivity indicating an accumulation of inorganic salt, which decreased the MLVSS/MLSS ratio to 0.45 ± 0.06 , while in SBR-1 and SBR-3 this parameter was 0.51 ± 0.05 and 0.54 ± 0.06 , respectively. This increase of the inorganic fraction in the activated sludge could explain the lower performance in SBR-2. On the other hand, although the COD removal percentage in SBR-1 and SBR-3 was similar during Step-1, SBR-3 performance can be considered higher since its HRT was the lowest and consequently the FTOP volume treated per day was higher than in the case of SBR-1.

In Step-2, the average COD removal percentages were 77.5 ± 3.2 , 68.9 ± 7.1 , 77.6 ± 3.3 and 78.3 ± 3.1 in SBR-1, SBR-2, SBR-3A and SBR-3B, respectively. SBR-2 showed the lowest COD removal efficiency as in Step-1. The other three

reactors had similar average values for the organic matter removal, which were similar to those achieved in Step-1. This behavior confirms that the biodegradable organic matter in the FTOPs was around 80%.

It can be concluded that the optimal conditions for the FTOP biological treatment were the following: room temperature and F/M ratio around 0.13 gCOD·gVSS⁻¹·d⁻¹ (adapting the HRT). The adsorption pre-treatment enhanced slightly the reactors performance.

To further assess the relationship of the COD removal efficiency to the other physical-chemical and operational conditions, data were analyzed with Stepwise Multiple Linear Regression (S-MLR). The predictive model included only two of the variables studied: influent COD (COD_{inf}; p=0.021) and T (p<0.001). This model was the following:

$$\text{COD removal (\%)} = 83.9185 + 0.0149 \cdot \text{COD}_{\text{inf}} - 0.5375 \cdot T \quad \text{Eq.(VI.15)}$$

where COD_{inf} was measured in mg·L⁻¹·d⁻¹ and T in °C. This model ANOVA was very significant; F=10.44 and p<0.001.

Protist populations

The relationship between the protist populations and several operational and physical-chemical parameters is evaluated in this section by statistical analysis. As it has already pointed out, insufficient Y_{obs} values in sampling days did not allowed carrying out the statistical analysis of this parameter. However, this relationship can be observed in Figure VI.36 a), b) and c), in which the Y_{obs} evolution in each SBR and the ciliates numbers are shown. As it is shown in the graph, the ciliate population variations were related to the Y_{obs}. When this parameter decreased or increased, the same behavior was observed in the ciliates populations. If it is considered that the Y_{obs} is related to the microorganisms growth, and that the MLVSS in the SBRs were maintained

around $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (with periodical sludge withdrawal), variations in the Y_{obs} would have the same effect in the ciliates abundance.

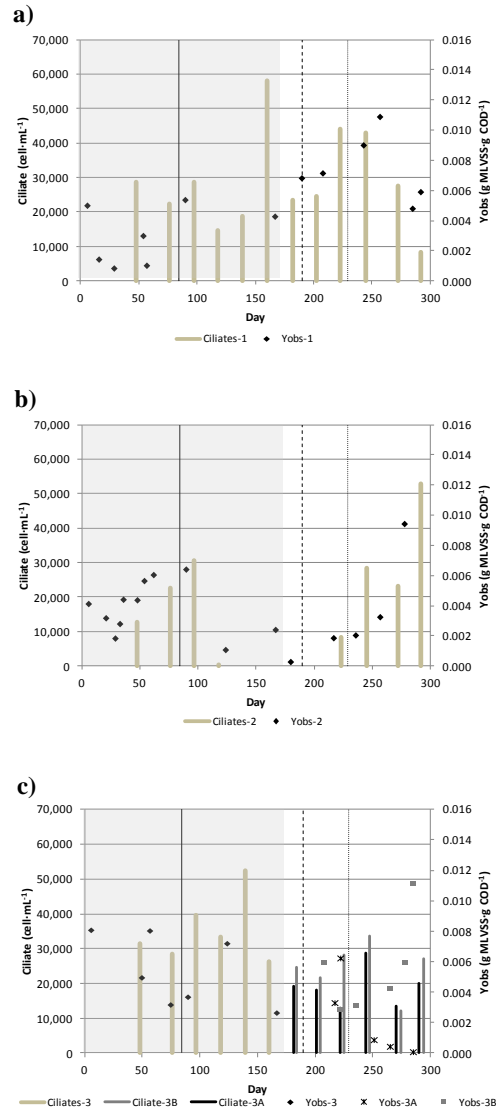


Figure VI.36. Relationship between ciliates amount and Y_{obs} in a) SBR-1, b) SBR-2, c) SBR-3, SBR-3A and SBR-3B. Vertical lines: [—] FTOP-2, [- - -] FTOP-3 and [·····] FTOP-4. Gray area = experimental time for Step-1.

One-way ANOVA was carried out for ciliates as dependent variable. Results showed that mean ciliates abundance was reduced in the presence of flagellates ($F= 10.43$; $p=0.0025$). This effect was very significant during Step-1 ($F=7.38$; $p=0.015$) but no significance was observed in Step-2 ($F=3.41$; $p>0.05$). This effect of flagellates on ciliates abundance reflects the possible competitive effects on the same trophic bacterial niche between both protists or might imply other interactions not included in this analysis. On the other hand, flagellates were less affected by higher temperatures and conductivities, but their presence or activity did not produce higher COD removal efficiencies.

In Figure VI.37 the average abundance of ciliates in Step-1 and Step-2 is represented. As it can be seen, in Step-1 the higher abundance was found in SBR-3 and the lowest in SBR-2. The changes in the physical chemical and operational conditions involved during Step-2 meant a reduction on the ciliate populations from SBR-3 to SBR-3A and SBR-3B. In the case of SBR-1 and SBR-2, changes in the conditions meant a slight increase on the ciliate abundance in SBR-2, but no modification in SBR-1.

In the case of ciliates, the Multivariate Logistic Regression (MLR) produced a predictive model, in which only two independent variables were significant (COD removal $p=0.018$ and Flagellate $p=0.003$) in the explanation of these populations variability:

$$\text{Ciliates} = -39671.3 + 868.7 \cdot \text{COD}_{\text{removal}} - 13714.3 \cdot \text{Flagellate} \quad \text{Eq.(VI.16)}$$

where COD removal was expressed in percentage and flagellate was a dichotomous variable (coded as 0 and 1 for absence/presence). This model ANOVA was as well very significant ($F= 8.91$ and $p = 0.0006$).

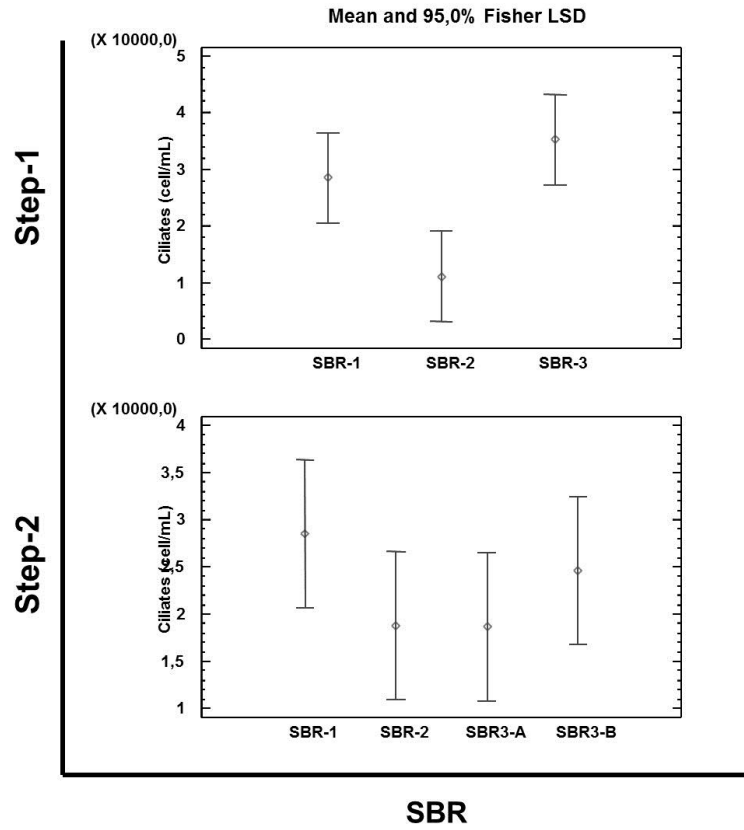


Figure VI.37. Mean ciliate abundances (cells·mL⁻¹) observed in the SBRs during Step-1 and Step-2.

A stepwise Logistic regression protocol was used to explain the appearance of the flagellates population and its significant relationships to other variables. The Eq.6 explaining the presence/absence of flagellates retained only two explanatory variables that contributed significantly to the model (Ciliates p=0.001 and pH p=0.04):

$$\text{Flagellate} = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} T \quad \text{Eq.(VI.17)}$$

where $\eta = -36.264 - 0.00013 \cdot \text{ciliates} + 4.344 \cdot \text{pH}$

The deviation analysis p value for this model was lower than 0.05, therefore this means that there was a statistical significant relationship between variables with at 95% confidence level. The test results for the goodness of fit indicated this was satisfactory ($\chi^2 = 0.711$, 3 degrees of freedom, $p = 0.871$).

The cluster analysis pinpointed which operational conditions, physical-chemical and biological characteristics were involved in the performance, independently of the reactor considered. Four clusters with similar number of samples (10 or 12 samples) were obtained. Significant variables were selected according to their values, lower or higher than the mean value. Table VI.23 shows what variables characterized each of the four clusters obtained. In Figure VI.38 the mean COD removal (%), mean ciliate numbers and flagellate frequencies are presented. These results showed that in Cluster-4 the highest mean COD removal percentages occurred when the COD fed to the reactors per day, pH and MLVSS were high and the T.Ph fed to the reactors per day, HRT and temperature values were low. Under these conditions the mean ciliate numbers were the highest observed in the four clusters and the frequency of flagellates presence was the lowest. Cluster 1, characterized by the lowest COD removal and ciliate populations, happened coincidentally with the highest values of the COD in the effluent, temperature, conductivity, T.Ph fed to the reactors per day and HRT, and with the highest frequencies on the flagellate presence.

Table VI.23. Cluster characteristic variables.

CLUSTER		CHARACTERISTICS	p-value
		10 samples (80% SBR-2+20%SBR-1)	
Cluster-1	High	COD _{efl}	< 0.001
		T ^a	< 0.001
		Conductivity	< 0.001
		T.Ph _{inf}	< 0.001
		HRT	< 0.001
		Presence of flagellate (frequency)	0.014
	Low	COD removal	0.002
Ciliate number		0.001	
		10 samples (40%SBR-2 + 60% SBR-3A)	
Cluster-2	Low	T.Ph _{inf}	< 0.001
		COD _{inf}	< 0.001
		COD _{efl}	0.009
		F/M	0.001
		MLVSS	< 0.001
		10 samples (100%SBR-1)	
Cluster-3	High	T.Ph _{inf}	0.010
		T ^a	0.006
	Low	pH	< 0.001
		Conductivity	0.006
		Presence of flagellate (frequency)	0.023
		10 samples (100%SBR-3+SBR3B)	
Cluster-4	High	COD _{inf}	0.004
		COD removal	0.012
		MLVSS	0.015
		pH	0.001
	Low	T.Ph _{inf}	0.004
		T ^a	0.021
		HRT	< 0.001

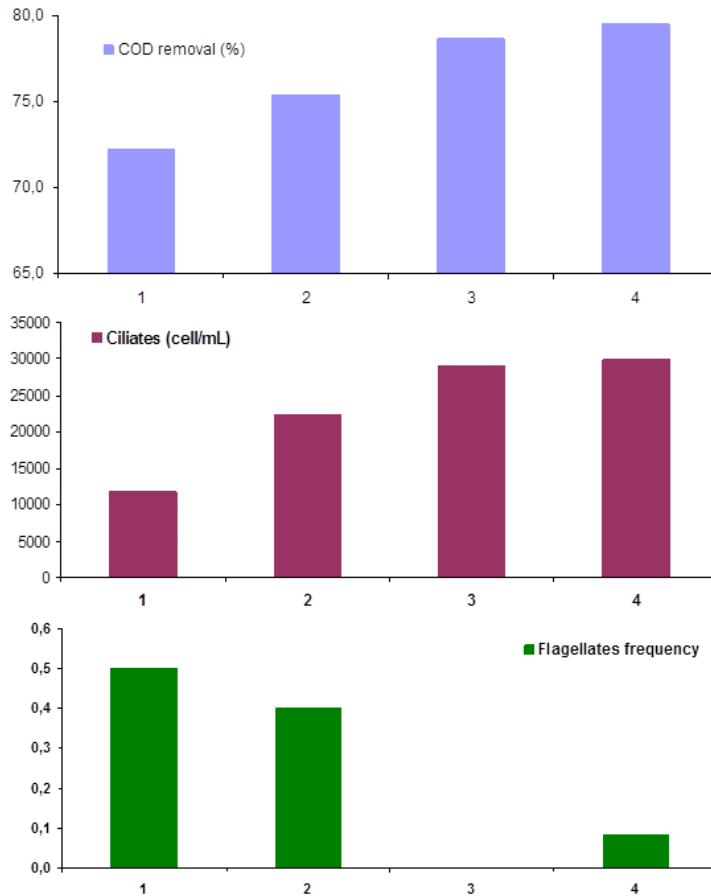


Figure VI.38. Mean COD removal, ciliates abundance and flagellates frequency within the four clusters obtained.

VI.2.3.4. Conclusions

In this work, the biological treatment of FTOP was studied by the operation of 5 SBRs under different operating conditions. This study was focused on the characterization of the protist population and their evolution during the experiment. In spite of the high FTOP salinity (between 74 and 94 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), a

ciliate population was found in the biomass in all the reactors. The identifying tests point out that the ciliate specie could be *Pseudocohnilembus persalinus*, whose presence in wastewater has not been reported until now. The ciliate population was reduced in the presence of a flagellate species of the genus *Chilomastix*. From one-way ANOVA analysis, it can be concluded that this phenomenon have a statistical significance ($F= 10.43$; $p=0.0025$). The cluster analysis showed that the operational conditions carried out in the SBR-3 and SBR-3B resulted in the highest COD removal performance. These conditions entailed: a) the HRT necessary (according to COD_{inf}) to achieve a F/M ratio around 0.13 ($kg\ COD \cdot kg\ VSS^{-1} \cdot d^{-1}$), b) T.Ph concentration below $400\ mg \cdot L^{-1}$, performing adsorption pre-treatment if required, c) $3290 \pm 560\ mg \cdot L^{-1}$ of MLVSS, d) mean pH of 8.8 ± 0.2 and e) temperature between $18^{\circ}C$ and $24^{\circ}C$, in the mixed liquor.

VI.2.3.5. References

- [1] O. Lefebvre, R. Moletta, Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review, *Water Res.* 40 (2006), 3671–3682.
- [2] G.C. Kopsidas, Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992), 629–631.
- [3] A. Garrido, P. García, M. Brenes, The recycling of table olive brine using ultrafiltration and activated carbon adsorption, *J. Food Eng.* 17 (1992), 291–305.
- [4] C. Romero-Barranco, M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido Fernández, Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [5] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, T.S. Giannopoulos, G.A. Pilidis, Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007), 339–343.

- [6] D. Ryan, K. Robards, S. Lavee, Changes in phenolic content of olive during maturation, *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (1999), 265–274.
- [7] R. Malheiro, A. Sousa, S. Casal, A. Bento, J.A. Pereira, Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011), 450–457.
- [8] H. Kiai, A. Hafidi, Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014), 663–670.
- [9] M. Brenes, L. Rejano, P. Garcia, A. Sanchez, A. Garrido, Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [10] F. Kargi, A.R. Dincer, Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation Fikret, *Enzyme Microb. Technol.* 19 (1996), 529–537.
- [11] J.L. Wang, X.M. Zhan, Y.C. Feng, Y. Qian, Effect of salinity variations on the performance of activated sludge system, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005), 5–8.
- [12] E. Reid, X. Liu, S.J. Judd, Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006), 164–171.
- [13] E.J. McAdam, S.J. Judd, Biological treatment of ion-exchange brine regenerant for re-use: A review, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008), 264–272.
- [14] A. Uygur, F. Kargi, Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor, *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004), 313–318.
- [15] B.M. Peyton, T. Wilson, D.R. Yonge, Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions, *Water Res.* 36 (2002), 4811–4820.
- [16] A. Haddadi, M. Shavandi, Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas* sp. strain PH2-2 isolated from saline soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 29–34.

- [17] E. Ferrer-Polonio, J.A. Mendoza-Roca, A. Iborra-Clar, J.. Alonso-Molina, L. Pastor-Alcañiz, Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry, *Chem. Eng. J.* 273 (2015), 595–602.
- [18] H. Salvadó, M. Mas, S. Menéndez, M.P. Gracia, Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge, *Acta Protozool.* 40 (2001), 177–185.
- [19] J.P. Bassin, R. Kleerebezem, G. Muyzer, A.S. Rosado, M. Van Loosdrecht, M.C. Dezotti, Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012), 1281–1294.
- [20] F.R. Evans, J.C. Thompson, *Pseudocohnilembidae* n. fam., a hymenostomeciliate family containing one genus, *Pseudocohnilembus* n. g., with three new species, *J. Protozool.* 11 (1964), 344–352.
- [21] J.C.J. Thompson, *Pseudocohnilembus marinus* n. sp., a hymenostome ciliate from the Virginia coast, *J. Protozool.* 13 (1996), 463–465.
- [22] A. Borror, Tidal marsh ciliates (Protozoa): morphology, ecology, systematics, *Acta Protozool.* 10 (1972), 29–72.
- [23] W. Foissner, N. Wilbert, A comparative study of the infraciliature and silverline system of the fresh-water Scuticociliates *Pseudocohnilembus putrinus* (Kahl, 1928) nov. comb., *P. pusillus* (Quennerstedt, 1869) nov. comb. and the marine form *P. marinus* Thompson, *J. Eukaryot. Microbiol.* 28 (1981), 291–297.
- [24] G. Fernandez-Leborans, M. Castro de Zaldumbide, Morphology of 3 Species of Free-living Marine Ciliata: *Pseudocohnilembus cantabricus* n. sp., *Paralembus asturianus* n. sp., *Uronema castellonensis* n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), *Arch. Für Protistenkd.* 128 (1984), 159–168.
- [25] L.C. Olendzenski, Growth, fine structure and cyst formation of a microbial mat ciliate: *Pseudocohnilembus pusillus* (Ciliophora, Scuticociliatida), *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (1999), 132–141.

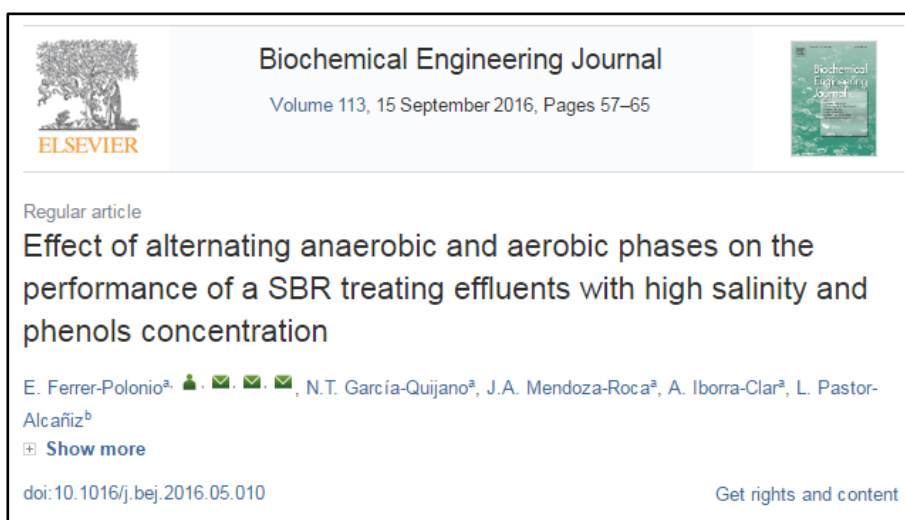
- [26] W. Song, N. Wilbert, Reinvestigations of three well-known marine scuticociliates: *Uronemella filificum* (Kahl, 1931) nov. gen., nov. comb., *Pseudocohnilembus hargisi* Evans and Thompson 1964 and *Cyclidium citrullus* Cohn 1865, with description of the new genus *Uronemella* (Protoz., Zool. Anz. 241 (2002), 317–331.
- [27] J. Gong, H. Ma, W. Song, On the marine ciliate, *Pseudocohnilembus hargisi* (Protozoa ,Ciliophora , Scuticociliatida) with comparison of its related species, Chinese J. Oceanol. Limnol. 20 (2002), 261–265.
- [28] Z. Zhan, T. Stoeck, M. Dunthorn, K. Xu, Identification of the pathogenic ciliate *Pseudocohnilembus persalinus* (Oligohymenophorea: Scuticociliatida) by fluorescence in situ hybridization, Eur. J. Protistol. 50 (2014), 16–24.
- [29] S.M. Kim, J.B. Cho, E.H. Lee, S.R. Kwon, S.K. Kim, Y.K. Nam, et al., Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida), Dis. Aquat. Organ. 62 (2004), 233–238.
- [30] S.M. Kim, J.B. Cho, E.H. Lee, S.R. Kwon, S.K. Kim, Y.K. Nam, et al., *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora:Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, Dis. Aquat. Organ. 62 (2004), 239–244.
- [31] J.Y. Song, S.I. Kitamura, M.J. Oh, H.S. Kang, J.H. Lee, S.J. Tanaka, et al., Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida), Dis. Aquat. Organ. 83 (2009), 133–143.
- [32] S.R. Jones, G. Prospero-Porta, S.E. LaPatra, First isolation of *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) from freshwater-reared rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, J. Parasitol. 96 (2010), 1014–1016.
- [33] I. Whang, H.-S. Kang, J. Lee, Morphological and molecular characterization of *Pseudocohnilembus longisetus* Thompson, 1965 from farmed black rockfish *Sebastes schlegelii* in Korea, Vet. Parasitol. 179 (2011), 227–233.

- [34] P. Madoni, Community structure and distribution of ciliated protozoa in a freshwater pond covered by *Lemna minor*, *Bolletino Di Zool.* 58 (1991), 273–279.
- [35] R. Amann, H. Lemmer, M. Wagner, Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques, *FEMS Microbiol. Ecol.* 25 (1998), 205–215.
- [36] M. Martín-Cereceda, B. Pérez-Uz, S. Serrano, A. Guinea, Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors, *Microbiol. Res.* 156 (2001), 225–238.
- [37] P. Madoni, A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis, *Water Res.* 28 (1994), 67–75.
- [38] P. Madoni, Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview, *Ital. J. Zool.* 78 (2011), 3–11.
- [39] H. Ma, W. Song, X. Hu, A. Warren, Morphology and stomatogenesis of *Pseudocohnilembus hargisi* (Ciliophora: Scuticociliatida), *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 83 (2003), 399–405.
- [40] X. Pan, Z. Yi, J. Li, H. Ma, S.A. Al-Farraj, K.A.S. Al-Rasheid, Biodiversity of marine scuticociliates (Protozoa, Ciliophora) from China: Description of seven morphotypes including a new species, *Philaster sinensis* spec. nov., *Eur. J. Protistol.* 51 (2015), 142–157.
- [41] W. Song, Morphological and Taxonomical Studies on Some Marine Scuticociliates from China Sea, with Description of Two New Species, *Philasterides armatalis* sp. n. and *Cyclidium varibonneti* sp. n. (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida), *Acta Protozool.* 39 (2000), 295–322.
- [42] I. Fendri, M. Chamkha, M. Bouaziz, M. Labat, S. Sayadi, S. Abdelkafi, Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013), 1–13.
- [43] M.H. El-Naas, S. Al-Zuhair, S. Makhoulf, Continuous biodegradation of phenol in a spouted bed bioreactor (SBBR), *Chem. Eng. J.* 160 (2010), 565–570.

- [44] S. Sivasubramanian, S.K.R. Namasivayam, Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015), 243–252.
- [45] W. Wesley Eckenfelder, Petr Grau, *Activated sludge process desing and control: theory and practice*, Ed. Technomic Publishing AG, Lancaster, Pennsylvania, (1992), 56–159.
- [46] E. Klimiuk, D. Kulikowska, Organics removal from landfill leachate and activated sludge production in SBR reactors, *Waste Manag.* 26 (2006), 1140–1147.
- [47] E. Amanatidou, G. Samiotis, D. Bellos, G. Pekridis, E. Trikoilidou, Net biomass production under complete solids retention in high organic load activated sludge process, *Bioresour. Technol.* 182 (2015), 193–199.
- [48] APHA, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21st. ed. American Public Health Association, Washington, DC, (2005).
- [49] D. Fernandez-Galiano, Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good tesults with the pyridinated silver carbonate method, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 95 (1976), 557–560.
- [50] O. Lefebvre, N. Vasudevan, K. Thanasekaran, R. Moletta, J.J. Godon, Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries, *Extremophiles*, 10 (2006), 505–513.
- [51] H.Y. Ng, S.L. Ong, W.J. Ng, Effects of sodium chloride on the performance of a sequencing batch reactor, *J. Environ. Eng.* 131 (2005), 1557–1564.
- [52] C.R. Curds, A. Cockburn, J.M. Vandyke, An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process, *Water Pollut. Control.* 67 (1968), 312–329.
- [53] C.R. Curds, G.J. Fey, The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia coli* in the activated-sludge process, *Water Res.* 3 (1969), 853–867.

- [54] T. Fenchel, Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 136 (1990), 159–177.
- [55] W. Foissner, S. Agatha, H.B. Denisia, Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib Desert, *Acta Protozool.* 42 (2003), 81–82.
- [56] A.G.B. Simpson, Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003), 1759–1777.
- [57] T. Fenchel, C. Bernard, G. Esteban, B.J. Finlay, P.J. Hansen, N. Iversen, Microbial diversity and activity in a Danish fjord with anoxic deep water, *Ophelia.* 43 (1995), 45–100.
- [58] C. Bernard, A.G.B. Simpson, D.J. Patterson, An ultrastructural study of a free-living retortamonad, *Chilomastix cuspidata* (Larsen & Patterson, 1990) n. comb. (Retortamonadida, Protista), *Eur. J. Protistol.* 33 (1997), 254–265.
- [59] C. Bernard, A.G.B. Simpson, D.J. Patterson, Some free-living flagellates (protista) from anoxic habitats, *Ophelia.* 52 (2000), 113–142.
- [60] P.N. Polymenakou, E.G. Stephanou, Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*, *Biodegradation*, 16 (2005), 403–413.
- [61] Shweta, Dhandayuthapani, Optimization of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* isolated from industrial effluent, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4 (2013), 405–413.

VI.2.4. Reducción del consumo energético



Abstract

The biological treatment of hypersaline wastewaters with high COD and phenols concentration requires long hydraulic retention times and much energy for aeration. In this work aeration time reduction in the reaction phase was studied in two sequential batch reactors (SBR) treating fermentation brine from table olive processing wastewater. To study the influence of an anaerobic phase on the SBR performance (for COD and phenolic compound removal efficiencies), different anaerobic/aerobic reaction times were evaluated. SBR-1 was operated with an anaerobic/aerobic hours ratio of 0/22, 8/14 and 14/8 and SBR-2 with a ratio of 22/0, 14/8 and 8/14. Results showed that the maximum organic matter reduction was obtained under aerobic reaction conditions (ratio 0/22) with 82.3% and 77.9% of COD and total phenols removal, respectively. However, optimal conditions were considered to prevail for an anaerobic/aerobic ratio of 8/14, since the reactors performances were similar

with lower energy consumption. Thus, 82.3% and 79.5% of COD and 77.9% and 78.3% of total phenols were removed in SBR-1 and SBR-2, respectively.

Keywords: Biological wastewater treatment; SBR; Phenolic compounds; Hypersaline wastewater; Anaerobic/aerobic phases.

Nomenclature	
HRT	Hydraulic retention time (days)
T.Ph	Total phenols (mg L^{-1})
Cl^-	Chloride (mg L^{-1})
N_T	Total nitrogen (mg L^{-1})
P_T	Total phosphorus (mg L^{-1})
SS	FTOP suspended solids (mg L^{-1})
VSS	FTOP volatile suspended solids (mg L^{-1})
SS_{ef}	Effluent suspended solids (mg L^{-1})
Q_{ef}	Daily effluent volume draw from the SBR (L d^{-1})
Δt_{ij}	Time between two measures (day)
MLSS	Mixed liquor suspended solids (mg L^{-1})
MLVSS	Mixed liquor volatile suspended solids (mg L^{-1})
DO	Dissolved oxygen (mg L^{-1})
time_{DO}	Time (min) in a cycle in that DO concentrations were higher than 0.1 mg L^{-1}
time_{air}	Time (min) in a cycle in that compressor supplied air into the reactor
F/M	Food-to-microorganism ratio ($\text{kg COD kg MLVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
ΔX	Sludge production ($\text{mg MLSS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
OUR	Oxygen uptake rate in mixed liquor ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
SOUR	Specific OUR ($\text{mg O}_2 \text{ mg MLVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
Y_H	Heterotrophic biomass yield coefficient (g cell COD g soluble COD)
C_{O_2}	DO concentration in the mixed liquor ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)
COD_{Ac}	Chemical oxygen demand for the sodium acetate ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)
CO_{Ac}	Consumed oxygen in sodium acetate biodegradation ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)

VI.2.3.1. Introduction

Hypersaline effluents are generated in very large amounts by some types of industrial activities, such as tanneries, petroleum and food processing industries [1]. In addition to high conductivity, these wastewaters often include high concentrations of organic matter and toxic compounds. Therefore an effective treatment, before their discharge into the environment, is necessary. Hypersaline effluents were commonly transferred to evaporation ponds in order to concentrate salt and organic matter. However, there is a decrease in the use of this technique due to the more restrictive environmental regulations. Physico-chemical techniques focusing on organic compounds removal like electro-coagulation [2], ozonation [3] and Fenton's reagent [4] have been proposed by some authors for their management. However, these are very expensive and are not usually appropriate for large volumes of wastewater [5]. Biological wastewater treatment is an efficient alternative. This technique offers low associated costs and it is more environmentally friendly than physico-chemical treatments. However, salinity makes biological treatment difficult [6–8]. In municipal wastewater treatment plants with non salt adapted sewage sludge, salt concentrations above 1–2% can lead to loss of activity of cells and to a decrease of settlement capacity and bioflocculation [9]. Thus, salt adapted sludge is required to treat hypersaline effluents. The fermentation brine from table olive processing (FTOP) is one of these hypersaline industrial effluents. The biological treatment of FTOP is very difficult because high concentrations of phenolic compounds are combined with the high salinity. The bactericidal effect of phenolic compounds can produce biomass inhibition, what has been reported by several authors [10, 11]. Although a direct biological treatment of FTOP has not yet been reported in the literature until now, a recent study carried out by our research group showed the successful start-up of a biological reactor for FTOP treatment [12]. FTOP is an acidic industrial effluent (pH around 4) with high conductivity (above $60 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). The COD and total phenolic compounds concentration depend on olive processing method, cultivar and olive maturation [13]. According to our data from thirty-six FTOP samples, the COD ranges between 6 and 20 g L^{-1} and the total phenols

concentration varies between 0.5 and 1.7 g L⁻¹. The main phenolic compounds in FTOP are hydroxytyrosol (HTY) and tyrosol (TY), with HTY concentrations being predominant in FTOP wastewater [14]. Brenes et al. [15] and Fendri et al. [16] reported that, during debittering step of olive processing, HTY and TY are the hydrolysis products of oleuropein and ligstroside, respectively. For start-up of an SBR process and further operation it was checked that high hydraulic retention time of 40 days and a long duration of aerobic phases (1/21 h of anaerobic/aerobic for reaction) were required [12]. Thus, the next and crucial step to achieve a successful full-scale application is minimizing the energy consumption, i.e. aeration time. Aeration process may cause around 40–60% of the energy consumption in wastewater treatment plants [17, 18] frequently providing more oxygen than required [19, 20]. On the other hand, the integrated anaerobic–aerobic SBR system is a suitable technology for treatment of high concentrations of organic matter in industrial wastewater treatment, e.g. for colour and organic compounds removal from textile wastewater [21, 22] and for polycyclic aromatic hydrocarbons removal [23, 24]. Thus, a combination of aerobic and anaerobic degradation in a single reactor has been reported by several researchers. The aim of alternating aerobic and anaerobic phases is to enhance the biodegradation of organic matter that is refractory when only aerobic conditions are applied. This kind of integrated bioreactor can be operated with, or without, physical separation of anaerobic and aerobic zones: e.g. Yang et al. [25] used a bioreactor with physical separation to treat landfill leachate. Tartakovsky et al. [26] studied trichloroethylene biodegradation in a single stage coupled anaerobic–aerobic granular biofilm reactor. The above mentioned lack of literature about the direct biological treatment of FTOP and the shortage of studies on the biological treatment of wastewaters with salinities above 60 mS·cm⁻¹ makes it worth evaluating the effect of alternating anaerobic and aerobic phases in the SBR operation on its performance and on the respirometric parameters of such acclimated biomass to salinity. Thus, the aim of this work was to study the effects of reducing aeration time during SBR treatment of FTOP wastewater in view of reducing the energy consumption and enhancing the organic matter degradation. For this purpose, two identically

SBRs were operated performing three experiments. In SBR-1 aeration time was progressively decreased: in the first experiment aeration was 22 h per cycle, in the second one 14 h per cycle and in the third experiment it was 8 h per cycle. Unlike SBR-1, in SBR-2 aeration time was progressively increased with aeration times per cycle of 0, 8 and 14 h in the experiments.

VI.2.3.2. Material and Methods

Wastewater characterisation

Brine was provided by a table olive packaging industry located in Comunidad Valenciana (Spain). Four FTOP samples were used in the experimental time, named FTOP-1, FTOP-2, FTOP-3 and FTOP-4. To eliminate the flesh and stone olive remains, FTOP samples were filtered in a 60 μm sieve. Samples were stored at 4°C until use. Table VI.24 presents the main characteristics of the FTOP samples used in the experiments.

Table VI.24. FTOP samples characterisation.

	FTOP-1	FTOP-2	FTOP-3	FTOP-4
Operational days	1 – 6	7 – 62	63 – 90	91 – 105
pH	4.3 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1
Cond (mS·cm⁻¹)	66.1 \pm 0.3	67.4 \pm 0.3	72.7 \pm 0.5	72.5 \pm 0.7
COD (g·L⁻¹)	6.76 \pm 0.09	12.19 \pm 0.11	12.01 \pm 0.03	15.27 \pm 0.21
Cl⁻ (g·L⁻¹)	28.03 \pm 0.23	27.60 \pm 0.31	32.99 \pm 0.15	32.81 \pm 0.12
N_T (mg·L⁻¹)	104 \pm 3	190 \pm 6	201 \pm 12	254 \pm 7
P_T (mg·L⁻¹)	18 \pm 1	39 \pm 1	53 \pm 3	54 \pm 6
T.Ph (mg TY·L⁻¹)	594 \pm 25	1345 \pm 45	1330 \pm 26	1670 \pm 31
SS (mg·L⁻¹)	1840 \pm 62	3086 \pm 85	3564 \pm 46	2256 \pm 31
VSS (mg·L⁻¹)	1230 \pm 23	2378 \pm 52	2512 \pm 43	1310 \pm 41

It can be observed that the FTOP is an acidic wastewater. Thus, the pH average value for the four samples was 4.3 ± 0.1 . The conductivity was very high ($69.7 \pm 3.4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) due to the high salt concentrations (around 8% NaCl) in fermentation brines [27]. However, considerable differences between samples 1 and 4 were observed for the other parameters. For example the mean values of the COD and total phenols were $11.56 \pm 3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1235 \pm 455 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. These parameters depend on olive cultivar [13, 28] and maturation degree [29], as well as debittering and fermentation times [15]. The phenolic profile performed in the four FTOP samples showed that hydroxytyrosol (HTY) was the main phenolic compound and tyrosol (TY) was the second one. This has been detailed in section 3.2. These results agree with those reported in other research works [15, 16]. Due to the measured N_T and P_T concentrations, nutrients were added with the aim of maintaining the ratio of COD:N:P, in the feed FTOP, at 250:5:1 throughout the biological treatment. Urea (NH_2CONH_2) and dipotassium phosphate (K_2HPO_4) were employed as a nitrogen and phosphorous source, respectively.

Reactors and experimental methodology

Table VI.25 shows the operating conditions and the cycle phases in both reactors over the experimental time.

Experiments were carried out in two identical cylindrical sequencing batch reactors (SBR-1 and SBR-2), which operated with previously adapted biomass to FTOP [12]. The reactors had a diameter of 10 cm and a height of 30 cm. Mechanical components and a scheme of the SBRs plant can be found in a previous work [12]. The experiments were divided into three operational steps with different anaerobic/aerobic phase duration for each reactor. Anaerobic phases were performed under stirring conditions without aeration. Aerobic phases were maintained with stirring and aeration was controlled by an automated program. The duration of the aerobic phases was defined by the

time_{air}. Air flow was provided by a compressor (9 L·min⁻¹) connected to a porous diffuser located on the bottom of the reactors.

The performed operational steps were the following:

- Step-1 (38 days); the time_{air} were 22 h in SBR-1 and 0 h in SBR-2
- Step-2 (36 days); the time_{air} were 14 h in SBR-1 and 8 h in SBR-2
- Step-3 (29 days); the time_{air} were 8 h in SBR-1 and 14 h in SBR-2

In the reaction, anaerobic phase always preceded aerobic phase.

Table VI.25. SBRs operation characteristics.

Operating characteristics	
Reaction volume	6 L
Feed/draw volume	360 mL·d ⁻¹
Hydraulic retention time	16.6 days
Daily number of cycles	1
Operation days	105
Cycle characteristics	
Phase	Time
Filling	2 min
Reaction	22 h
Sedimentation	1.5 h
Draw	2 min
Idle	26 min

Analytical methods

Parameters measured in the FTOP wastewater were: pH, conductivity, soluble COD (filtered to 0.45 μm), total phenols (T.Ph), phenolic profile, chloride (Cl^-), total nitrogen (N_T), total phosphorus (P_T), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS). The effluents from SBRs were analyzed measuring pH, conductivity, soluble COD and total phenols twice a week. Effluent suspended solids (SS_{ef}), N_T and P_T concentrations were controlled once a week. The phenolic profile was obtained at the beginning and at the end of the three experimental steps carried out. The mixed liquor (ML) was controlled twice a week and the measured parameters were the following: temperature, suspended solids (MLSS) and volatile suspended solids (MLVSS). The dissolved oxygen (DO) was measured continuously and it was maintained below $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; therefore aeration was automatically stopped when the DO exceeded this concentration. These values were recorded in a data acquisition system. The time_{DO} was the time in which the oximeter registered an oxygen concentration above $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the mixed liquor (aerobic conditions). Another related parameter was the time_{air} , defined as the time for which the system supplied air into the reactor. Respirometric measurements of the ML were also carried out. Thus, the oxygen uptake rate (OUR), specific oxygen uptake rate (SOUR) and the coefficient of performance of heterotrophic growth on chemical oxygen demand (Y_H) were measured at the end of the three experiments.

The pH was determined with a pH-Meter GLP 21+ and the conductivity was measured with an EC-Meter GLP 31+, both from Crison. The DO was measured by an oximeter from Crison. The SS_{ef} , SS, VSS, MLSS and MLVSS were obtained according to APHA, 2005 [30]. Reactive kits and a Spectrophotometer DR600, both from Hach Lange, were used to determine Cl^- , N_T , P_T and soluble COD (filtrate to 0.45 μm), after the appropriate dilutions to avoid interferences. In addition, the MLVSS/MLSS relationship and food-to-microorganism ratio (F/M) by the Eq.(VI.9) (subsection VI.2.1.3) were calculated.

The sludge production (ΔX), considering both the non-biodegradable suspended solids of the FTOP and the bacterial growth, was obtained by Eq.(VI.18). This equation takes into account two terms: the first term is the MLSS concentration difference in SBR between two consecutive measurements (days i and j), which also included the non-biodegradable SS of the FTOP wastewater. The second term corresponds to the biomass lost in the effluent:

$$\Delta X = \frac{1}{V_R} \cdot \left(\frac{(MLSS_j - MLSS_i) \cdot V_R}{\Delta t_{ij}} + SS_{ef} \cdot Q_{ef} \right) \quad \text{Eq.(VI.18)}$$

where Q_{ef} is the daily effluent volume drawn from the SBR ($L \cdot d^{-1}$) and Δt_{ij} is the time between two measures (day). No sludge was withdrawn during the days considered for the calculation. Biomass growth is included in the sludge production. As the VSS/SS ratio in the FTOP samples remained practically constant, it can be assumed that variations in the sludge production during the experiments were generated by changes in biomass growth.

Total phenols and phenolic profile

The total phenols were measured according to the Folin-Ciocalteu method adapted to Singleton et al. [32]. Sodium carbonate (20% w/v) from Panreac, Folin & Ciocalteu's reagent and Tyrosol analytical standard (both from Sigma Aldrich) were used. Results were expressed as equivalent of tyrosol ($mg \text{ TY } L^{-1}$). The phenolic profile was obtained by High-performance liquid chromatography (HPLC). Phenols were extracted from the FTOP samples according to El-Abbassi et al. [33] method, before HPLC analysis. Jasco HPLC system equipped with a MD-2018 Photodiode Array detector with a Phenomenex Kinetex 5u Biphenyl 100A column (4.6 x 250 mm, 5 μm) were used. The chromatographic method employed was the following: flow rate of $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; injection volume of 10 μL ; solvent system were phase A (1 % acetic acid in water) and phase B (1 % acetic acid in methanol); gradient conditions: the

elution started at 5% of B and remained constant for 1 min, it linearly increased up to 80% of B in 25 min and returned to 5% of B in 2 min.

Respirometric techniques

The OUR, SOUR and Y_H parameters were measured by a respirometer BM-Advance from Surcis. OUR is the oxygen uptake rate in the mixed liquor and SOUR is the specific OUR. Y_H is the heterotrophic biomass yield coefficient. This equipment includes the following units: glass vessel, oximeter, pH-meter, mechanical stirrer and air diffuser ($1.2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Additionally, the temperature in the vessel was maintained by an external heating/cooling system. Respirometric analysis was performed with one litre of ML, collected at the end of the reaction phase. The set temperature was the operating temperature of the SBR. Once temperature was adjusted the aeration was switched on. Air supply was maintained until endogenous conditions for the biomass were achieved. From these conditions, two analyses were carried out: static analysis (without oxygen addition) to determine OUR/SOUR and dynamic analysis (providing oxygen) to obtain Y_H with sodium acetate addition (readily biodegradable substrate).

In static respirometric analysis aeration was stopped, while the other equipment parts remained connected (stirrer, oximeter...). DO was monitored. Under these conditions, the mass balance for the DO is the following [34, 35]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -OUR \quad \text{Eq.(VI.19)}$$

where C_{O_2} was the DO concentration in the mixed liquor.

Thus, OUR ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) was calculated from the slope of the plot of dissolved oxygen concentration versus time. SOUR ($\text{mg O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) was obtained from Eq.(VI.20):

$$\text{SOUR} = \frac{\text{OUR}}{\text{MLVSS}} \quad \text{Eq. (VI.20)}$$

In dynamic respirometric analyses, heterotrophic biomass was evaluated. Aeration did not stop and allyl thiourea as an inhibitor of ammonium oxidizing bacteria was added in a ratio of 2 mg ATU/g MLVSS at least 20 minutes before the respirometric test. A volume of 50 mL of sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), with a COD_{Ac} around $300 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, was added (400 mg of $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ for each 1000 mL of osmotic water) and the DO was monitored. At the beginning, the DO concentration decreased to a minimum value because the microorganisms consumed oxygen to metabolize sodium acetate. After that, the DO concentration increased up to the initial value, which implies total substrate oxidation [34, 36]. Surcis software provided the consumed oxygen in this process, CO_{Ac} ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), which is related to the COD consumed for biomass respiration. Y_{H} ($\text{g cell COD} \cdot \text{g}^{-1}$ soluble COD), for the sodium acetate oxidation, was obtained by Eq.(VI.21):

$$Y_{\text{H}} = 1 - \frac{\text{CO}_{\text{Ac}}}{\text{COD}_{\text{Ac}}} \quad \text{Eq. (VI.21)}$$

where COD_{Ac} was the spectrophotometrically measured COD of the added sodium acetate.

VI.2.3.3. Results and Discussion

SBR-1

Throughout the experimental period, the temperature was $24.2 \pm 1.9^\circ\text{C}$ and the pH was 8.4 ± 0.2 in SBR-1. This pH value was due to the biological oxidation of the organic acids in the FTOP samples (mainly lactic, malic, formic and acetic acid) [37]. Conductivity values in the SBR depended on the feed FTOP

wastewater. Thus, in the first 63 days conductivity was $67.5 \pm 1.4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, meanwhile this value increased progressively when FTOP-3 was fed. Finally, from the 83rd day onwards the conductivity remained at $75.1 \pm 1.5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Sludge production

Figure VI.39 shows the MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS ratio and sludge production, for 105 days of SBR-1 operation.

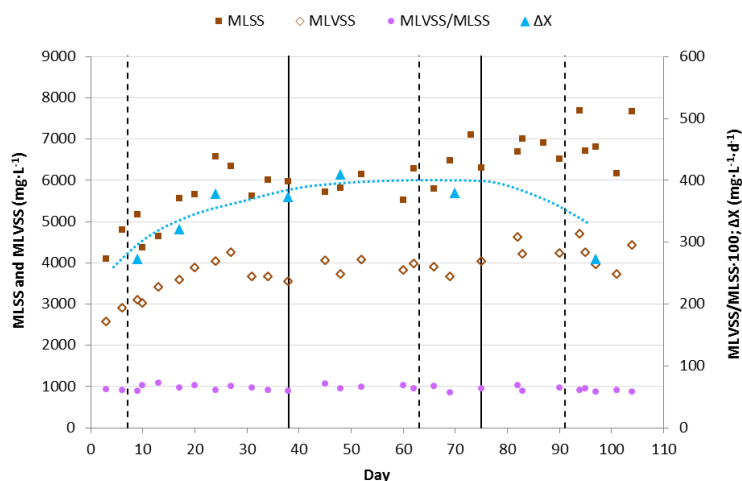


Figure VI.39. SBR-1 ML: MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS and ΔX . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Curved line [····]: trend of sludge production (ΔX).

The initial increase in organic load, due to the fact that the COD of FTOP-2 was higher than FTOP-1, implied that the biomass growth increased. Therefore, ΔX varied from the 273 to 373 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ throughout Step-1. No sludge withdrawal was carried out until a concentration of around $4000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of the MLVSS was achieved (27th day). From this moment on, a periodic sludge withdrawal was

performed to maintain the MLSS concentrations between 5500 y 6500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the MLVSS concentrations between 3500 y 4500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The MLVSS/MLSS ratio was 0.64 ± 0.04 throughout the three experimental steps.

In Step-2, when the time_{air} was reduced to 8 h, the biomass growth remained constant since the ΔX registered in this period was $388 \pm 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. However, in Step-3 the biomass growth decreased (ΔX diminished until 273 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the 97th day), due to the drastic aeration reduction. This phenomenon is shown in many studies that reported the oxic-settling-anoxic (OSA) process [38-40]. Reduction of the biomass growth in the OSA activated sludge process could be due to the sludge fasting/feasting conditions. In the anaerobic reaction time there are insufficient food conditions whereas in the oxic reaction time there are sufficient food conditions [41]. In the OSA process, the catabolism is promoted front of the anabolism by uncoupling the two reactions. Adenosine triphosphate (ATP) is synthesized when aerobic microorganisms oxidize the organic matter, which is captured serving as an energy source for growth. Under anaerobic conditions, neither oxygen nor nitrates are available as electron acceptors and the ATP production is not possible. Thus, the same microorganisms have to consume their stored ATP. When aerobic conditions are set again, the increase of the ATP reserves is enhanced against the synthesis of cell mass. Therefore, sludge reduction occurs [38].

Removal of organic matter and phenolic compounds from FTOP

Figure VI.40 shows the soluble COD and total phenols removal percentages, the F/M ratio, the time_{air} and the time_{DO} .

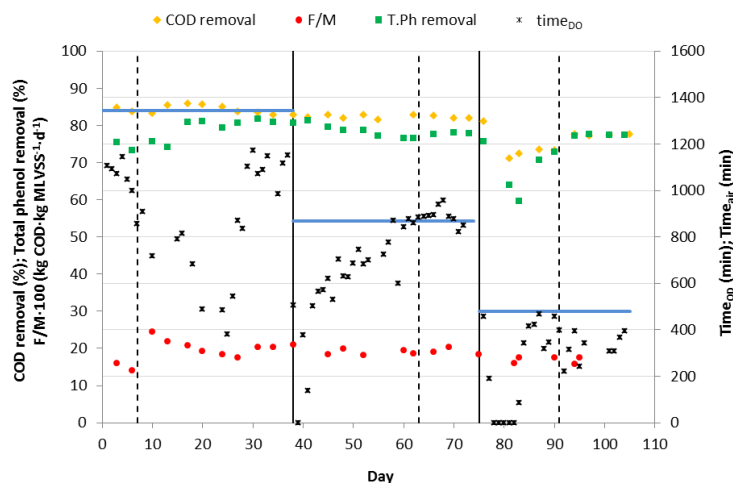


Figure VI.40. SBR-1 effluent: COD and Total phenols removal (%) and Time_{DO}. Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Horizontal lines: [—] Time_{air}.

When FTOP-2 was fed, the F/M ratio increased from 0.14 to 0.24 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ because this sample had higher COD than FTOP-1. This parameter decreased when the MLVSS increased in SBR-1 since both the flow rate and the COD of the feed remained constant. From the 31st day on, the F/M ratio was maintained at 0.19 ± 0.01 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹ because the MLVSS concentration was set between 3500 and 4500 mg·L⁻¹ by regulating the sludge withdrawals.

The reduction in time_{DO} in the first days of Step-1 was due to the increase in the organic load. This enhanced biomass growth, which implied more DO consumption until the microorganisms reached the stationary phase. In these conditions, the DO concentration increases again, since the oxygen demand becomes smaller [42]. From the 25th day the time_{DO} increased progressively. For the last 21 days the mean COD removal percentage was $84.2 \pm 1.1\%$.

The time_{air} reduction from Step-1 to Step-2 hardly had any effect on the COD removal percentage, which was $82.3 \pm 0.4\%$. However, in Step-3 this parameter

diminished in the first days to 71.2% (81st day) when the $time_{air}$ decreased to 8 hours. This phenomenon occurred because the DO was zero during the entire reaction time. Since these conditions were not the aimed ones, another compressor was added to supply more oxygen into the SBR-1 ($6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), achieving oxic conditions. As a consequence, from the 83rd day on, both the DO and COD removal percentages increased. For the last 11 days, the COD removal percentage was $75.7 \pm 3.3\%$.

The T.Ph removal percentage showed to be more sensitive to $time_{DO}$ variations than the COD removal percentage. For the last 11 days of each experimental step, when the DO was stabilized, the T.Ph removal percentage was $81.1 \pm 0.7\%$ in Step-1, $77.9 \pm 0.7\%$ in Step-2 and $77.4 \pm 0.2\%$ in Step-3. Unlike other substances like dyes, whose biodegradation is enhanced by combining anaerobic and aerobic conditions [21, 22], the degradation of the phenolic compounds in SBR-1 was not enhanced by applying this strategy. Figure VI.41 shows exemplarily the phenolic profile for FTOP-2 and the SBR effluent at the end of Step-2.

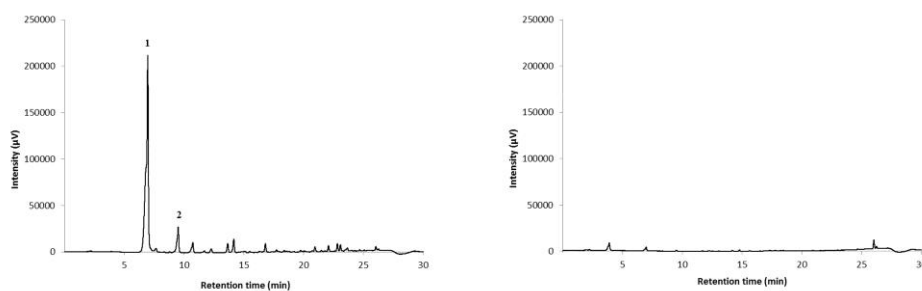


Figure VI.41. Phenolic profile to FTOP-2 and Step-2 in SBR-1. Peak identification: (1) Hydroxytyrosol; (2) Tyrosol.

It can be observed in the FTOP-2 chromatogram that HTY was the main phenolic compound followed by TY. This composition agrees with reports by other authors [14-16]. Chromatograms were similar for the other FTOP samples (not shown).

SBR-2

Throughout the whole experimental period in SBR-2, both temperature and conductivity changes achieved similar results as in SBR-1. However, the evolution of the pH value was different. In Step-1 the pH decreased from 8.2 to 7.2, between the 1st and the 38th day. This occurred because the organic acids removal decreased under anoxic conditions ($\text{time}_{\text{OD}} = 0$). Aerobic conditions in Step-2 progressively increased the pH values to 8.6, in the 52nd day. From this day on, the pH remained at 8.6 ± 0.2 .

Sludge production

Figure VI.42 shows the MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS ratio and sludge production.

In Step-1, when time_{DO} was zero all the reaction time, the ΔX decreased from the 280 to 145 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the 17th day; therefore biomass growth also decreased. Similarly, an increase in the effluent turbidity was observed during this period. Both phenomena can be explained by cell death in this adverse condition. From this time on, no withdrawals were carried out.

Due to the organic matter accumulation in the reactor, the MLVSS/MLSS ratio in the first 48 days was 0.70 ± 0.05 . Additionally, ΔX increased slightly from the 20th day, which does not necessarily mean an increase in the biomass growth, because the performance in SBR-2 decreased. This phenomenon can be

explained because there was SS accumulation in SBR-2, due to the contribution of the FTOP suspended solids. As in SBR-1 in step 3, another compressor was necessary to increase the DO in Step-2. Although the $time_{air}$ was 8 h, in the first days of operation the $time_{DO}$ was zero. From the 47th day on, the $time_{DO}$ increased and the biomass growth increased quickly in Step-2 (ΔX increased to $425 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the 70th day). In Step-3, ΔX increased until $520 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ on the 87th day. The MLVSS/MLSS ratio in Step-2 and Step-3, decreased to 0.60 ± 0.04 . This value was very similar to the one measured in SBR-1.

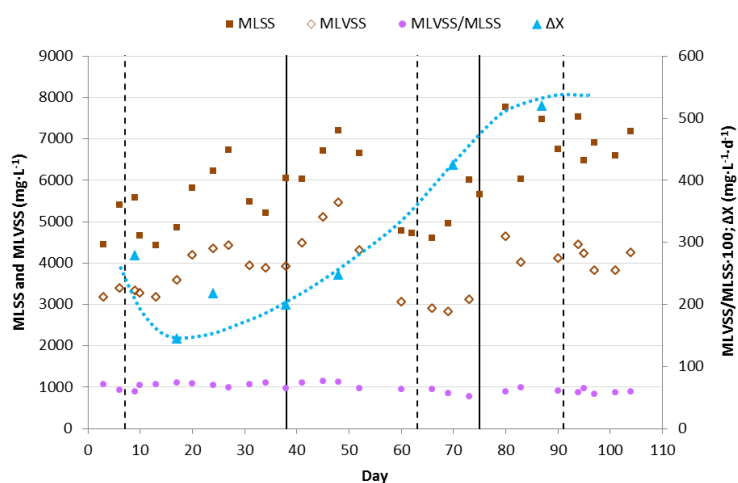


Figure VI.42. SBR-2 ML: MLSS, MLVSS, MLVSS/MLSS and ΔX . Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Curved line [····]: trend of sludge production (ΔX).

Removal of organic matter and phenolic compounds from FTOP

In Figure VI.43, the soluble COD and total phenols removal efficiencies, the F/M ratio, the $time_{air}$ and $time_{DO}$ in SBR2 can be observed.

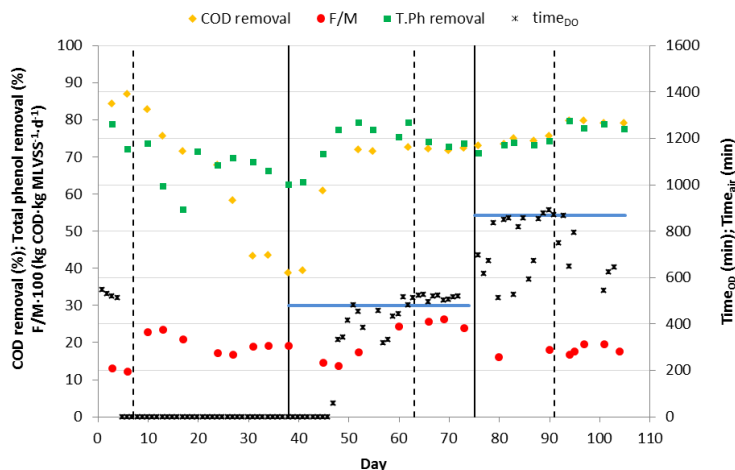


Figure VI.43. SBR-2 effluent: COD and Total phenols removal (%) and TimeDO. Vertical lines: [—] separate the experimental steps; [- - -] separate the FTOP feeding. Horizontal lines: [—] Time_{air}.

As it happened in SBR-1, FTOP-2 addition increased the F/M ratio from 0.12 to 0.23 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. Nevertheless, it can be observed in Figure VI.43 that from this moment on, fluctuations of this parameter were observed. This was due to the increase of the sludge production. As a consequence, the MLVSS concentrations also increased and these values exceeded the range of 3500-4500 mg·L⁻¹, until the withdrawn sludge volume was not properly raised.

In Step-1, a dramatic decrease in the COD removal percentage, on the 38th day, can be observed; from 84.4% to 38.7%. The same effect was observed in the T.Ph removal percentage in the first days. However, this parameter showed an improvement from the 18th day (from 55.6% in 17th day to 69.6% in 27th day, as Figure VI.43 shows), though TY and HTY were detected in SBR-2 effluent, as it can be seen in Figure VI.44.

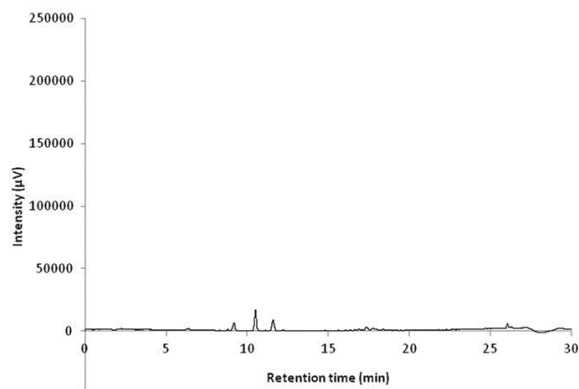


Figure VI.44. Phenolic profile to Step-2 in SBR-2.

This small increase in the T.Ph removal can be due to the enrichment in the biomass of facultative microorganism able to degrade phenols under strict anaerobic conditions [43], what did not occur in SBR-1. The anaerobic degradation of phenols mostly includes a carboxylation reaction that forms 4-hydroxybenzoate, followed by saturation of double bondages and ring cleavage [44]. Other mechanism that may have enhanced the removal of phenols in the SBR is the co-metabolism between phenols and rapidly biodegradable substrates like the organic acids contained in FTOP and those generated by anaerobic reactions. This phenomenon has been recently explained by the development of a co-metabolism model for mixtures of phenol and m-cresol [45]. However, biomass was more effective in aerobic conditions, as it can be observed in the experiments with aerobic phase, in which the T.Ph removal was related to the $time_{DO}$.

In Step-2 the COD and T.Ph removal percentages increased and from the 52nd day on (when $time_{DO}$ was constant) they were maintained at $72.1 \pm 0.4\%$ and $75.8 \pm 2.7\%$, respectively. In the last 11 days of Step-3, the COD and T.Ph removal efficiency were $79.5 \pm 0.4\%$ and $78.3 \pm 1.0\%$, respectively. This mean value of T.Ph. removal efficiency was very similar to that achieved at the

beginning of the experiments. In contrast, the COD removal did not recover completely to the initial values.

Respirometric characterization of the mixed liquors

Table VI.26 shows the results obtained from the respirometric analysis, i.e. OUR, SOUR and Y_H . Other parameters such as the COD, T.Ph and ΔX are also included.

Table VI.26. Results of the respirometric analysis and their relation to the SBRs operating parameters.

Parameter	SBR-1			SBR-2		
	Step-1 0 – 38	Step-2 39 – 75	Step-3 76 – 105	Step-1 0 – 38	Step-2 39 – 75	Step-3 76 – 105
OUR (mg O ₂ ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	11.91	17.15	35.79	-	19.07	27.54
SOUR (mg O ₂ ·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	3.27	4.71	8.13	-	6.79	6.5
Y_H (g cell COD·g ⁻¹ COD)	0.22	0.26	0.21	-	0.50	0.27
ΔX (mg·d ⁻¹)	2240	2280	1640	-	2550	2150
COD removal (%)	84.2	82.3	75.7	38.7	72.1	79.5
T.Ph (%)	81.1	77.9	77.4	69.6	75.8	78.3

In SBR-1, the SOUR measurements increased with decreasing aeration time. As it is known, the SOUR is related to microorganism activity; therefore its increase can be probably explained by the higher activity of the microorganisms

under aerobic conditions, after being subjected to alternate anaerobic/aerobic conditions. In the same way, Wang et al. [46] reported that SOUR values increased when hydraulic retention time decreases. This also means that high SOUR values were associated to low reaction times for degrading organic matter.

This argumentation also explains the behaviour in SBR-2, where the SOUR values diminished in Step-3 once the aeration time was increased. This increment was slight since the increase of the organic matter, due to higher influent COD provided by FTOP-4, entailed a lower time_{DO} increment. The SOUR measurement after Step-1 was not possible in SBR-2, because no endogenous conditions were reached after 8 hours of extended aeration.

Since the MLVSS concentration varied throughout the experimental steps, the SOUR parameter is better than the OUR to compare the oxygen uptake rate variations. The relationship between time_{DO} and SOUR in SBR-1 can be observed in Figure VI.45 (insufficient available SOUR values make no possible to evaluate this relationship in SBR-2).

In this figure, SOUR values presented in Table VI.26 are plotted versus time_{DO} . Represented time_{DO} values were those reached in the last days of each experimental step (mean values and standard deviation).

A linear correlation was observed between both parameters according the following equation:

$$\text{SBR} - 1 \rightarrow \text{SOUR} = 10.183 - 0.006 \cdot \text{time}_{\text{OD}} \quad \text{Eq. (VI.22)}$$

where R^2 value was 1.000.

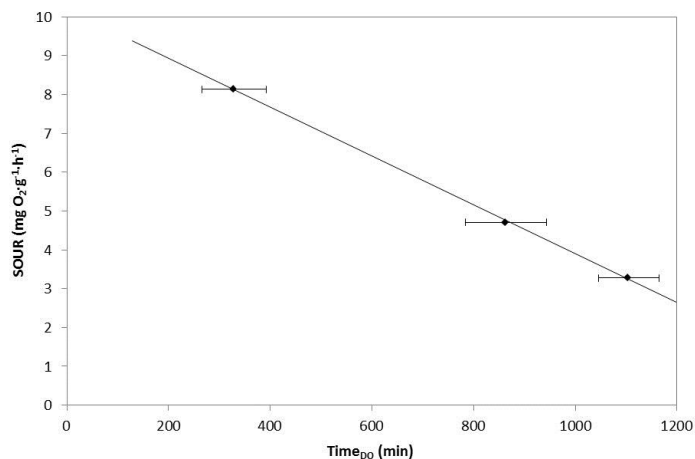


Figure VI.45. Relationship between time_{D0} and SOUR in SBR-1.

As expected, Y_H was related to the ΔX and consequently with the biomass growth, since the biomass growth is a parameter that indicates the apparent microorganisms growth. The Y_H for the activated sludge treating domestic wastewaters is around 0.65. If it is compared with the values presented in table 3, it can be observed that Y_H for domestic wastewaters was higher than Y_H for the FTOP samples in all experiments performed. The osmotic pressure caused by the high salinity implies high levels of energy consumed by the cells in order to maintain their integrity and activity, which drives to a lower energy utilization for growth [48]. The highest Y_H value was measured in the biomass of SBR-2 at the end of Step-2. This increment could be due to the considerable increase in aeration time, which accelerated the metabolic processes in the cells including growth.

VI.2.3.4. Conclusions

The hypersaline effluent from table olive processing can be successfully treated biologically in an aerobically operated SBR in spite of its high conductivity,

COD and phenolic compounds. The COD and T.Ph. removal efficiencies of around 80% can be achieved.

It was proved that reducing the aeration time is possible without reducing the process efficiency. Coming from the completely aerobically operation of the SBR, the allocation of the reaction time in 8 hours of anaerobic phase and 14 hours of aerobic phase was not detrimental for the process. This implies a diminution in the energy consumption in view of the process implementation at a larger scale. In addition to this, the sludge production is reduced as a consequence of alternating anaerobic and oxic conditions.

The implementation of anaerobic times in the reaction higher than 8 hours led to process deterioration. For these conditions, a fast and progressive diminution in the COD removal efficiency occurs. However, the T.Ph. removal efficiency does not decrease in the same way, which means that phenolic compounds can be partially degraded anaerobically. On the other hand, respirometric measurements of both mixed liquors indicated that the SOUR increases linearly when the aerobic time in the SBR decreases.

VI.2.3.5. References

- [1] Lefebvre O., Moletta R., Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review, *Water Res.* 40 (2006), 3671–3682.
- [2] García-García P., López-López A., Moreno-Baquero J.M., Garrido-Fernández A., Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 170 (2011), 59–66.
- [3] Moussavi G., Khavanin A., Alizadeh R., The integration of ozonation catalyzed with MgO nanocrystals and the biodegradation for the removal of phenol from saline wastewater, *Appl. Catal. B Environ.* 97 (2010), 160–167.

- [4] Rivas F.J., Beltrán F.J, Gimeno O., Alvarez P., Optimisation of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines, *J. Hazard. Mater.* B96 (2003), 277–290.
- [5] Lobo C.C., Bertola N.C., Contreras E.M., Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge, *Bioresour. Technol.* 136 (2013), 58–65.
- [6] Kargi F., Dincer A.R., Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation, *Enzyme. Microb. Technol.* 19 (1996), 529–537.
- [7] Wang J.L., Zhan X.M., Feng Y.C., Qian Y., Effect of salinity variations on the performance of activated sludge system, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005), 5–8.
- [8] Chowdhury P., Viraraghavan T., Srinivasan A., Biological treatment processes for fish processing wastewater: a review, *Bioresour. Technol.* 101 (2010), 439–449.
- [9] Reid E., Liu X., Judd S.J., Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006), 164–171.
- [10] Haddadi A., Shavandi M., Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas* sp. strain PH2-2 isolated from saline soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 29–34.
- [11] Peyton B.M., Wilson T., Yonge D.R., Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions, *Water Res.* 36 (2002), 4811–4820.
- [12] Ferrer-Polonio E., Mendoza-Roca J.A., Iborra-Clar A., Alonso-Molina J., Pastor-Alcañiz L., Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry, *Chem. Eng. J.* 273 (2015), 595–602.
- [13] Malheiro R., Sousa A., Casal S., Bento A., Pereira J.A., Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011), 450–457.

- [14] Bouaziz M., Lassoued S., Bouallagui Z., Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater, *Bioorganic Med. Chem.* 16 (2008), 9238–9246.
- [15] Brenes M., Rejano L., Garcia P., Sanchez A., Garrido A., Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [16] Fendri I., Chamkha M., Bouaziz M., Labat M., Sayadi S., Abdelkafi S., Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013), 1–13.
- [17] Rieger L., Takács I., Siegrist H., Improving nutrient removal while reducing energy use at three Swiss WWTPs using advanced control, *Water Environ. Res.* 84(2) (2012), 170–188.
- [18] Descoins N., Deleris S., Lestienne, R., Trouvé E., Maréchal F., Energy efficiency in wastewater treatments plants: optimization of activated sludge process coupled with anaerobic digestion, *Energy.* 41 (2012), 153–164.
- [19] Daw J., Hallett, K., DeWolfe J., Venner I., Energy efficiency strategies for municipal wastewater treatment facilities national renewable energy laboratory, *Natl. Renew. Energy Lab. Golden, CO, USA* (2012), 303.
- [20] Spellman F., *Handbook of water and wastewater treatment plant operations*, CRC Press, Boca Raton, USA (2008).
- [21] Supaka N., Juntongjin K., Damronglerd S., Delia M., Strehaiano P., Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system, *Chem. Eng. J.* 99 (2004), 169–176.
- [22] Kapdan I., Oztekin R., The effect of hydraulic residence time and initial COD concentration on color and COD removal performance of the anaerobic–aerobic SBR system, *J. Hazard. Mater.* 136(3) (2006), 896–901.
- [23] Gerritse J., Gottschal J.C., Mineralization of the herbicide 2,3,6-trichlorobenzoic acid by a co-culture of anaerobic and aerobic bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 101(2) (1992), 89–98.

- [24] Majumder P., Gupta S., Removal of chlorophenols in sequential anaerobic–aerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 98 (2007), 118–129.
- [25] Yang Z., Zhou S., The biological treatment of landfill leachate using a simultaneous aerobic and anaerobic (SAA) bio-reactor system, *Chemosphere*, 72 (2008), 1751–1756.
- [26] Tartakovsky B., Manuel M.F., Guiot S.R., Degradation of trichloroethylene in a coupled anaerobic–aerobic bioreactor: modeling and experiment, *Biochem. Eng. J.* 26 (2005), 72–81.
- [27] Othman N. B., Roblain D., Chammen N., Thonart P., Hamdi M., Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives, *Food Chem.* 116 (2009), 662–669.
- [28] Kiai H., Hafidi A., Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation, *LWT Food Sci. Technol.* 57(2) (2014), 663–670.
- [29] Ryan D., Robards K., Lavee S., Changes in phenolic content of olive during maturation, *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (1999), 265–274.
- [30] APHA AWWA WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st. ed. American Public Health Association, Washington, DC. (2005).
- [31] Wesley Eckenfelder W., Petr Grau P.E., Activated sludge process desing and control theory and practice, Ed. Technomic Publishing AG, Lancaster, Pennsylvania, (1992), 56–159.
- [32] Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods. Enzymol.* 299 (1999), 152–178.
- [33] El-Abbassi A., Khayet M., Hafidi A., Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [34] Garcia-Ochoa F., Gomez E., Santos V.E., Merchuk J.C., Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010), 289–307.

- [35] Garcia-Ochoa F., Escobar S., Gomez E., Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects, Chem. Eng. Sci. 122 (2015), 491–499.
- [36] Mineta R., Salehi Z., Yoshikawa H., Kawase Y., Oxygen transfer during aerobic biodegradation of pollutants in a dense activated sludge slurry bubble column: actual volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen uptake rate in p-nitrophenol degradation by acclimated waste activated sludge, Biochem. Eng. J. 53 (2011), 266–274.
- [37] Parinos C.S., Stalikas C.D., Giannopoulos T.S., Pilidis G.A., Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, J. Hazard. Mater. 145 (2007), 339–343.
- [38] Khursheed A., Sharma M.K., Tyagi V.K., Khan A.A., Kazmi A.A., Specific oxygen uptake rate gradient – Another possible cause of excess sludge reduction in oxic-settling-anaerobic (OSA) process, Chem. Eng. J. 281 (2015), 613–622.
- [39] Chen G.H., An K.J., Saby S., Brois E., Djafer M., Possible cause of excess sludge reduction in an oxic-settling-anaerobic activated sludge process (OSA process), Water Res. 37 (2003), 3855–3866.
- [40] Rodriguez-Perez S., Fermoso F.G., Influence of an oxic settling anoxic system on biomass yield, protozoa and filamentous bacteria, Bioresour. Technol. 200 (2016), 170–177.
- [41] Chen G.H., Yip W.K., Mo H.K., Liu Y., Effect of sludge fasting/feasting on growth of activated sludge cultures, Water Res. 35 (2001), 1029–1037.
- [42] Pinches A., Pallent L., Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media, Biotechnol. Bioeng. 28 (1986), 1484–1496.
- [43] Rosenkranz F., Cabrol L., Carballa M., Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR, Water Res. 47 (17) (2013), 6739–6749.

- [44] Wang J., Zhou Y., Li P., Lu H., Jin R., Liu G., Effects of redox mediators on anaerobic degradation of phenol by *Shewanella* sp. XB, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175 (2015), 3162–3172.
- [45] Chen J.H., Wang Y., Kotsopoulos T.A., Kaparaju P., Zeng R.J., Development of an anaerobic co-metabolic model for degradation of phenol, m-cresol and easily degradable substrate, *Biochem. Eng. J.* 106 (2016), 19–25.
- [46] Wang Z.C., Gao M.C., Ren Y., Effect of hydraulic retention time on performance of an anoxic–aerobic sequencing batch reactor treating saline wastewater, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12 (2015), 2043–2054.
- [47] Orhon D., Babuna F.G., Karahan O., *Industrial wastewater treatment by activated sludge*, IWA Publis., London, U.K. (2009).
- [48] Hao X.D., Wang Q.L., Zhu J.Y., Van Loosdrecht M.C.M., Microbiological endogenous processes in biological wastewater treatment systems, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40 (2010), 239–265.

VI.3. TRATAMIENTO INTEGRADO: COMBINACIÓN DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO Y MEMBRANAS

VI.3.1. Combinación de tecnologías: tratamiento biológico y membranas



Journal of Cleaner Production

Available online 28 November 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



Brine recovery from hypersaline wastewaters from table olive processing by combination of biological treatment and membrane technologies

E. Ferrer-Polonio^a, C. Carbonell-Alcaina^a, J.A. Mendoza-Roca^a, A. Iborra-Clar^a, S. Álvarez-Blanco^a, A. Bes-Piá^a, L. Pastor-Alcañiz^b

[Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.169> [Get rights and content](#)

Abstract

The fermentation brines from table olive processing (FTOP) are hypersaline effluents (conductivities higher than $75 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) with high organic matter concentrations (COD around $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), which also include phenolic compounds (between 700 and $1500 \text{ mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$). In this work, an integrated process for the FTOP reuse as brine in the table olive processing has been evaluated. This integrated process consisted of a biological treatment followed by a membrane system, which included ultrafiltration (UF) plus nanofiltration (NF). The biological treatment was carried out by 6 L laboratory sequencing batch reactor

(SBR). UF and NF were performed in laboratory plants for flat membranes of 0.0125 and 0.0072 m², respectively. Each stream generated during the FTOP treatment (SBR effluent, and UF and NF permeates) were evaluated. The SBR eliminated around 80% of COD and 71% of total phenols concentration. In the final NF permeate the COD concentration was lower than 125 mg·L⁻¹; while the turbidity, colour and phenolic compounds, were completely removed.

Keywords: Hipersaline effluents; phenolic compounds; biological treatment; ultrafiltration; nanofiltration.

Nomenclature:	
HRT	Hydraulic retention time (days)
SRT	Sludge retention time (days)
COD	Chemical oxygen demand (mg·L ⁻¹)
T.Ph	Total phenols (mg TY L ⁻¹)
Cl ⁻	Chloride (mg L ⁻¹)
N _T	Total nitrogen (mg L ⁻¹)
P _T	Total phosphorus (mg L ⁻¹)
SS	FTOP suspended solids (mg L ⁻¹)
VSS	FTOP volatile suspended solids (mg L ⁻¹)
MLSS	Mixed liquor suspended solids (mg L ⁻¹)
MLVSS	Mixed liquor volatile suspended solids (mg L ⁻¹)
F/M	Food-to-microorganism ratio (kg COD·kg MLVSS ⁻¹ d ⁻¹)
VRF	Volume reduction factor
TMP	Transmembrane pressure (bar)
CFV	Cross flow velocity (m s ⁻¹)

VI.3.1.1. Introduction

Industrial activity related to the olive processing is one of the most important economic activities in Mediterranean countries such as Spain, Italy, Greek, Tunisia and Morocco [1]. Among these activities, table olive processing (TOP) is included. Total world production of table olives in 2014 was close to

2,600,000 tonnes. Spain was the greatest producer during 2014 (around 22.1%), followed by Turkey and Egypt (around 16.6% and 15.4% respectively) [2].

TOP objective is to remove the natural olive bitterness. This aim is performed through three steps. In the first step, named debittering, olives are submerged into a NaOH solution (1–2% w/v) during 8-12 hours. Over this period the oleuropein (the phenolic compound that provides bitterness [3] is hydrolysed. Rinsing cycles are carried out in the second step to remove the alkaline solution. At the end, olives are submerged in brine (4–8% w/v of NaCl) for several months. Organoleptic properties of olives fruits are improved in this step, which is named fermentation. The global TOP wastewaters (TOPW) amount generated during the manufacturing process is between 3.9 and 7.5 m³ per tonne of green olives [4]. These large quantities of wastewater contain high organic load, which includes high concentrations of phenolic compounds. The TOPW management is an important environmental problem, because these effluents are traditionally either discharged untreated into the sea or rivers, or stored in evaporation ponds. Alternatively, the TOPW is transported to large municipal wastewater treatment plants for its dilution; however this practice entails serious problems in these treatment plants, since salinity and phenolic compounds performed toxic effects to the biomass of the reactors. Nowadays, strict environmental regulations require the appropriate treatment for such effluents, so that efficient and environmentally sustainable treatments are demanded.

Debittering and rinsing wastewaters are generated between September and November, due to the seasonally olive recollection. On the contrary, the fermentation wastewater from table olive processing (FTOP) is produced throughout the year in the packaging plants [5]. That fact, together with the FTOP wastewater characteristics (pH around 4, 70-90 mS·cm⁻¹ of conductivity, 6-21 g O₂·L⁻¹ of COD and total phenols (T.Ph) concentration between 700-1500 mg TY·L⁻¹), makes appropriate segregate these effluents to treat them separately. The reuse of the spent FTOP, as a new fermentation step or solution packaging, has been studied in some investigations through dilution of these effluents. Nevertheless, the presence of metabolites interferes with the new

fermentation process [5] and organoleptic properties of the olives can be affected [6]; therefore FTOP treatment is necessary.

Some authors have proposed physico-chemical techniques for osmotic solutions management like electro-coagulation [7], ozonation [8] or Fenton's reagent [9], for organic matter removal. However, these techniques are very expensive and are not recommended for large volumes [10]. Biological treatment offers advantages over other wastewater treatments, since it is economic and environmental friendly.

The FTOP biological treatment is a complicated process due to high phenolic compounds concentrations and high salinity, that can inhibit the cellular activity of the biomass [11, 12, 13]. Some authors have reported biological treatments for brine solutions [14, 15, 16] and phenolic wastewaters [17, 18], which include specialized cultures such as halophilic microorganisms). Nevertheless, in these studies simulated wastewater (with one or two phenolic compounds) or diluted wastewater, are usually used.

Although biological olive oil mill wastewater treatment has been extensively studied [19, 20], there are only a few of research papers dealing with the biological treatment of TOP wastewaters, and in these papers the FTOP is often excluded: e.g. Aggelis et al. [21] reported about the biological treatment of debittering wastewaters, Maza-Márquez et al [22] treated the olive washing effluents and Rivas et al. [23] the global wastewater excluding fermentation brines. Despite these difficulties, in a previous work [24] the start-up of sequential batch reactor (SBR) treating FTOP was carried out successfully. After biomass acclimation period, the COD removal percentage was around 80%. Thus, the FTOP has non-biodegradable organic matter that cannot be eliminated in the biological treatment. This is the reason why techniques to remove the recalcitrant organic content are necessary. Adsorption with carbon [25, 26] or polymeric resins [27, 28] and chemical oxidation techniques [29], are viable techniques that remove COD, including phenolic compounds. However, membrane processes have additional advantages, such as the capacity to remove the suspended solids and microorganisms [30]. Although there are

numerous studies dealing with the use of membrane processes in wastewater treatment plants, as a tertiary treatment, where clarified permeate and free microorganisms streams were obtained, allowing its reuse. Nevertheless, only a few studies of their application for hypersaline wastewaters treatment and reuse have been reported [14, 5].

The aim of this work was to perform an integral FTOP treatment that achieves the regeneration of this effluent, for its further reuse as fresh brine in a new fermentation step in the olive processing, or as conservation solution. Three processes were included in this integrated treatment; a direct biological treatment followed by two membrane process. The FTOP biological treatment was carried out by sequential biological reactor (SBR) and its purpose was the elimination of the degradable COD. Thus, the influence of the hydraulic retention time and the organic load on the COD and phenols removal efficiency was evaluated. The membrane treatment included ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) processes and its finality was to eliminate completely the microorganisms coming from the biological treatment, colour, turbidity, suspended solids and T.Ph concentration. This treatment will also reduce the recalcitrant COD.

VI.3.1.2. Materials and Methods

Wastewater

Experiments were carried out with four fermentation brine samples (named from FTOP-1 to FTOP-4), provided by a table olive packaging industry located in Comunidad Valenciana (Spain). These FTOP were filtered by 60 μm sieve, in order to reduce the suspended solids concentration and were characterized (Table VI.27). FTOPs were stored at 4°C, until their use. The parameters were measured in triplicate. The average values and their calculated standard deviations have been presented.

Table VI.27. FTOP samples characterisation.

Parameter ^(*)	FTOP-1	FTOP-2	FTOP-3	FTOP-4
pH	4.2 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Cond (mS·cm⁻¹)	73.7 ± 0.3	76.0 ± 0.5	76.7 ± 0.3	78.3 ± 0.7
COD (g·L⁻¹)	14.16 ± 0.10	7.60 ± 0.09	6.23 ± 0.08	12.10 ± 0.15
Cl⁻ (g·L⁻¹)	275 ± 13	205 ± 9	447 ± 21	480 ± 18
N_T (mg·L⁻¹)	33.41 ± 0.13	37.93 ± 0.06	38.60 ± 0.08	41.61 ± 0.12
P_T (mg·L⁻¹)	60 ± 3	35 ± 3	23 ± 1	41 ± 5
T.Ph (mg TY·L⁻¹)	1554 ± 34	890 ± 25	687 ± 36	1326 ± 32
SS (mg·L⁻¹)	971 ± 62	762 ± 37	2,466 ± 52	1,768 ± 47
VSS (mg·L⁻¹)	523 ± 16	402 ± 22	1,646 ± 32	668 ± 12

* The method for achieve these parameters are explained in Analysis subsection.

The mean pH and conductivity for the four FTOPs were 4.3 ± 0.2 and $76.2 \pm 1.9 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectively. Significant differences were observed for the others parameters presented in Table 1, because these characteristics depend on olive properties such as the crop variety [32, 33] and maturation degree [34], as well as debittering and fermentation time [35]. The requirement of nutrients (nitrogen and phosphorous) in FTOPs was evaluated comparing with the relationship COD/N/P of 250/5/1. Due to the characteristics of the FTOPs no external nutrients were required.

Sequencing batch reactor

The SBR start-up was carried out in a previous work [24]. In this investigation, the previous biomass acclimation of the FTOP was reported and the mechanical components and scheme of the SBR plant can be found. Gradual acclimation of salinity and phenolic compounds and high hydraulic retention time (HRT = 40 days) were required to achieve high COD and T.Ph removal performance.

In the present work, the SBR was operated during 208 days with 6 L of volume reaction and one operating cycle per day, which included the following steps: filling (2 min), reaction (1320 min), sedimentation (90 min), drawing (2 min), and idle (26 min). Feeding and drawing were carried out with peristaltic pumps. A mechanical stirrer and a compressor were connected during reaction phase. Compressor was connected to a porous diffuser located on the bottom of the reactor, which provided an aeration flow rate of $9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. The dissolved oxygen (DO) in the mixed liquor was controlled by a programmed automaton, which maintained it between 1.5 and $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sludge withdrawal was performed to have the mixed liquor volatile suspended solids around $3,500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

In the first operation period, the F/M ratio was maintained practically constant by adjusting the feed flow rate. Therefore, the HRT varied with the fed FTOP. In the second operation period, the HRT was maintained constant and the F/M ratio increased because $\text{COD}_{\text{FTOP-4}}$ was higher than $\text{COD}_{\text{FTOP-3}}$. The COD and T.Ph removal efficiencies were also studied under these conditions.

Table VI.28 summarizes the operational conditions throughout the experimental periods. The SBR effluent was collected when FTOP-2 and FTOP-3 were fed (during 40 days) in order to use them as feed for the UF and NF processes.

Table VI.28. Operating conditions.

Period	Sample	$V_{\text{feed/draw}}$ (mL)	HRT (days)	F/M rate ^(*) ($\text{kg COD}\cdot\text{kgMLVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	Experimental time (days)
1	FTOP-1	150	40		0-35
	FTOP-2	290	20.7	0.106 ± 0.017	36-74
	FTOP-3	360	16.7		75-155
2	FTOP-4	360	16.7	0.212 ± 0.043	156-208

* Indicative values calculated from a MLVSS rate between 3000 - $4000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ultrafiltration unit

The SBR effluent has been treated by an automatically controlled UF unit equipped with an UF module for a flat sheet membrane (Rayflow Orelis, France). The control system could regulate automatically the transmembrane pressure (TMP), the cross flow velocity (CFV), and the temperature. The used UF conditions were 3 bar, 2.2 m/s and 25°C. The UF module was configured to work with one membrane clipping in cross-flow mode. A membrane UP005 supplied by Microdyn Nadir (Germany), whose main characteristics are in Table VI.29, was used.

Table VI.29. Ultrafiltration and nanofiltration membranes characteristics.

Reference	Material	MWCO	Salt pass	Active surface (m ²)	Permeability·10 ^{6(**)} (m ³ ·m ⁻² ·s ⁻¹ ·bar ⁻¹)
UP005	Polyethersulfone non hydrophilic	5 kDa	-	0.0125	6.64± 0.03
NF245	Polyamide	-	1.0 % (*)	0.0072	1.19± 0.02

* Data provided by the manufacturer. Operating conditions: 2,000 ppm MgSO₄ feed, 9 bar and 25°C.

** Experimental data. Linear relationship between pure water permeates flux and TMP at 25°C.

During the UF process, the retentate stream was recycled back to the feed tank and the permeate stream was stored in a separated tank. The UF permeate was the feed for the NF unit. A Kern PKP precision balance (Kern, Germany) was used to monitor by weighing the permeate flux. The collected data were recorded by a data acquisition system.

The effluent filtration (60 µm) was carried out as control method to ensure the flocs removal in case the settleability of the activated sludge worsened. During

the UF of these samples volumes of 5.5 L were treated in different tests at the conditions described above. The UF tests were carried out up to a volume reduction factor (VRF) of 1.57 which is the maximum one reached by the equipment working with 5.5 liters. The final rejection volumes of these tests were mixed in order to use them again as membrane feed for the process study at a higher VRF. In this way, other different UF tests were run with 5.5 liters of the final rejections of VRF of 1.57 until reaching a final VRF of 2.10. All the runs were performed with the same membrane piece.

Between tests, the membrane was cleaned with different solutions at $2.2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.6 bar and room temperature. The membrane cleaning protocol was the following: rinsing with osmotic water during 9 minutes, cleaning with basic solution of NaOH (pH 11) (Panreac, Spain) recycling it during 30 minutes at 30°C , rinsing with osmotic water during 9 minutes, cleaning with acid solution of citric acid (1% w/v) (Panreac, Spain) recycling it during 5 minutes and a final rinsing with osmotic water during 9 minutes. Membrane permeability was considered to be cleaned if more than 95% of its initial hydraulic permeability was recovered.

Nanofiltration unit

The permeate obtained in the UF unit was further treated in the NF unit. This unit was an automatic plant, equipped with an NF module for a flat sheet membrane designed in “*Instituto de Seguridad Industrial, Radiofísica y Medioambiental*”, ISIRYM (Spain) [36]. This plant can regulate automatically the CFV and temperature. The operating conditions were TMP of 15 bars, CFV of $1.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ and 25°C during 4 hours. A membrane NF245 supplied by DOW (USA), was used. Membrane characteristics it can be seen in Table VI.29. The NF tests were performed in a similar way as the UF experiments, but recycling permeate and retentate streams back to the feed tank. In order to measure the permeate flux, it was used the same precision balance as in the UF step, and the data were collected by the same method. The NF membrane was

cleaned by rinses with tap water and osmotic water at 25°C without TMP, and without recirculation of any stream until the retentate had the same conductivity as the feed. After that, the retentate was recycled back to the feed tank and, at 1 bar, the membrane was rinsing with osmotic water until the membrane permeate had the same conductivity as the feed.

Analysis

The characterizations of the effluent and the mixed liquor of the SBR were performed once a week. The parameters measured were the following: pH, conductivity, colour, soluble COD (filtered to 0.45 µm), mixed liquor suspended solids (MLSS) and mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS). Additionally the F/M ratio [Eq.(VI.9), subsection VI.2.1.3], MLVSS/MLSS, COD and T.Ph removal percentages [Eq.(VI.10) and Eq.(VI.11), subsection VI.2.1.3] were calculated.

During the UF step, the parameters controlled in the initial feed, in the final retentate and in the membrane permeate were pH, conductivity, turbidity, colour, soluble COD and T.Ph. In addition, the evolution of the soluble COD and the T.Ph concentration in permeate were controlled, taken samples at different times. During the NF step the controlled parameters were pH, conductivity, colour, soluble COD and T.Ph for the initial feed (final UF permeate) and final permeate. The phenolic profile was obtained for the final UF and NF permeates.

The effluent colour after biological, UF and NF treatments, was measured by the “FZ” parameter [[2], which was calculated by Eq.(VI.23), after diluting 40 times the samples:

$$FZ = \frac{A_{436}^2 + A_{525}^2 + A_{620}^2}{A_{436} + A_{525} + A_{620}} \quad \text{Eq.(VI.23)}$$

where A_{436} , A_{525} and A_{620} were the absorbance measured at 436, 525 and 620 nm.

To evaluate the membranes separation efficiency, COD and T.Ph rejections were determined according to Eq.(VI.24):

$$R_i(\%) = \left(1 - \frac{C_{Pi}}{C_{Fi}}\right) \cdot 100 \quad \text{Eq.(VI.24)}$$

where R_i is the rejection of the parameter “i” (COD or T.Ph) in %, C_{Pi} is the concentration of parameter “i” in the permeate stream and C_{Fi} is the concentration of parameter “i” in the feed solution.

The pH and conductivity measurements were carried out with pH-Meter GLP 21+ and EC-Meter GLP 31+ (both from Crison), respectively. The SS, VSS, MLSS and MLVSS were measured according to APHA [38]. The turbidity was determined with a Turbidimeter D-112 from Dinko Instruments. The N_T , P_T , Cl and soluble COD concentration were analyzed using kits and a Spectrophotometer DR600 (Hach Lange), after the appropriate dilutions to avoid interferences. The same spectrophotometer was used to measure A_{436} , A_{525} and A_{620} .

Phenolic compounds

The T.Ph concentration was measured spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method [39]; sodium carbonate (20% w/v) from Panreac, Folin & Ciocalteu’s reagent and Tyrosol analytical standard, both from Sigma Aldrich, were used. The results were reported as equivalent tyrosol concentration ($\text{mg TY} \cdot \text{L}^{-1}$). Also the phenolic profile was obtained by high-performance liquid chromatography, with Jasco HPLC equipment, according to chromatographic method followed in a previous work [40]. Hydroquinone was added as internal standard, therefore it had a constant concentration in all samples analyzed. The FTOPs and the effluents (SBR and UF/NF permeate) were previously treated in order to extract phenols from the saline matrix, according to El-Abassi et al. [41].

VI.3.1.3. Results and Discussion

SBR performance

The mixed liquor temperature was $21.9 \pm 2.7^\circ\text{C}$ during the experimental time (208 days). In this period the conductivity and the pH of the SBR effluent were $87.4 \pm 4.1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ and 8.2 ± 0.2 , respectively. This high pH value (considering that the FTOPs was an acidic wastewater) was due to the organic acids biodegradation (lactic, malic, formic and acetic acid) contained in the FTOP samples [42].

In Figure VI.46, the removal efficiencies of COD and T.Ph in the SBR and the final concentrations of COD and T.Ph. in the effluent can be seen. The vertical lines indicate the FTOP feeding change.

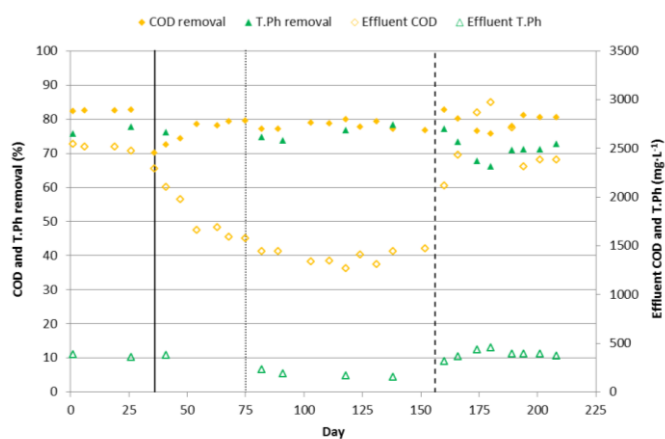


Figure VI.46. Evolution of the COD and T.Ph removal efficiency and the effluent COD and T.Ph concentration. Vertical lines: [—] FTOP-2; [.....] FTOP-3; [- -] FTOP-4.

Experimental Period-1

As mentioned in the materials and method section, in the first experimental period (170 days) the F/M ratio was maintained in 0.12 ± 0.01 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. The mean MLSS and MLVSS values were 5794 ± 573 and 3101 ± 350 mg·L⁻¹, respectively. Under these operational conditions the MLVSS/MLSS ratio was maintained in 0.53 ± 0.03 and the sludge retention time (SRT) was 43 days.

Although the COD removal percentage remained in $79.1 \pm 2.1\%$ in Period-1, COD_{effluent} decreased since COD₀ also decreased. In fact, the COD of FTOP-2 was almost the half of the COD of FTOP-1. This is the reason why the decrease of COD_{effluent} was considerable between days 36th and 74th. Thus, mean COD_{effluent} values were 2507 ± 27 and 1380 ± 308 mg·L⁻¹ when FTOP-1 and FTOP-3 were fed, respectively. Likewise, the same trend was observed for the T.Ph. The T.Ph removal percentage remained in $76.0 \pm 1.8\%$ while mean T.Ph_{effluent} decreased from 364 ± 21 to 180 ± 34 mg·L⁻¹ when FTOP-1 and FTOP-3 were fed, respectively. The effluent colour was dark due to the oxidation of the phenolic compounds that remained after biological treatment under alkaline conditions, which is known as “enzymatic browning” [43, 44]. This phenomenon consists of the formation of compounds such as o-quinones, which can rapidly polymerize to form the melanin that produces dark brown coloration [12, 45]. The FZ parameter increased when T.Ph_{effluent} increased. Thus, the means FZ values in the effluent were 0.12 ± 0.01 and 0.07 ± 0.01 when FTOP-1 and FTOP-3 were fed, respectively.

The phenolic profile for FTOP-3 and the effluent collected from the SBR, while FTP-3 was fed, are shown in Figure VI.47. As it can be observed, hydroxytyrosol (HTY) was the main phenolic compound in FTOP-3. It also occurred in the other FTOPs samples (chromatograms not shown). Hydroxytyrosol concentration is explained by the hydrolysis of oleuropein [46], which is the main phenolic compound in olive fruits [47]. Another phenolic compound present in all FTOPs was tyrosol (TY), which is produced from the

hydrolysis of ligstroside. This composition agrees with those reported by other authors [48, 35, 49]. The presence of other phenolic compounds such as caffeic, gallic, p-hydroxyphenylacetic, vanillic..., which were not detected in the analysed samples, depends on the cultivar and olive maturation stage, as commented in “Materials and Methods” section. In the SBR effluent collected to perform the UF/NF treatment, the T.Ph concentration was reduced around 84.7%. This reduction is also checked in the phenolic profile as it is shown in Figure VI.47.

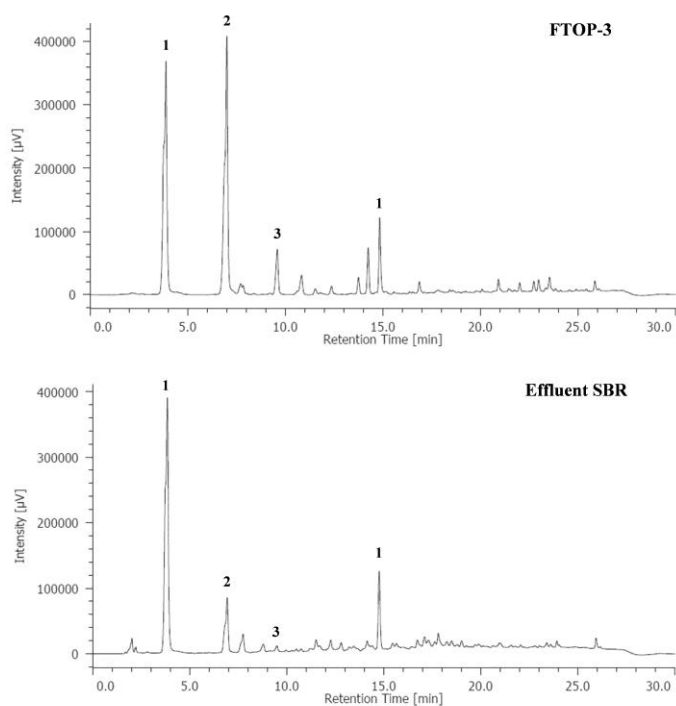


Figure VI.47. HPLC chromatograms for the effluent SBR and FTOP-3. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.

Experimental Period-2

In the second experimental period (last 52 days), the F/M ratio was maintained in 0.19 ± 0.01 kg COD·kg MLVSS⁻¹·d⁻¹. This increase in the organic load implied an increase in the biomass growth, and the SRT became 38 days for maintaining the MLVSS around 3000 mg·L⁻¹. The MLVSS/MLSS ratio was maintained in 0.55 ± 0.04 .

In the first days the effluent COD and T.Ph concentrations increased since both parameters were higher in FTOP-4 than in FTOP-3. As it happened in Period-1, when FTOP-2 was fed, several days were necessary in order to reach the stationary condition. After this period the average values of the COD and T.Ph removal percentages were $80.6 \pm 0.4\%$ and $71.4 \pm 0.9\%$, respectively. These results confirm that the biodegradable organic matter in the FTOPs was around 80% and that increasing HRT values and/or decreasing F/M ratios within the tested ranges did not enhance the SBR performance. Thus, a tertiary treatment is necessary to remove the recalcitrant organic matter of the FTOP.

Membrane process

Ultrafiltration process

The characterization of the SBR effluent collected to further treatment by membranes is shown in Table VI.30. The parameters were measured in triplicate. The average values and their calculated standard deviations have been presented.

As it was explained in section VI.3.1.2, the SBR effluent was previously filtered with a cartridge filter of 60 µm. In this step, the mean value of the turbidity reduction was $18.69 \pm 8.66\%$ remaining a turbidity of 34.99 ± 3.73 NTU in the feed stream to the UF. The FZ parameter was reduced $1.61 \pm 1.35\%$ and the rest of parameters were not affected.

Table VI.30. Streams characterization in the integrated FTOP treatment.

Parameter	SBR	UF		NF
	treatment	Permeate	Final feed	Permeate
pH	7.9 ± 0.3	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.1	7.8 ± 0.1
Conductivity (mS·cm ⁻¹)	96.4 ± 4.2	101.9 ± 0.4	102.9 ± 1.7	90.9 ± 1.3
Turbidity (NTU)	43.0 ± 4.7	N.d.	36.9 ± 0.6	N.d.
COD (mg·L ⁻¹)	1922 ± 103	835 ± 29	3540 ± 25	451 ± 17
T.Ph (mg TY·L ⁻¹)	207 ± 5	43 ± 2	378 ± 10	N.d.
FZ	0.052 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.066 ± 0.001	N.d.

N.d. = not detected

a) Permeate flux and membrane fouling

Figure VI.48 shows the evolution of the permeate flux with the VRF of three tests during the UF step.

As it can be observed, the evolution of the permeate flux showed initial sharp declines followed by gradual diminutions over the time. The variation of the fluxes with the time followed the typical behavior described for severe fouling on membranes [50, 51] operated at increasing feed [52]. The achieved VRF correspond to a reduction of the initial feed volume of 52%.

Comparing the two steps, it can be noted that the initial permeate fluxes in the tests increasing the VRF from 1.00 to 1.57 were higher than the initial flux in the test in that the VRF increased from 1.57 to 2.10. Thus, the initial permeate flux values were $1.66 \times 10^{-5} \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ and $1.41 \times 10^{-5} \pm 0.06 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. At the beginning of the tests, in the first stage of the membrane fouling, a permeate flux decline higher than 50% was observed. This initial fouling corresponded to the existence of pore blocking phenomena, which are mostly responsible for membrane fouling [53].

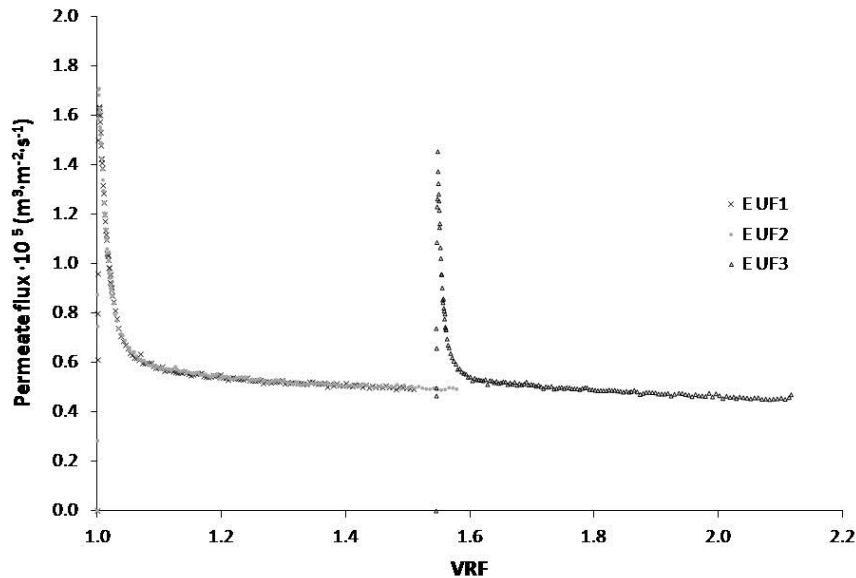


Figure VI.48. Evolution of the permeate flux with VRF in the UF process for two tests concentrating from a VRF of 1 to 1.57 (UF1 and UF2) and one UF test concentrating with the final rejections of UF1 and UF2 until reaching a final VRF of 2.10 (UF3).

The final permeate flux for a VRF of 2.10 was $0.46 \times 10^{-5} \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ representing an approximate flux decline around 70% of the initial one. In a previous work, the same UF membrane was used at the same conditions of TMP, CFV and temperature with the raw FTOP, i.e. without previous SBR treatment [54]. In this study, the flux decline at the beginning of the test was around 85% of the initial one. This fact indicates that the SBR treatment reduces the particles that caused the pore blocking at the initial time of the UF treatment. Moreover, the final flux decline for the FTOP without previous SBR treatment was 85%. This value is higher than that measured in the UF experiments using biologically treated FTOP. The membrane permeability was totally recovered after the application of the cleaning protocol in all the tests. This fact can be confirmed comparing the permeate flux evolution of UF1 and UF2 tests, in which the initial permeate flux and its evolution were practically

the same. Nevertheless, the initial permeate flux in UF3 test was lower. It was not due to a reduction in the membrane permeability after the cleaning (permeability was totally recovered), but to the high feed concentration at the beginning of the experiment.

b) COD and total phenols rejection

In Figure VI.49 the evolution of the COD and T.Ph concentrations in the permeate flux can be observed. During the test, due to the membrane rejection, an increase in the feed concentration in terms of these parameters takes place (9.69% and 21.19%). The COD rejection was lower than the T.Ph rejection during the UF process, as illustrate in Figure 5. The raise of the membrane rejection, for increasing feed concentration, was also observed by other authors working with UF and NF membranes [55, 56].

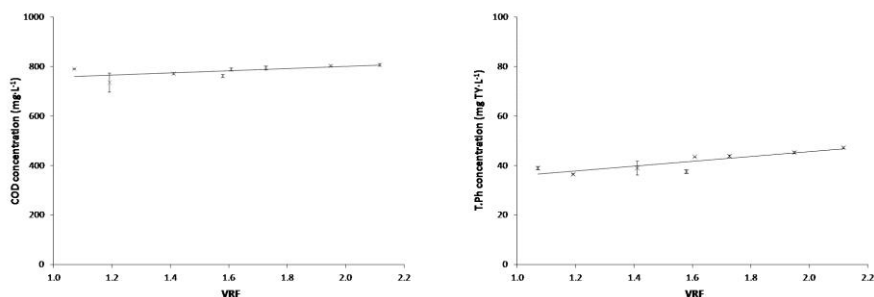


Figure VI.49. Evolution of the COD and T.Ph concentrations in the UF permeate.

The characterizations of the final permeate and the final concentrated feed after the UF step are show in Table VI.30. The results showed that (for a VRF of 2.10) turbidity was not detected in the permeate stream, and a reduction of 56.5

$\pm 2.3\%$ and $79.1 \pm 0.5\%$ were achieved for COD and T.Ph concentrations, respectively. Also, FZ was reduced $88.7 \pm 0.2\%$, while no effect on the pH and on the salts concentration was observed.

Figure VI.50 shows the phenolic profiles of the UF permeate. Comparing this figure with Figure VI.47 (SBR effluent) it can be observed that after the UF process, tyrosol was not detected and hydroxytyrosol peak decreased. It can be appreciated too, that in Figure VI.47 there were more small unidentified peaks than in Figure VI.50, which shows that the UF membrane at these conditions rejects the great majority of the phenolic compounds.

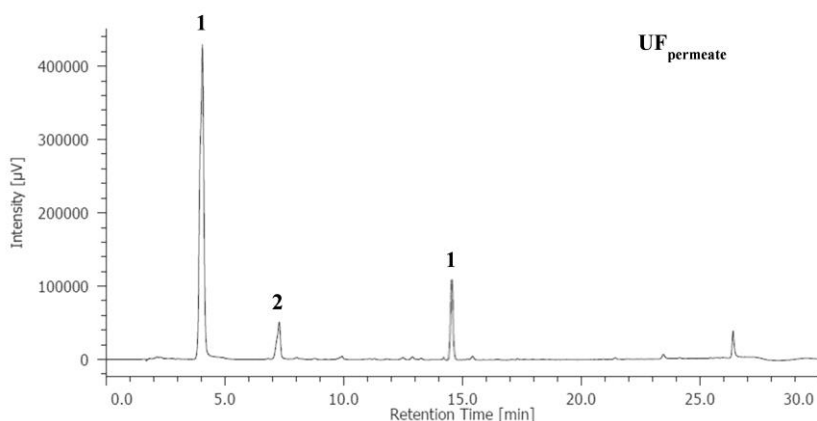


Figure VI.50. HPLC chromatograms for the UF permeate. Peak identification: (1) Hydroquinone (internal standard); (2) Hydroxytyrosol; (3) Tyrosol.

Nanofiltration process

The accumulated UF permeate was treated by NF. An example of the evolution of the permeate flux in the NF treatment is shown in Figure VI.51.

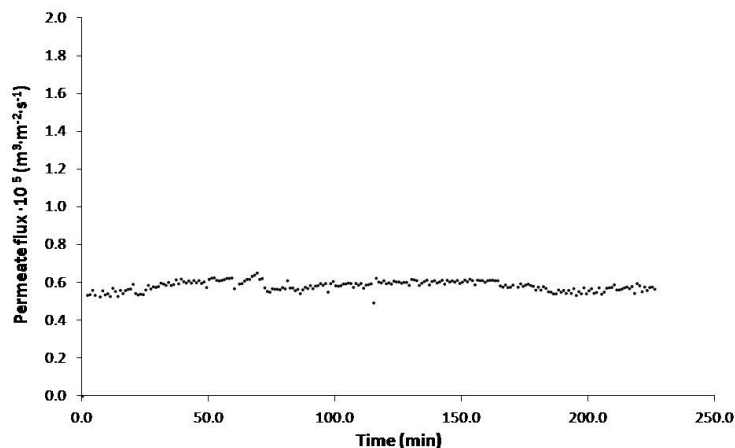


Figure VI.51. Evolution of the permeate flux in the NF treatment.

a) Permeate flux and membrane fouling

The stationary permeate flux at the end of the NF test was $0.57 \times 10^{-5} \pm 0.02 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ at 15 bar, $1.5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ of cross flow velocity and 25°C . This value was a 67.1% lower than the initial hydraulic permeate flux ($1.73 \times 10^{-5} \pm 0.08 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) at the same test conditions. Nevertheless, as shown in Figure 7, no flux decline was observed during the experiment. The absence of flux decline working with wastewater could be caused by the high salt concentration [57]. These authors worked with a wastewater containing salts and dye, obtaining a similar permeate flux evolution at high NaCl concentrations up to $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. In our case, the NaCl concentration was around $70\text{-}80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. At this high salt concentration the hydrophilicity of the membrane increases [58] and the trend to cake layer formation on the membrane surface is reduced [57].

The characterization of the NF permeate is shown in Table VI.30. It can be observed that the permeate stream keeps the same pH as the feed. The conductivity was only reduced $10.8 \pm 0.3\%$. Thus, the salts rejection was very

low, which is explained by the high salts concentrations in the feed. An increase in NaCl concentration leads to a decreased of the NaCl rejection decrease [59]. This fact enhances the recovery of a saline stream in NF permeate free from other compounds that are rejected by the membrane.

b) COD and total phenols rejection

The COD rejection was $45.9 \pm 1.9\%$. This lower COD rejection could be attribute to the high salinity [60]. The T.Ph concentration was negligible in the permeate stream. The colour, after 40 times dilution, was not detected. The same parameter was measured directly without dilution, and the FZ value was 0.001. This means that the colour elimination was practically complete.

Although it has been taken into account the dilution of the samples in order to reduce the interferences by the high chloride concentration, at this low COD concentration the chloride concentration must be considered. Thus the COD associated to known concentrations of sodium chloride in model solutions was measured. Therefore, it was determined that the COD concentration in a sample of sodium chloride solution in water with the same conductivity as NF permeate, had a COD concentration of $320 \pm 12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In this way, it was estimated that the COD associated with organic matter in the NF permeate was $123 \pm 18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Figure VI.52 summarizes the main results obtained in each step of the integrated system for the FTOP wastewaters treatment. It can be observed that in the final treated stream, the COD and T.Ph concentrations were reduced by 98.22% and 100%, respectively. In addition, the turbidity and colour of the FTOP wastewaters were eliminated. The NaCl concentration in the permeate flux remained at level as fresh brine, since conductivity was $90.9 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. On the other hand, as it is well known that the UF and the NF process remove viruses and bacteria [61, 62]. Therefore, the permeate stream is basically a brine with the required NaCl concentration and only a 2‰ of lactic acid should be

added to achieve the traditionally composition of the fresh brines used in the table olive processing [63].

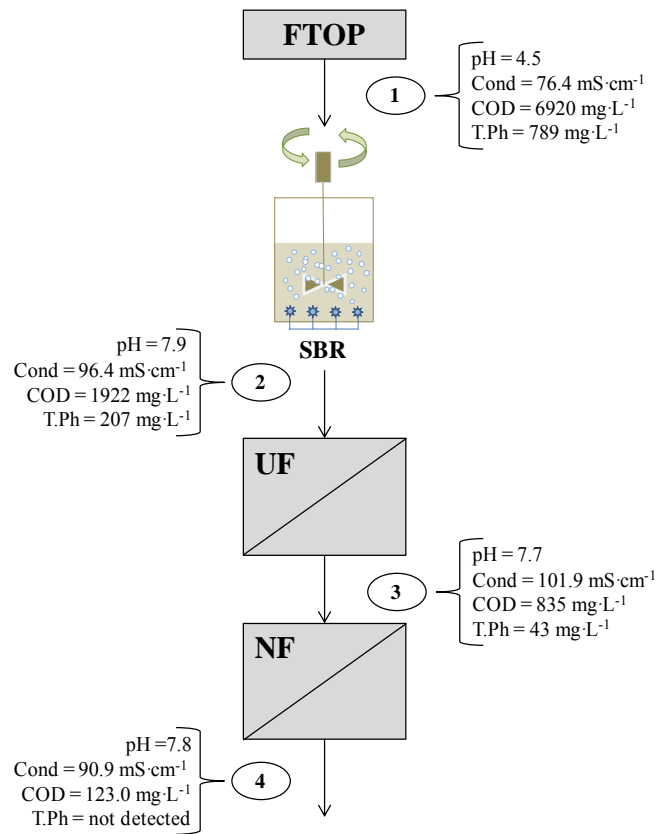


Figure VI.52. Integrated treatment for the FTOP wastewaters. Streams: (1) FTOP wastewater, (2) SBR effluent, (3) UF permeate, (4) NF permeate.

VI.3.1.4. Conclusions

The fermentation brines from table olive processing wastewaters are very difficult to treat due to their enormous concentration in sodium chloride together with high COD and phenol compounds concentrations. Thus, in this work, an integrated process for the management of these effluents has been evaluated. The proposed hybrid system consisting of a biological treatment in a SBR and a combined membrane process, which included UF plus NF. The final NF permeate stream had conductivity higher than $90 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, COD associated to organic matter lower than $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and phenol compounds were not detected. Therefore, this effluent could be reused as brine in the table olive processing.

The biological treatment tests showed that in spite of the high COD and T.Ph. removal efficiencies (around 81 and 71%, respectively), a considerable refractory organic matter concentration remains after the treatment. Thus membrane processes have to be used for the further treatment of the SBR effluent. Within the membrane processes, UF is the key process since severe fouling of the UF membranes occurred. However, it was mainly reversible and the used cleaning procedure restored the initial membrane permeability. By contrast, no fouling was observed in the used NF membrane.

VI.3.1.5. References

- [1] Moussavi, G., Barikbin, B., Mahmoudi, M., The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR, *Chem. Eng. J.* 158 (2010), 498–504.
- [2] International Olive Council [WWW Document], http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/147-microsite?lang=en_US (visited on the February 2016).

- [3] Marsilio, V., Lanza, B., Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998), 520–524.
- [4] Kopsidas, G.C., Wastewaters from the preparation of table olives, *Water Res.* 26 (1992), 629–631.
- [5] Romero-Barranco, C., Brenes-Balbuena, M., García-García, P., Garrido Fernández, A., Management of spent brines or osmotic solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001), 237–246.
- [6] Brenes, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Influence of reusing regenerated brines on some characteristics of the packing green olives, *Grasas y Aceites* 40 (1989), 182–189.
- [7] García-García, P., López-López, A., Moreno-Baquero, J.M., Garrido-Fernández, A., Treatment of wastewaters from the green table olive packaging industry using electro-coagulation, *Chem. Eng. J.* 170 (2011), 59–66.
- [8] Moussavi, G., khavanin, A., Alizadeh, R., 2010b. The integration of ozonation catalyzed with MgO nanocrystals and the biodegradation for the removal of phenol from saline wastewater, *Appl. Catal. B Environ.* 97, 160–167.
- [9] Rivas, F.J., Beltrán, F.J., Gimeno, O., Alvarez, P., Optimisation of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines, *J. Hazard. Mater.* B96 (2003), 277–290.
- [10] Lobos, J., Wisniewski, C., Heran, M., Grasmick, A., Sequencing versus continuous membrane bioreactors: Effect of substrate to biomass ratio (F/M) on process performance, *J. Memb. Sci.* 317 (2008), 71–77.
- [11] Haddadi, A., Shavandi, M., Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas* sp. strain PH2-2 isolated from saline soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 29–34.
- [12] Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., Aloui, F., Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, *Process Biochem.* 35 (2000), 725–735.

- [13] Wang, Y.-F., Wang, X.-L., Li, H., Lin, K.-F., Wang, P., Yang, J., Liu, Y.-D., Sun, Z.-Y., Fan, L.-H., Wu, Z.-M., Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 93 (2014), 138–144.
- [14] Kargi, F., Dinçer, A.R., Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contactor, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998), 427–433.
- [15] Sharrer, M.J., Tal, Y., Ferrier, D., Hankins, J.A., Summerfelt, S.T., Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system, *Aquac. Eng.* 36 (2007), 159–176.
- [16] Woolard, C.R., Irvine, R.L., Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor, *Water Res.* 29 (1995), 1159–1168.
- [17] El-Naas, M.H., Al-Muhtaseb, S. a., Makhlof, S., Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel, *J. Hazard. Mater.* 164 (2009), 720–725.
- [18] Sivasubramanian, S., Namasivayam, S.K.R., Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015), 243–252.
- [19] Chiavola, A., Farabegoli, G., Antonetti, F., Biological treatment of olive mill wastewater in a sequencing batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 85 (2014), 71–78.
- [20] Günay, A., Çetin, M., Determination of aerobic biodegradation kinetics of olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85 (2013), 237–242.
- [21] Aggelis, G.G., Gavala, H.N., Lyberatos, G., Combined and separate aerobic and anaerobic biotreatment of green olive debittering wastewater, *J. Agric. Eng. Res.* 80 (2001), 283–292.
- [22] Maza-Márquez, P., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., Rodelas, B., Juárez-Jiménez, B., Fenice, M., Biodegradation of olive washing wastewater pollutants by highly efficient phenol-degrading strains selected from adapted bacterial community, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82 (2013), 192–198.

- [23] Rivas, F.J., Beltrán, F.J., Alvarez, P., Frades, J., Gimeno, O., Joint aerobic biodegradation of wastewater from table olive manufacturing industries and urban wastewater, *Bioprocess Eng.* 23 (2000), 283–286.
- [24] Ferrer-Polonio, E., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Alonso-Molina, J., Pastor-Alcañiz, L., Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry, *Chem. Eng. J.* 273 (2015), 595–602.
- [25] Dąbrowski, A., Podkościelny, P., Hubicki, Z., Barczak, M., Adsorption of phenolic compounds by activated carbon - A critical review, *Chemosphere* 58 (2005), 1049–1070.
- [26] Kumar, S., Zafar, M., Prajapati, J.K., Kumar, S., Kannepalli, S., Modeling studies on simultaneous adsorption of phenol and resorcinol onto granular activated carbon from simulated aqueous solution, *J. Hazard. Mater.* 185 (2011), 287–294.
- [27] Maretto, M., Bianchi, F., Vignola, R., Canepari, S., Baric, M., Iazzoni, R., Tagliabue, M., Petrangeli, M., Microporous and mesoporous materials for the treatment of wastewater produced by petrochemical activities, *J. Clean. Prod.* 77 (2014), 22–34.
- [28] Petrotos, K.B., Gkoutosidis, P.E., Kokkora, M.I., Giankidou, K.G., Tsagkarelis, A.G., A study on the kinetics of olive mill wastewater (OMWW) polyphenols adsorption on the commercial XAD4 macroporous resin, *Desalination, Water Treat.* 51 (2012) 2021–2029.
- [29] Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products, *J. Clean. Prod.* 12 (2004), 603–611.
- [30] Ahmad, A.L., Ooi, B.S., Wahab Mohammad, A., Choudhury, J.P., Development of a highly hydrophilic nanofiltration membrane for desalination and water treatment, *Desalination*, 168 (2004), 215–221.
- [31] El-Abbassi, A., Kiai, H., Raiti, J., Hafidi, A., Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment, *J. Clean. Prod.* 65 (2014), 432–438.
- [32] Kiai, H., Hafidi, A., Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014), 663–670.

-
- [33] Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A., Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011), 450–457.
- [34] Ryan, D., Robards, K., Lavee, S., Changes in phenolic content of olive during maturation, *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (1999), 265–274.
- [35] Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A., Garrido, A., Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-Style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), 2702–2706.
- [36] Santafé-Moros, A., Gozávez-Zafrilla, J.M., Nano filtration study of the interaction between bicarbonate and nitrate ions, *Desalination*, 250 (2010), 773–777.
- [37] Döepkens, E., Jonas, R., Jung, T., Krull, R., 2001. Rückführung von Abwasserteilströmen der Textilveredlung in den Produktionsprozess. GVC (Hrsg.), Prepr. Colloq. Produktionsintegrierter Wasser Abwassertechnik, “Nachhaltige Prod. der Textilveredlung” und “Membrantechnik”. Bremen B143–B15.
- [38] APHA AWWA WEF, (2005), Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st. ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- [39] Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999), 152–178.
- [40] Ferrer-Polonio, E., García-Quijano, N.T., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Effect of alternating anaerobic and aerobic phases on the performance of a SBR treating effluents with high salinity and phenols concentration, *Biochem. Eng. J.* 113 (2016), 57–65.
- [41] El-Abbassi, A., Khayet, M., Hafidi, A., Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater, *Water Res.* 45 (2011), 4522–4530.
- [42] Parinos, C.S., Stalikas, C.D., Giannopoulos, T.S., Pilidis, G. a., Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007), 339–343.

- [43] Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved, *Food Chem.* 114 (2009), 1380–1385.
- [44] Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts, *Food Chem.* 123 (2010), 741–746.
- [45] Brenes Balbuena, M., Garcia-Garcia, P., Garrido-Fernandez, A., Regeneration of Spanish Style green table olive brines by ultrafiltration, *J. Food Sci.* 53 (1988), 1733–1766.
- [46] Othman, N. Ben, Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., Hamdi, M., Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives, *Food Chem.* 116 (2009), 662–669.
- [47] De Castro, A., Brenes, M., Fermentation of washing waters of spanish-style green olive processing, *Process Biochem.* 36 (2001), 797–802.
- [48] Bouaziz, M., Lassoued, S., Bouallagui, Z., Smaoui, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., Sayadi, S., Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater, *Bioorganic Med. Chem.* 16 (2008), 9238–9246.
- [49] Fendri, I., Chamkha, M., Bouaziz, M., Labat, M., Sayadi, S., Abdelkafi, S., Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization, *Environ. Technol.* 34 (2013), 1–13.
- [50] Field, R.W., Wu, D., Howell, J.A., Gupta, B.B., Critical flux concept for microfiltration fouling, *J. Memb. Sci.* 100 (1995), 259–272.
- [51] Ho, C., Zydney, A., A combined pore blockage and cake filtration model for protein fouling during microfiltration, *J. Colloid Interface Sci.* 232 (2000), 389–399.
- [52] Van Der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Flux decline during nanofiltration of organic components in aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001), 3535–3540.

-
- [53] Corbatón-Báguena, M.J., Vincent-Vela, M.C., Álvarez-Blanco, S., Lora-García, J., Analysis of two ultrafiltration fouling models and estimation of model parameters as a function of operational conditions, *Transp. Porous Media*, 99 (2013), 391–411.
- [54] Carbonell-Alcaina, C., Corbatón-Báguena, M.-J., Álvarez-Blanco, S., Bes-Piá, M.A., Mendoza-Roca, J.A., Pastor-Alcañiz, L., Determination of fouling mechanisms in polymeric ultrafiltration membranes using residual brines from table olive storage wastewaters as feed, *J. Food Eng.* 187 (2016), 14–23.
- [55] Jiratananon, R., Anawat, S., Piyanoot, L., Performance evaluation of nanofiltration membranes for treatment of effluents containing reactive dye and salt, *Desalination*, 130 (2000), 177–183.
- [56] Zuriaga-Agustí, E., Alventosa-deLara, E., Barredo-Damas, S., Alcaina-Miranda, M.I., Iborra-Clar, M.I., Mendoza-Roca, J.A., Performance of ceramic ultrafiltration membranes and fouling behavior of a dye-polysaccharide binary system, *Water Res.* 54 (2014), 199–210.
- [57] Koyuncu, I., Topacik, D., Wiesner, M.R., Factors influencing flux decline during nanofiltration of solutions containing dyes and salts, *Water Res.* 38 (2004), 432–440.
- [58] Wiesner, M.R., Chellam, S., Mass transport considerations for pressure-driven membrane processes, *J. Am. Water Work. Assoc.* 84 (1992), 88–95.
- [59] Cadotte, J., Forester, R., Kim, M., Petersen, R., Stocker, T., Nanofiltration membranes broaden the use of membrane separation technology, *Desalination*, 70 (1988), 77–88.
- [60] Majewska-Nowak, K., Kabsch-Korbutowicz, M., Winnicki, T., Salt effect on the dye separation by hydrophilic membranes, *Desalination*, 108 (1996), 221–229.
- [61] Zio, A. Di, Prisciandaro, M., Barba, D., Disinfection of surface waters with UF membranes, *Desalination*, 179 (2005), 297–305.
- [62] Rojas, J.C., Moreno, B., Garral, G., Potabilization of low NOM reservoir water by ultrafiltration spiral wound membranes, *J. Hazard. Mater.* 158 (2008), 593–598.

- [63] Panagou, E.Z., Katsaboxakis, C.Z., Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. *Food Microbiol.* 23 (2006), 199–204.

VI.4. COSTES DE OPERACIÓN

En esta sección se va a realizar una estimación de los costes de operación necesarios para llevar a cabo el tratamiento integrado planteado. Este tratamiento va a tener en cuenta la propuesta plasmada en la sección VI.3.1, donde se combinó el tratamiento biológico de las FTOP con membranas de UF y NF, y además, la posibilidad de realizar un pretratamiento de las FTOP anterior al biológico. Dada la complejidad y la cantidad de elementos a tener en cuenta, la estimación realizada debe tomarse como una aproximación a la situación real.

En primer lugar se debe establecer un volumen de FTOP medio a tratar por día y para ello se han recopilado datos de la zona de España donde hay una mayor producción. Según la Agencia para el Aceite de Oliva (agencia pública adscrita al Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente), el 75,63% de la producción de aceitunas de mesa, en la campaña 2008/2009, se produjo en Sevilla, lo cual supuso una cantidad aproximada de 299.500 toneladas de aceitunas. En la Tabla VI.31 se presentan las cantidades producidas por algunas empresas envasadoras de la zona.

Tabla VI.31. Producción de aceitunas de mesa en Sevilla (campaña 2008/2009).

Empresa	Toneladas
Agrosevilla Aceitunas, S.C.A.	48.862
Ángel Camacho Alimentación, S.L.	36.815
Aceitunas Guadalquivir, S.L.	28.525
Hojiblanca, S.C.A.	24.590
Internacional Olivarera, S.A.	13.286
ACYCO. Aceitunas y Conservas, S.L.A.	12.446
La Española Alimentaria Alcoyana, S.A.	8.667
Euroлива, S.A.	8.593
Osuna Mission, S.L.	8.419
Agroaceitunera, S.A.	7.750

En los datos presentados queda incluido aproximadamente el 66% del total de aceitunas producidas en Sevilla en el periodo considerado, por lo que estas cantidades son representativas de la situación real, observándose una variación importante de unas empresas a otras. El valor medio para estos datos es de 19.795 ± 14.353 toneladas al año, por lo que los costes se van a evaluar para una producción media de 20.000 toneladas al año.

Por otro lado, según Kopsidas [1] se la generación de agua residual por cada tonelada de aceituna procesada se encuentra entre 3,9 y 7,5 m³, de los cuales aproximadamente el 20% corresponde a las salmueras de fermentación. Ello comporta un volumen de FTOP entre 0,8 y 1,5 m³ por cada tonelada de aceituna obtenida y una generación de FTOP al día, para la producción media establecida, entre 44 y 82 m³. Para el cálculo de los costes se va a sobredimensionar la instalación para tratar 120 m³ al día, lo que permitiría absorber aumentos en la producción y/o la gestión de las FTOP de empresas cercanas.

El esquema representativo del proceso integrado para el tratamiento de las FTOP se puede observar en la Figure VI.53. Los costes asociados a este proceso se van a desglosar en las tres líneas de tratamiento principales: pretratamiento (área rosada), tratamiento biológico (área verde) y tratamiento terciario (área morada).

Pretratamiento

El pretratamiento de las FTOP se ha presentado en las secciones VI.1.1 y VI.1.2, donde se han discutido los resultados obtenidos de la adsorción con CAP y con resinas, respectivamente. Este pretratamiento estará en función de la corriente a tratar, ya que tal y como se ha visto a lo largo de la experimentación, las características de las FTOP pueden variar mucho.

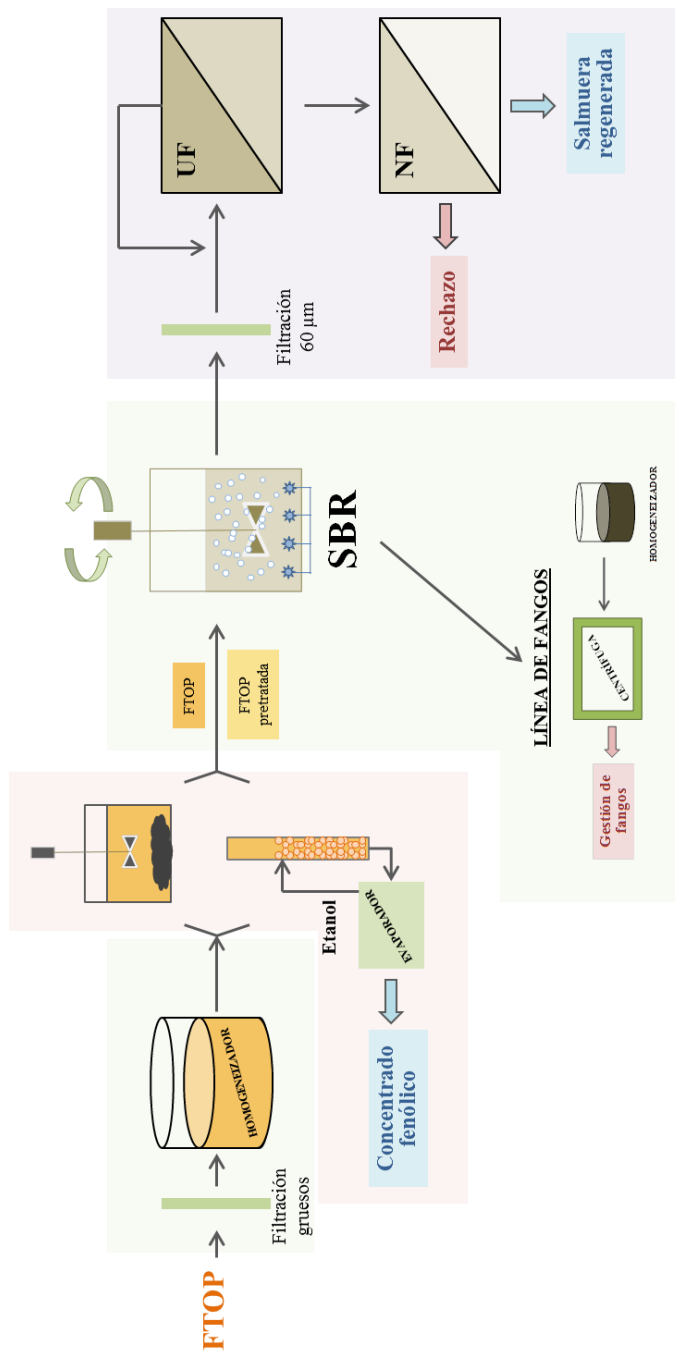


Figure VI.53. Esquema del tratamiento integral para las FTOP.

Por ello, se han realizado los cálculos para una FTOP con una concentración inicial de fenoles totales de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ que será reducida hasta $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los costes sólo van a incluir la parte correspondiente al consumo de reactivos, bien el carbón activo en polvo BM8 o la resina MN200. No se van a tener en cuenta los posibles beneficios que se obtendrían de la valorización de los compuestos fenólicos recuperados al utilizar resinas, ya que es muy complicado hacer una estimación de los mismos.

A partir de las isotermas obtenidas para cada adsorbente, se ha calculado la cantidad de carbón y resina necesarios para reducir la concentración de fenoles totales en $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Teniendo en cuenta que el precio del BM8 es 1,66 € por kg y el de la resina MN200 es 45,00 € por kg (datos aproximados suministrados por los proveedores para pedidos a nivel industrial), los costes calculados se presentan en la Tabla VI.32.

Tabla VI.32. Costes asociados al pretratamiento de las FTOP para reducir los fenoles totales desde $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

	Adsorbente necesario ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Usos	Costes del tratamiento ($\text{€}\cdot\text{m}^{-3}$)
Carbón: BM8	3,80	1	6,0800
Resina: MN200	11,23	10	0,5054^(*)

* El coste para un uso sería de $505,35 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$. Sin embargo, en la experimentación realizada, se demostró que la resina MN200 se puede regenerar al menos 10 veces. La regeneración de la resina lleva consigo un consumo de etanol, que no se ha calculado. No obstante, puesto que ello también reportaría beneficios por la valorización de los fenoles recuperados, éstos como mínimo compensarían el coste del etanol.

Tratamiento biológico

La evaluación de los costes asociados al tratamiento biológico se ha realizado a partir de los datos suministrados por una ingeniería cuya principal área de actividad es el diseño, construcción y operación de depuradoras de aguas residuales industriales. En concreto, los datos suministrados fueron los de una instalación que trataba el agua residual de una empresa agroalimentaria, cuyo tiempo de retención hidráulico en el reactor era del mismo orden de magnitud que el propuesto en esta Tesis Doctoral para la FTOP. El tratamiento para este efluente residual estaba compuesto por los siguientes elementos: pozo de bombeo, tamizado, homogeneizador, tratamiento físico-químico con coagulantes, reactor biológico, clarificador final por flotación y por último el tratamiento de la línea de fango, formada por un homogeneizador y la deshidratación mediante centrifugación. El caudal tratado era de 120 m³ al día, con una DQO y SS de entrada de 20.000 mg·L⁻¹ y 6000 mg·L⁻¹, respectivamente. A la salida estos parámetros se redujeron hasta 125 mg·L⁻¹ y 35 mg·L⁻¹.

A pesar de las diferentes características entre las FTOP y el agua residual comentada, los elementos que componen la línea del tratamiento biológico son muy similares a los propuestos para las FTOP, por lo que se van a asumir que los costes de electricidad, personal y asistencia técnica serán muy similares. Por otro lado, aunque cabría esperar unos gastos para la línea de fangos (reactivos y gestión) inferiores, debido a que la producción de fango en el tratamiento de las FTOP es muy bajo, se han mantenido los mismos valores correspondientes al tratamiento tomado como modelo. Por último, se han calculado los costes asociados a los reactivos utilizados como nutrientes. Para ello se han obtenido las cantidades de nitrógeno y fósforo consumidas durante el periodo experimental llevado a cabo con la FTOP más deficitaria en los mismos.

En la Tabla VI.33 se presentan los costes estimados para el proceso de tratamiento biológico.

Tabla VI.33. Costes asociados a la línea del tratamiento biológico de las FTOP.

Concepto	Costes del tratamiento (€·m⁻³)
Electricidad (*)	1,4235
Reactivos nutrientes para biológico (**)	0,0034
Reactivos línea de fangos	0,2886
Gestión fangos	1,2440
Asistencia técnica	0,5199
Coste personal	1,2360
Coste línea tratamiento biológico	4,7154

* Se supone un coste de 0,105 €/kWh para un consumo estimado de 13,56 kWh/m³.

** La máxima cantidad añadida por m³ de FTOP fueron: 2,80 g de urea (0,95 € por kg de urea) y 0,67 g de K₂HPO₄ (1,17 € por kg de K₂HPO₄).

Los costes de la línea de tratamiento biológico para las FTOP son mucho más elevados que los asociados al tratamiento de un agua residual urbana en una EDARU, el cual estaría entorno a 0,31 € por cada m³ tratado (ANEXO II). Esto es debido principalmente al volumen tratado al día, que encarece los gastos a medida que se reduce. En el ANEXO II se adjunta una tabla suministrada por la empresa Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM) en la que se observa el coste de depuración de diferentes EDARU en función del volumen tratado. En esta tabla se ha omitido la ubicación de las depuradoras para cumplir con el sistema de protección de datos. De esta forma se observa en esta tabla que para un caudal aproximado de 1000 y 31.700 m³/día el coste varía de 0,4975 a 0,1324 €/m³. En nuestro caso hemos planteado un caudal de 120 m³/día por lo que el coste calculado parece razonable.

Tratamiento terciario

Según Samhaber et al. [1], la reposición de membranas es la parte más costosa en este tipo de tratamientos. Es por ello que en su trabajo correlacionaron los gastos fijos y variables de la operación de nanofiltración, con el parámetro CRM (coste de reemplazamiento de membranas), los cuales se pueden ver en la Tabla VI.34.

Tabla VI.34. Compilación de costes asociados al tratamiento de nanofiltración en relación al coste de reemplazamiento de membranas (CRM).

Costes fijos	Amortización	$2,55 \times \text{CRM}$
	Mantenimiento (20% amortización)	$0,50 \times \text{CRM}$
	Total costes fijos	$3,05 \times \text{CRM}$
Costes variables	Coste membranas	$1,00 \times \text{CRM}$
	Costes energía	$0,50 \times \text{CRM}$
	Costes limpieza	$0,25 \times \text{CRM}$
	Costes personal	$2,00 \times \text{CRM}$
	Total costes variables	$3,75 \times \text{CRM}$
Total costes operativos		$6,80 \times \text{CRM}$

A partir de estos datos se ha calculado el coste del tratamiento terciario aplicado al efluente de salida del reactor biológico. Se ha tenido en cuenta un coste de reemplazamiento de membranas para la operación de UF (CRM_{UF}) y otro para la de NF (CRM_{NF}). Para obtener los CRM correspondientes se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones:

- Volumen a tratar; $120 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para la UF y la NF, aun sabiendo que el volumen en la NF será inferior.
- Densidad de flujo de permeado de las membranas, calculada a partir de los datos en el estacionario presentados en la sección VI.3.1.3:
 - UF a 3 bar $\rightarrow 16,6 \text{ (L} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$

- NF a 15 bar → 20.5 (L·m²·h⁻¹)

En estos datos llama la atención la pequeña densidad de flujo de permeado en la UF. Sin embargo, cabe recordar que la membrana utilizada fue de 5 kDa y que la turbidez del efluente fue elevada, lo que provocó un ensuciamiento por formación de torta en la membrana que redujo el flujo de permeado en más de un 50% respecto a la densidad de flujo inicial.

- Tiempo operativo; 8 horas/día. Para trabajar de esta manera, será necesario disponer de un tanque para almacenar el efluente de salida de biológico. Este método operativo daría una mayor flexibilidad a la operación con membranas, en el caso de tener problemas en el biológico.
- Capacidad operativa;
 - UF → 0,133 (m³·m²·d⁻¹)
 - NF → 0,164 (m³·m²·d⁻¹)
- Superficie de membrana estimada para tratar los 120 m³·d⁻¹; 21 m² para la UF y 23 m² para la de NF.
- Se supone una vida útil de 2 años para las membranas. El precio aproximado es de 187 €·m⁻² para la UF (UP005 de Microdyn-Nadir) y 140 €·m⁻² para la NF (NF245 de DOW). Cabe decir que estos precios están muy por encima del valor real, ya que son precios para pedidos de laboratorio.

A partir de las consideraciones hechas y suponiendo que se trabaja durante los 365 días del año (43.800 m³·año⁻¹), se calcula el CRM para cada operación:

$$\text{CRM}_{\text{UF}} = \frac{21 \text{ (m}^2\text{)} \cdot 187 \text{ (€} \cdot \text{m}^{-2}\text{)}}{2 \text{ (año)} \cdot 43800 \text{ (m}^3 \cdot \text{año)}} = 0.0448 \quad \text{Eq.(VI.25)}$$

$$CRM_{NF} = \frac{23 \text{ (m}^2\text{)} \cdot 140 \text{ (€} \cdot \text{m}^{-2}\text{)}}{2 \text{ (año)} \cdot 43800 \text{ (m}^3 \cdot \text{año)}} = 0.0368 \quad \text{Eq.(VI.26)}$$

Los costes asociados a la línea de tratamiento terciario se pueden ver en la Tabla VI.35.

Tabla VI.35. Costes asociados a la línea de tratamiento terciario de las FTOP.

CRM _{UF} = 0.0448 €·m ⁻³ CRM _{NF} = 0.0368 €·m ⁻³	Costes del tratamiento (€·m ⁻³)		
	UF	NF	Total
Costes fijos	0,1366	0,1122	0,4977
Costes variables	0,1680	0,1380	0,6120
Costes línea tratamiento terciario	0,3046	0,2502	0.5548

Costes totales

Teniendo en cuenta los tres factores calculados y eligiendo un pretratamiento con la resina MN200, se obtiene un coste de operación para el tratamiento integrado de las FTOP de 5.7756 € por cada m³. Para saber si este precio es competitivo, se va a comparar con los gastos de gestión que tendrían estas salmueras en una EDARU.

Depuración de Aguas del Mediterraneo explota en la comunidad Valenciana unadepuradora que trata un gran volumen de aguas residuales urbanas (31.700 m³ al día). Dadas estas características, esta EDAR es capaz de asumir la gestión de las FTOPs generadas en una planta envasadora cercana. Según los datos aportados por DAM, los costes de transporte pueden estar entre 8 y 15 € por cada tonelada de FTOP transportada y los gastos de gestión entre 15 y 80 €

por tonelada. Por lo tanto, asumiendo un coste medio de gestión externa de las FTOP en una EDAR de 40 € por cada m³ (suponiendo una densidad del agua residual de 1 g·L⁻¹), el tratamiento integral planteado en esta Tesis Doctoral sería viable desde el punto de vista económico, una vez se realizara la inversión pertinentes para la construcción de la planta de tratamiento.

Referencias

- [1] W.M. Samhaber, M.T. Nguyen, Applicability and costs of nanofiltration in combination with photocatalysis for the treatment of dye house effluents, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5 (2014), 476–484.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

VII.1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	477
VII.1.1. Caracterización del agua residual	477
VII.1.2. Pretratamientos	477
VII.1.3. Tratamiento biológico	480
VII.1.4. Tratamiento terciario	482
VII.1.5. Estudio económico	482
VII.2. CONCLUSIONES FINALES	483

VII.1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral se han dividido en cuatro secciones, a partir de las cuales se va a evaluar el cumplimiento de los cuatro objetivos específicos marcados en el Capítulo I. A partir de esta información se podrán realizar las conclusiones finales con respecto al objetivo principal marcado en este trabajo de investigación.

VII.1.1. Caracterización del agua residual

- Las FTOP son efluentes ácidos con un pH medio de $4,1 \pm 0,2$
- El contenido en NaCl es muy elevado, siendo la conductividad de las muestras utilizadas $82,4 \pm 9,7 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$
- Se trata de aguas residuales con elevada turbidez ($398,3 \pm 199,2 \text{ NTU}$) en las que el contenido en sólidos suspendidos fue $1814 \pm 1278 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Aproximadamente el 20% de los SS son no volátiles.
- La materia orgánica se midió a través de la DQO, obteniendo un valor medio de $13,58 \pm 5,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentración de compuestos fenólicos estuvo en $891,6 \pm 304,3 \text{ mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$.
- La proporción de nutrientes en las FTOP se valoró a partir de las concentraciones de nitrógeno y fósforo, con unos resultados medios de $275,5 \pm 115,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $46,8 \pm 37,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

VII.1.2. Pretratamientos

- **Ajuste de pH y posterior sedimentación:**
 - El óptimo se estableció para un pH = 9, obteniendo porcentajes de eliminación del 82,5% y del 33,1% en la turbidez y SS, respectivamente. La pequeña mejora en el rendimiento obtenida a valores de pH más elevados, no justificaría el consumo adicional de reactivos (NaOH).

- La eliminación de DQO fue despreciable a valores de pH entre 2 y 11.
 - A valores de pH por encima de 8 se redujo la concentración de compuestos fenólicos, con un máximo de 38,9% para pH = 11. Esta disminución fue debida a la oxidación de los fenoles en o-quinonas en condiciones alcalinas.
- **Coagulación-Floculación, con y sin ajuste de pH, y posterior sedimentación:**
- El mejor par coagulante-floculante fue el GT-25/ZW-332. La selección se realizó en base al porcentaje de reducción de turbidez y a aspectos medioambientales (el GT-25 es de origen vegetal).
 - Las concentraciones óptimas del GT-25 y ZW-332 fueron $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.
 - Sin ajuste de pH se obtuvo una reducción de turbidez y SS muy baja, con valores del 40,5% y 13,0%, respectivamente. Con ajuste de pH el óptimo fue a pH = 9, con una reducción del 97,2% y 35,0% en la turbidez y SS, respectivamente. Comparando este resultado con el obtenido sin adición de coagulantes-floculantes, no se justifica el consumo de estos reactivos.
 - La eliminación de DQO fue despreciable con y sin modificación del pH.
 - La eliminación de fenoles aumentó a partir de pH = 8. El máximo también se alcanzó a pH = 11, con un 51.9% de reducción.
- **Adsorción con carbón activo en polvo:**
- El mejor CAP, al pH original de las FTOP, fue el BM-8.
 - El tiempo de equilibrio de adsorción, para concentraciones de BM-8 entre $2 \text{ y } 8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el rango de concentración de fenoles de las FTOP, se estableció en 60 minutos.

- El proceso de adsorción se correlacionó con la isoterma de Langmuir, con un R^2 de 0,9954 para un rango entre 1 y 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CAP. La máxima capacidad de adsorción (q_0) se estableció en 175,4 mg TY por gramo de BM-8.

– **Recuperación de compuestos fenólicos:**

- La mejor resina polimérica, al pH original de la muestra, fue la MN200.
- Adsorción;
 - a) El tiempo de equilibrio de adsorción varió entre 90 y 60 minutos para concentraciones de MN200 de 20 a 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, dentro del rango de concentración de fenoles de las FTOP.
 - b) El proceso de adsorción se correlacionó con la isoterma de Langmuir con un R^2 por encima de 0,99 en todos los casos. La máxima capacidad de adsorción se relacionó con la concentración inicial de fenoles, obteniéndose una q_0 aproximada de 80 $\text{mg TY}\cdot\text{g}^{-1}$ para concentraciones cercanas a 1000 $\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$ y de 118 $\text{mg TY}\cdot\text{g}^{-1}$ para unos 750 $\text{mg TY}\cdot\text{L}^{-1}$. No se apreció influencia del pretratamiento de UF y UF+NF.
 - c) La cinética de adsorción fue de pseudo-segundo orden, obteniendo un R^2 por encima de 0,99 en todos los casos. El mecanismo de adsorción no estuvo controlado únicamente por la difusión de los fenoles en la resina, observándose en los primeros minutos una resistencia externa a la transferencia de masa.
 - d) La concentración de fenoles, respecto al total de la materia orgánica adsorbida, aumentó conforme al grado del pretratamiento aplicado: sin pretratar sobre el 45%, con UF alrededor del 60% y con la UF+NF hasta un 79%. Es por tanto lógico pensar que el concentrado fenólico recuperado tendrá menos impurezas en muestras con UF+NF previa.

- Desorción;
 - a) Se seleccionó el etanol como desorbente por dos motivos; su elevado porcentaje de recuperación de fenoles y su menor toxicidad y precio frente al acetato de etilo.
 - b) El tiempo de equilibrio en la desorción se estableció en 15 minutos, independientemente de la cantidad de MN200 utilizada.
 - c) En las muestras sin pretratar o tratadas con UF se recuperó entre el 71% y el 77% de los fenoles adsorbidos, mientras que en las muestras con UF+NF aumentó hasta el 85%.
- Vida útil de la resina;
 - a) La pérdida de eficiencia en la adsorción de compuestos fenólicos fue menor que en la desorción, tras diez ciclos de operación.
 - b) La vida útil de la resina aumentó con la intensidad del pretratamiento aplicado a la FTOP. Se perdió un 12,1%, 8,5% y 4,5% de la eficiencia en la desorción en muestras sin pretratar, UF y UF+NF, respectivamente.

VII.1.3. Tratamiento biológico

– Puesta en marcha:

- La adaptación conjunta de la biomasa a la conductividad y presencia de compuestos fenólicos resultó más eficiente que la preadaptación a la salinidad.
- Para un TRH de 40 días y 108 días de adaptación, se consiguió una eliminación de DQO y fenoles totales del 88% y 98%, respectivamente.
- La población de *Proteobacterias* fue aumentando con la conductividad del medio, hasta un 42% al final de la puesta en marcha para $93 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La bacteria halotolerante identificada mediante la técnica FISH, fue la *Salinicola sp*, perteneciente a la clase γ -*Proteobacterias*.

- Se produjo una mineralización del fango activo, pasando de 0,8 a 0,6 la relación SSVLM/SSLM. Esto fue debido a la acumulación de compuestos inorgánicos en el floculo y a la elevada edad del fango.

– **Optimización del proceso:**

- La relación óptima de nutrientes en las FTOP se estableció en base a la proporción de DQO:Nitrógeno:Fósforo en la cantidad 250:5:1.
- El valor óptimo del parámetro F/M estuvo en torno a 0,14 kg DQO·kg SSVLM⁻¹·d⁻¹.
- El pretratamiento con adsorción de las FTOP permitió reducir la materia orgánica inicial (incluidos los compuestos fenólicos), con la finalidad de disminuir el TRH, sin disminuir el rendimiento del sistema.
- El aumento de temperatura del licor de mezcla, hasta 30°C, redujo el rendimiento de eliminación de DQO y fenoles, debido a un incremento en la conductividad del medio y a una mayor mineralización del floculo.
- Las bacterias dominantes fueron las *Proteobacterias*, en concreto la clase γ -*Proteobacterias*, cuya población se estabilizó en un 74%.
- Se identificaron dos tipos de ciliados, *Pseudocohnilembus persalinus* y *Chilomastix*. El primero se encontró durante todo el periodo experimental y el segundo apareció y desapareció en función de las condiciones de operación.
- El tratamiento de las FTOP permitió la alternancia de fases anaerobias y aerobias durante la reacción. Se demostró que una relación de 8/14 en el

tiempo anaerobio/aerobio, conllevaría un ahorro energético en los costes asociado a la aireación, sin perjuicio del rendimiento del reactor.

VII.1.4. Tratamiento terciario

- El tratamiento terciario formado por membranas de ultrafiltración y nanofiltración dispuestas en serie, consiguió eliminar completamente la turbidez, el color y los compuestos fenólicos del efluente de salida del sistema biológico y reducir a valores próximos a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ la DQO final.
- La concentración salina se mantuvo en los niveles de las salmueras frescas, con una ligera reducción de la conductividad del permeado de la NF con respecto a la FTOP de origen.
- El ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración utilizadas fue reversible.
- El ensuciamiento de las membranas de nanofiltración fue despreciable bajo las condiciones ensayadas.

VII.1.5. Estudio económico

La evaluación de los costes realizada al tratamiento integral propuesto, arroja un valor de 5,78 € por cada m^3 de agua tratada. Al comparar este valor con el coste que tiene la gestión de este residuo a través de una EDARU, el cual estaría en torno a 40 €/m³, se puede concluir que la opción de tratamiento planteada es viable desde punto de vista económico.

VII.2. CONCLUSIONES FINALES

Tras el análisis de los puntos anteriores se puede concluir que es posible, desde el punto de vista técnico, el tratamiento biológico directo de las salmueras agotadas procedentes de la fermentación láctica y del envasado de las aceitunas verdes de mesa al “*Estilo Español*”. Se ha optimizado el tratamiento biológico estableciendo los valores de ciertos parámetros operacionales como la carga másica, la relación de nitrógeno y fósforo respecto a la DQO de la FTOP tratada y la temperatura del sistema. Con ello se han alcanzado rendimientos de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos por encima del 80% y del 70%, respectivamente. En cuanto a la biomasa adaptada a estas salmueras, cabe decir que estuvo compuesta en un 74% por bacterias de la clase de las γ -*Proteobacterias*, de las que se pudo aislar la bacteria *Salinicola sp.* Por otro lado fueron identificados dos tipos de ciliados, *Pseudocohnilembus persalinus* y *Chilomastix*, encontrándose este último de forma intermitente durante la experimentación. Otra medidas adoptadas para optimizar el tratamiento biológico y reducir el TRH, fue aplicar un pretratamiento de adsorción a las FTOP con el carbón activo en polvo BM8 o con la resina MN200. Este pretratamiento además ayudaría a mantener las condiciones de entrada al sistema biológico, ajustando la cantidad de adsorbente en función de las características iniciales de la FTOP. Por otro lado, se demostró que una relación de 8/14 en el tiempo de reacción anaerobio/aerobio, podía reducir los costos de energía necesarios manteniendo el rendimiento del tratamiento biológico. Para el tratamiento terciario planteado se concluye que la disposición en serie de membranas de UF y NF permite eliminar gran parte de la materia orgánica recalcitrante que permanece en el efluente tras el tratamiento biológico, permitiendo su reutilización dentro del sistema productivo. El análisis de los costes asociados a la operación descrita resultaron muy competitivos frente otras opciones como la gestión de estas salmueras en una EDARU.

ANEXO I

ÁRBOL FILOGENÉTICO



La secuencia resaltada en amarillo corresponde a la bacteria aislada obtenida del licor de mezcla del tratamiento biológico llevado a cabo con

las FTOP. Esta bacteria fue cultivada en un medio salino con $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl.

También se presenta en este anexo la secuencia final del gen 16S rRNA de la bacteria aislada, una vez depurada.

```
TGCAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCT
GCCCGGTAGTGGGGGATAACGTGGGGAAACCCACGCTAATACCCGCATACGTCCCTACGGGAGAAAGCGGGGATCT
TCGGACTTCGCGCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGAT
CCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAG
CACTTTCAGCGAGGAAGAAAGCCTCTGGGTTAATACCCAGAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
GGTGGCTTGGCACGCCGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGGCCAGGCTAGAGTG
CAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCG
GCCTTCTGGCCTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGACCTTTAAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATCCAGAGAAGTTGGCAGAGATGCCTTCGTGCCTTCG
GGAACCTTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGC
GCAACCCTTGTCCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGTT
TGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAGAAAGCCGGCCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTTG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCGT
CACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCTTAACCTTCGGGAGAGCGATCA
```

Esta secuencia se comparó con los datos del Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

ANEXO II

COSTES DEL TRATAMIENTO DE UN AGUA RESIDUAL URBANA

Tabla Anexo II. Costes de variables (energía, reactivos, residuos y fangos) y costes fijos (personal,...) de depuración de agua residual urbana en diferentes EDAR de la Comunidad Valenciana.

EDAR	Cogeneración	Volumen (m³·d⁻¹)	Coste (€·m⁻³)
1	x	35.824	0,1724
2	x	13.837	0,2527
3		8.339	0,2716
4		11.497	0,2442
5	x	25.546	0,1380
6		6.510	0,2808
7		13.212	0,2107
8		6.974	0,3887
9		3.315	0,5411
10		2.421	0,6118
11		10.014	0,2410
12		4.586	0,4351
13	x	31.702	0,1324
14	x	4.197	0,4151
15	x	19.421	0,2112
16		2.024	0,3706
17		1.017	0,4975
18		1.088	0,3063
19		5.561	0,2882
20		5.138	0,3270
Promedio		10.611	0,3168

