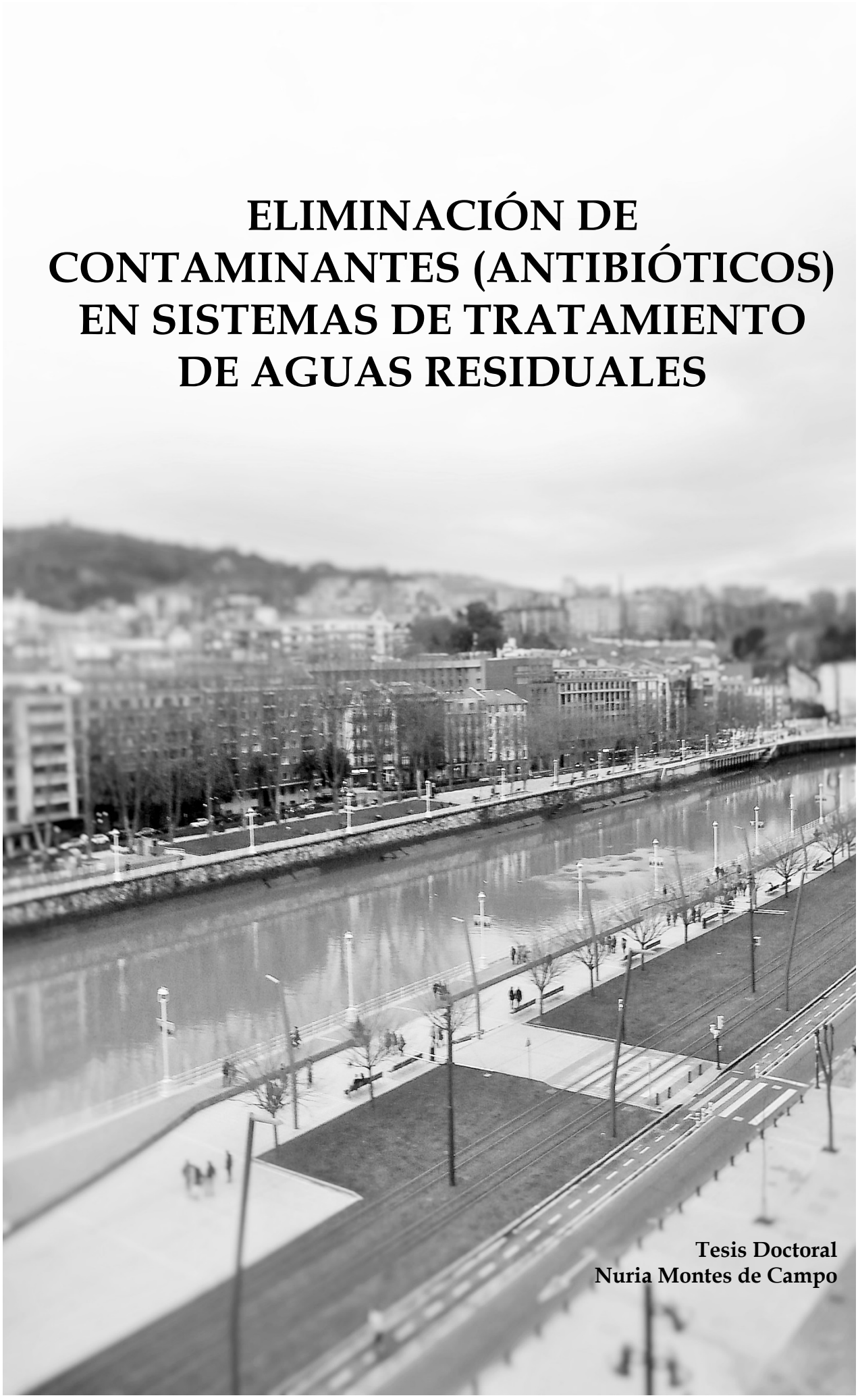
ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES (ANTIBIÓTICOS) EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES



Tesis Doctoral
Nuria Montes de Campo

UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Memoria presentada p*ara optar al grado de Doctor por la Universidad de León*

"Eliminación de contaminantes (antibióticos) en sistemas de tratamiento de aguas residuales"

Nuria Montes de Campo

Dirigida por el Catedrático Javier Martín Villacorta y la Profesora Titular Rosa Méndez Soto.

Departamento: *Química y Física Aplicadas.*

Área de conocimiento: *Química-Física.*

Programa de Doctorado: *Ecología y Tecnología Ambiental.*

Título en inglés: "Elimination of pollutants (antibiotics) in wastewater treatment plants".

León, 23 de Noviembre de 2015

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, Javier Martín Villacorta y Rosa Méndez Soto toda la ayuda, enseñanzas y apoyo incondicional que me han brindado para la realización de este trabajo.

A la Junta de Castilla y León por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador, cofinanciada por la Consejería de Educación y el Fondo Social Europeo.

A Eloy Bécares por facilitarme las muestras de purines y especialmente por su asesoramiento en la parte "biológica" del trabajo.

A Juan Carlos García, por su ayuda y soporte técnico en los ensayos cromatográficos.

A Juan Manuel Lema y Francisco Omil por permitirme realizar una estancia en el grupo de investigación de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos en la Universidad de Santiago de Compostela, y a todo su equipo de investigación por su excelente acogida y ayuda.

A la Estación Depuradora de Aguas de León y su alfoz por su colaboración, por facilitarme todos los datos necesarios y permitirme el acceso a las instalaciones para realizar los estudios.

A los gestores de las plantas de tratamiento de purines de Hornillos y Turégano por permitir los muestreos y análisis de las muestras recogidas.

A Marta Otero Cabero por su ayuda en la última etapa de este trabajo.

A Luis y Alex por su apoyo y sus consejos.

Finalmente a mi marido, mi madre, mi hermano y mis amigos, por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos.

Gracias a todos.

Índice

ABREVIATURAS ..... **vi**

RESUMEN ..... **viii**

1. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS **1**

1.1. **Objetivos** **2**

1.2. **Estructura de la Tesis** 4

2. INTRODUCCIÓN **7**

2.1. **Aguas residuales** **8**

2.2. **Estaciones de tratamiento de aguas residuales** **11**

2.2.1. EDAR de León y su alfoz 14

2.3. **Tratamiento secundario** **19**

2.3.1. Sistemas de lodos activados 20

2.3.1.1. Origen y descripción 20

2.3.1.2. Fundamento 21

2.3.1.3. Mecanismos de eliminación de contaminantes 24

2.3.1.4. Evolución de la tecnología 25

2.3.1.5. Factores y parámetros de control 26

2.3.1.6. Potenciales problemas asociados al proceso 27

2.4. **Contaminantes emergentes en aguas residuales** **30**

2.4.1. Compuestos farmacéuticos 31

2.4.1.1. Ocurrencia, vías de exposición y efectos 32

2.4.1.2. Eliminación en sistemas de tratamiento 36

2.5. **Antibióticos** **39**

2.5.1. Ocurrencia y vías de exposición 40

2.5.2. Eliminación en sistemas de tratamiento 42

2.5.3. Potenciales efectos: resistencia bacteriana 42

2.6. **Contaminantes seleccionados en el estudio** **43**

2.6.1. Tetraciclinas 43

2.6.2. Tilosina 44

2.6.3. Amoxicilina 45

3. MATERIALES Y MÉTODOS **46**
3.1. Reactivos y patrones generales **47**
3.2. Sistemas de tratamiento a escala de laboratorio **48**
3.2.1. Diseño 48
3.2.2. Agua residual sintética 50
3.2.3. Lodo activo 52
3.3. Control de parámetros físico-químicos **53**
3.3.1. Velocidad de sedimentación e índice volumétrico 53
3.3.2. Temperatura y pH 54
3.3.3. Oxígeno 55
3.3.4. Sólidos en suspensión 55
3.3.5. Carbono Orgánico Total 55
3.3.6. Demanda Química de Oxígeno 56
3.3.7. Demanda Biológica de Oxígeno 58
3.3.8. Nitrógeno 59
3.4. Caracterización de la biomasa **61**
3.4.1. Actividad aerobia heterótrofa 62
3.4.2. Actividad nitrificante 65
3.4.3. Actividad desnitrificante 67
3.4.4. Ensayos de inhibición de la actividad 69
3.4.5. Cultivos en placa 69
3.4.6. Seguimiento de microfauna 71
3.5. Determinación de iones metálicos **72**
4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS (HPLC) **74**
4.1. Introducción **75**
4.2. Equipos, reactivos, patrones y materiales **76**
4.3. Propiedades físico-químicas de los antibióticos objeto de estudio **79**
4.3.1. Tetraciclinas 79
4.3.2. Tilosina 81
4.3.3. Amoxicilina 82

4.4. Optimización de los métodos y discusión **82**
4.4.1. Tetraciclinas 84
4.4.1.1. Optimización de la separación cromatográfica 85
4.4.1.2. Optimización del tratamiento previo de las muestras 90
4.4.2. Tilosina 92
4.4.2.1. Optimización de la separación cromatográfica 93
4.4.2.2. Optimización del tratamiento previo de las muestras 97
4.4.3. Amoxicilina 98
4.4.3.1. Optimización de la separación cromatográfica 98
4.4.3.2. Optimización del tratamiento previo de las muestras 101
4.5. Validación analítica de los métodos **102**
4.5.1. Tetraciclinas 102
4.5.1.1. Selectividad 103
4.5.1.2. Linealidad 103
4.5.1.3. Precisión y exactitud 106
4.5.1.4. Límite de detección y cuantificación 107
4.5.1.5. Estabilidad de las disoluciones 107
4.5.1.6. Robustez 108
4.5.2. Tilosina 109
4.5.2.1. Selectividad 109
4.5.2.2. Linealidad 110
4.5.2.3. Precisión y exactitud 112
4.5.2.4. Límite de detección y cuantificación 113
4.5.2.5. Estabilidad de las disoluciones 113
4.5.2.6. Robustez 114
4.5.3. Amoxicilina 114
4.5.3.1. Selectividad 115
4.5.3.2. Linealidad 115
4.5.3.3. Precisión y exactitud 117
4.5.3.4. Límite de detección y cuantificación 118
4.5.3.5. Estabilidad de las disoluciones 118
4.5.3.6. Robustez 119
4.6. Publicaciones **119**

5. ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN SISTEMAS DE LODOS ACTIVADOS (INFLUENCIA DEL TRH Y CARGA MÁSICA) **121**

5.1. Introducción **122**

5.2. Modelización de un sistema de lodos activados a escala de laboratorio **122**

5.2.1. Plantas piloto con distinto tiempo de retención hidráulico 123

5.2.2. Plantas piloto con distinta carga másica 125

5.2.3. Agua residual sintética 126

5.2.3.1. Plantas con distinto TRH 126

5.2.3.2. Plantas con distinta carga másica 128

5.2.4. Aplicación de los antibióticos a las plantas piloto 130

5.3. Resultados **134**

5.3.1. Ensayos de respitometría en lodos ativados 134

5.3.2 Parámetros físico-químicos 135

5.3.3. Rendimientos en la eliminación de materia orgánica 142

5.3.4. Rendimiento en la eliminación de antibióticos 144

5.3.5. Evolución de la microfauna asociada al proceso 147

5.3.6. Resistencia bacteriana 149

5.4. Iones metálicos **151**

5.5. Discusión **154**

5.6. Publicaciones **157**

6. INFLUENCIA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DOMINANTES EN LA ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS **158**

6.1. Introducción **159**

6.2. Plantas piloto a escala de laboratorio **160**

6.2.1. Reactor con actividad heterótrofa anaerobia 162

6.2.2. Reactor con actividad autótrofa aerobia 163

6.2.3. Reactor con actividad heterótrofa aerobia 163

6.2.4. Agua residual sintética 163

6.2.5. Aplicación de los antibióticos a las plantas piloto 164

6.3. Resultados **166**

6.3.1. Inhibición de la actividad bacteriana 166

6.3.2. Parámetros físico-químicos 166

6.3.3. Rendimientos de depuración 172

6.3.4. Rendimiento en la eliminación de antibióticos 172

6.4. Discusión **173**
6.5. Publicaciones **175**
7. ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE PURINES ... **176**
7.1. Introducción **177**
7.2. Plantas de tratamiento de purines **181**
7.2.1. Purín 183
7.2.2. Toma de muestras 183
7.3. Resultados 184
7.3.1. Rendimientos de depuración 184
7.3.2. Eliminación de tilosina y amoxicilina 186
7.3.3. Eliminación de tetraciclinas a lo largo del tratamiento 186
7.3.4. Rendimiento en la eliminación de tetraciclinas 190
7.4. Discusión **191**
7.5. Publicaciones **195**
8. CONCLUSIONES **196**
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **200**

ABREVIATURAS

Ab:	Antibióticos
AcN:	Acetonitrilo
AMX:	Amoxicilina
A/O:	Proceso anaerobio/aerobio
AS:	Fango activado (Activated Sludge)
CLT:	Clortetraciclina
COT:	Carbono orgánico total
COVs:	Compuestos orgánicos volátiles
DAD:	Diodo-Array Detector (detector ultravioleta de diodos)
DXC:	Doxiciclina
DBO:	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
EDAR:	Estación Depuradora de Aguas Residuales
GC:	Cromatografía de Gases
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
IPA:	Isopropanol
K_{ow}:	Coeficiente de partición octanol/agua
K_d:	Coeficiente de distribución agua/lodo
LOD:	Límite de detección
LOQ:	Límite de cuantificación
MeOH:	Metanol
MS:	Mass spectrometer (detector de masas)
MW:	Mass weight (peso molecular)
NTK:	Nitrógeno total Kjeldahl
OXT:	Oxitetraciclina
PDA:	Photo Diode- Array Detector (detector ultravioleta de diodos)
PI:	Par iónico
RSD:	Desviación estándar relativa
S:	Solubilidad
SPE:	Solid Phase Extraction (extracción en fase sólida)

SST:	Sólidos suspendidos totales
SSV:	Sólidos suspendidos volátiles
SVI:	Índice volumétrico del fango
t:	Estadístico t-Student
TC:	Antibiótico tetraciclina
TCs:	Tetraciclinas (familia de antibióticos)
TFA:	Ácido trifluoroacético
THF:	Tetrahidrofurano
TIL:	Tilosina
TRH:	Tiempo de retención hidráulico
UV:	Ultravioleta
θ_x:	Edad celular (tiempo de residencia celular o edad del fango)

RESUMEN

Las aguas residuales pueden producir una serie de alteraciones en los cursos de agua debido a los diversos productos que contienen, por lo tanto es necesario su tratamiento. Durante mucho tiempo las investigaciones sobre el impacto de los contaminantes químicos se han centrado casi exclusivamente en contaminantes "convencionales", en la actualidad estos compuestos son menos relevantes en las investigaciones, sobre todo en los países más desarrollados, porque sus emisiones se han reducido (debido a medidas legales adoptadas) y el interés se ha centrado en contaminantes denominados "emergentes". Estos contaminantes se encuentran en menores concentraciones en las aguas residuales, pero pueden tener potenciales efectos nocivos para el medio ambiente.

Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran los antibióticos (pertenecientes al subgrupo de los compuesto farmacéuticos), tanto de uso humano como veterinario, que representan un grupo creciente de contaminantes orgánicos en las aguas residuales debido al uso masivo de los mismos en los últimos años.

Los antibióticos son excretados en su forma original o como metabolitos y llegan a las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), donde si no son completamente eliminados, pueden llegar a los cauces receptores, pudiendo favorecer la proliferación de las bacterias resistentes.

Este estudio evaluó la eficacia de eliminación de cinco antibióticos de amplio uso humano y ganadero (oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina (tetraciclinas); tilosina (macrólido) y amoxicilina (β-lactámico) en distintos sistemas de tratamiento, así como la influencia que ciertos parámetros podían tener sobre su eliminación. Los parámetros o variables estudiados fueron: el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga másica y el tipo de comunidades bacterianas dominantes en los sistemas de lodos activados.

Los sistemas de tratamiento evaluados en este estudio fueron una EDAR urbana (estación depuradora de León y su alfoz) y dos plantas de tratamiento de purines, todos ellos utilizaban la tecnología de los lodos o fangos activados. Para algunos ensayos se realizó una modelización piloto de los sistemas a escala de laboratorio, ya que no era viable realizarlos a escala real.

Para el estudio, se desarrollaron y validaron métodos analíticos mediante cromatografía líquida, que permitían determinar las concentraciones de los citados compuestos en las diferentes muestras procedentes de los sistemas de tratamiento.

En base a los resultados obtenidos, los sistemas de tratamiento estudiados en este trabajo, lograban tasas muy altas en la eliminación de contaminantes convencionales

legislados (reducciones de DQO entre 94% y 79% y de Nitrógeno en forma de amonio de entre 87-94%, en función del tipo de estudio) lo que indicó un funcionamiento estable y una alta eficacia depuradora.

En cuanto a la eliminación de los cinco antibióticos, el promedio global de eliminación en los ensayos realizados en las plantas con diferente TRH y carga másica, fue de 74% para la oxitetraciclina, 91% para la clortetraciclina, 92% para la doxiciclina, 84% para la amoxicilina y 45% para la tilosina.

Según los distintos ensayos realizados, la eliminación de los cinco antibióticos, se vio influenciada por el tiempo de retención hidráulico. Los porcentajes de eliminación fueron menores al descender el tiempo de 24 a 8 horas, excepto para la amoxicilina. En el caso de la carga másica, presentaba un efecto significativo en la eliminación de la oxitetraciclina, y en menor medida en la eliminación de la amoxicilina, clortetraciclina y doxiciclina, mientras que en el caso de la tilosina, este parámetro no parecía tener ningún efecto en la eliminación de la misma.

Adicionalmente, en estas plantas piloto se realizó un seguimiento de la microfauna asociada a los procesos, resultado ser las especies de *Zoothamnium* las dominantes en presencia de los antibióticos. Así mismo, se realizaron cultivos en placa a partir de inóculos de los reactores de las plantas piloto, observando un mayor crecimiento de bacterias en presencia de tilosina y amoxicilina, que en el caso de las tetraciclinas, lo que hizo suponer que las bacterias eran más resistentes a los dos primeros.

Según los resultados experimentales obtenidos en los sistemas piloto con diferentes comunidades bacterianas dominantes, la eliminación fue significativamente mayor en los sistemas heterótrofos que en el autótrofo (nitrificante). El sistema heterótrofo anaerobio consiguió reducciones de entre el 60% para la oxitetraciclina y el 96% para la amoxicilina. En el heterótrofo aerobio los resultados obtenidos fueron ligeramente inferiores, entre un 55% para la oxitetraciclina y un 84% para la amoxicilina. La tilosina era el antibiótico que menos se eliminaba, con porcentajes de reducción que oscilaban entre el 13% en el sistema desnitrificante y el 59% en el heterótrofo aerobio.

Finalmente, para completar el estudio, se evaluaron dos plantas de tratamiento de purines mediante lodos activados. La eliminación de las tres tetraciclinas (no se detectaron en ellas la amoxicilina y tilosina) en ambas plantas fue similar, con porcentajes promedio de eliminación de 71-76% para oxitetraciclina, 75-80% para clortetraciclina y 95% para doxiciclina. Evaluando las concentraciones encontradas en cada uno de los puntos de muestreo, se observó que la eliminación de estos compuestos ocurría sobre todo en la unidad de floculación-coagulación.

Además del estudio sobre los cinco antibióticos, que fue el de mayor relevancia en el trabajo, se realizó un seguimiento de las concentraciones de ciertos iones metálicos (metales pesados) en la línea de tratamiento de la EDAR de León. Según los resultados obtenidos, los iones metálicos eran eficazmente eliminados de las aguas residuales. Sin embargo, estos metales pesados tendían a acumularse en el lodo, especialmente en los fangos primarios. Los dos metales detectados en mayor concentración en las muestras de lodos fueron el Hierro y el Zinc.

Capítulo 1

Objetivos y estructura de la Tesis

1.1. Objetivos

El principal objetivo que se planteó en este trabajo, fue estudiar la eficacia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, especialmente la EDAR de León y su alfoz, en la eliminación de determinados contaminantes denominados "emergentes".

Dentro de los contaminantes "emergentes", el estudio se centró en varios antibióticos de amplio uso humano y veterinario. Se seleccionó este tipo de compuestos debido a la relevancia que tiene su vertido al medio ambiente, por la potencial resistencia bacteriana que su presencia en el medio ambiente puede generar.

En cuanto a los sistemas de tratamiento, se evaluó el más comúnmente utilizado, que es el sistema de fangos o lodos activados. En este trabajo se evaluó un sistema de tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales y dos plantas de tratamiento de residuos procedentes de animales (purines). Con ello se pretendió cubrir el espectro de aguas residuales donde pueden aparecer estos antibióticos. Es decir se consideraron los sistemas de tratamiento:

1. Estación depuradora de aguas residuales (EDAR)

Debido a su proximidad geográfica, se pretendió evaluar la eficacia de la EDAR de León y su alfoz, pero debido a que resultaba inviable la realización de los ensayos con antibióticos en la misma (no se podía inocular los antibióticos a las concentraciones objeto de estudio en un sistema real de tratamiento, con un caudal cercano a los 120.000 m^3/día), los ensayos se realizaron en plantas piloto de laboratorio inoculados con lodo procedente de la citada EDAR y alimentados con agua residual sintética. Estos sistemas reproducían a pequeña escala las operaciones unitarias y sus parámetros de control eran similares a los de la estación, pero a escala de laboratorio.

Esta modelización permitió estudiar por separado cada uno de los procesos unitarios que tienen lugar en un sistema de lodos activados, así como evaluar la potencial influencia en los rendimientos de eliminación, que tenían ciertos parámetros de control, como eran el tiempo de retención hidráulico y la carga másica, a saturación de oxígeno.

También se estudiaron por separado las distintas reacciones microbianas que tienen lugar en estos sistemas, como son la actividad heterotrófica aerobia, la nitrificación y la desnitrificación. Para ello se pusieron en marcha sistemas piloto en los que se fomentaba el crecimiento y desarrollo de ciertas poblaciones bacterianas dominantes.

Adicionalmente, se realizó un seguimiento de las comunidades bacterianas y microfauna asociada a cada proceso y se determinó la posible generación de cepas resistentes a los antibióticos estudiados.

A escala real (en la EDAR de León), se realizó un estudio de la distribución de un grupo de metales pesados en las distintas fracciones (aguas residuales, lodos activados, lodos primarios, efluentes, etc). Este estudio sí pudo realizarse directamente en la EDAR de León y su alfoz ya que era un seguimiento de concentraciones reales, no se tuvo que realizar ninguna modelización a pequeña escala.

2. Sistema de tratamiento de residuos ganaderos (purines de cerdo)

Finalmente se evaluó el comportamiento de otros sistemas de depuración que emplean los fangos activos aplicados al tratamiento de purines, en la eliminación de los antibióticos de uso frecuente en granjas porcinas. En este caso, las concentraciones detectadas permitieron el estudio sobre la eficacia de eliminación "in situ" en las plantas reales, sin tener que reproducir estos sistemas a escala de laboratorio, gracias también a la colaboración de los gestores de las mismas.

Las etapas en la realización de este trabajo fueron las siguientes:

i) Revisión bibliográfica de datos sobre los sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados y principales contaminantes. Selección de los contaminantes objeto de estudio, en función de la información recogida sobre frecuencia de uso, dosis empleadas y relevancia.

ii) Búsqueda y recopilación de los datos existentes sobre propiedades fisico-químicas, estructura y comportamiento en diferentes medios de los contaminantes seleccionados.

iii) Puesta a punto de métodos fisicoquímicos para la determinación de parámetros que permitieron el seguimiento del nivel de funcionamiento de los sistemas de depuración, como son: DBO, DQO, SSV, pH, Oxígeno, etc.

iv) Desarrollo de métodos analíticos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) y tratamiento previo de muestra. Validación analítica de los mismos para demostrar que eran métodos específicos, precisos, sensibles, reproducibles, robustos y exactos para la determinación y cuantificación de los contaminantes seleccionados, en las diferentes muestras procedentes de las operaciones unitarias de los sistemas de tratamiento de aguas residuales y purines.

v) Diseño, mantenimiento y control de sistemas de tratamiento mediante fangos activados a escala de laboratorio (plantas piloto), que reprodujeran a pequeña escala el proceso de la EDAR de León y su alfoz, para la realización de los diferentes estudios que resultaban inviables en la EDAR real.

vi) Estudio de la influencia de los parámetros: tiempo de retención hidráulico y carga másica en la eliminación de los antibióticos. Evaluación de su influencia en la evolución de las comunidades bacterianas asociadas a los procesos y determinación de la posible aparición de cepas bacterianas resistentes a los citados contaminantes emergentes estudiados.

vii) Evaluación de la distribución de ciertos iones metálicos en las distintas etapas unitarias que forman parte de la línea de tratamiento de la EDAR de León y su alfoz. Para ello se realizaron varios muestreos gracias a la colaboración del personal de la citada estación depuradora.

viii) Estudio comparativo de la eficacia en la eliminación de antibióticos en sistemas con diferentes comunidades bacterianas dominantes: aerobias autótrofas (nitrificación), anaerobias heterótrofas (desnitrificación) y aerobias heterótrofas. Se evaluó la posible aparición de cepas bacterianas resistentes, se observó la evolución de las comunidades bacterianas y se determinó el rendimiento de cada sistema en la eliminación de contaminantes legislados.

ix) Determinación de la eficacia de los sistemas de tratamiento de purines a escala real, en la eliminación de antibióticos de uso frecuente en ganado porcino.

x) Extracción de conclusiones y futuras recomendaciones.

1.2. Estructura de la Tesis

Según los objetivos expuestos anteriormente el trabajo está formado por 8 capítulos:

Capítulo 1: Resumen de los objetivos y estructura de la tesis.

Capítulo 2: Se realiza una breve introducción al tema de estudio, con una revisión bibliográfica sobre los sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante fangos activados (procesos, parámetros de control, microfauna asociada, etc) y sobre los diferentes contaminantes presentes en las aguas residuales. Se dió especial relevancia los denominados “contaminantes emergentes” como son los fármacos, haciendo especial hincapié en el grupo de los antibióticos y en la problemática asociada a los mismos, es decir, sobre la posible aparición de cepas bacterianas resistentes a estos compuestos en el medio ambiente, lo que supondría un potencial peligro para la salud humana y animal.

Capítulo 3: En este capítulo se detallan los materiales y métodos comunes. Se incluye también una descripción del diseño de los montajes a escala de laboratorio (plantas piloto) así como los componentes generales del agua residual sintética (posteriormente se concretarán en el capítulo correspondiente las proporciones de cada uno en función del estudio realizado). Es decir, este capítulo recoge la descripción detallada de los procedimientos analíticos para la determinación de parámetros físico-químicos en sistemas de tratamiento de aguas residuales (por ejemplo DBO, DQO, SSV, etc), la metodología empleada en la determinación de la actividad bacteriana y su inhibición debido a la presencia de contaminantes, y los métodos utilizados para la caracterización de la biomasa y microfauna asociada a los diferentes procesos.
No se incluye en este capítulo la descripción detallada de los métodos cromatográficos utilizados ya que el desarrollo y validación de los mismos, presentaba suficiente entidad para recogerse en un capítulo independiente.

Capítulo 4: Se recogen todos los ensayos realizados para la puesta a punto de métodos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la determinación y cuantificación de los diferentes contaminantes (antibióticos), en las diferentes muestras de los estudios propuestos. Así mismo, se incluye el procedimiento y resultados de la validación analítica de los mismos.

Capítulo 5: comprende el estudio sobre la influencia del tiempo de retención hidráulico y la carga másica en la eliminación de varios antibióticos en los sistemas de tratamiento mediante fangos activados. Se evaluó la eficacia en la eliminación de estos contaminantes, la evolución de las comunidades bacterianas y microfauna asociada y la generación de bacterias resistentes a los antibióticos aplicados en los sistemas. Se realizó una estimación de la degradación de estos contaminantes en varios medios, con el fin de determinar la contribución en la eliminación de la posible degradación físico-química en los sistemas de tratamiento.
Finalmente en este capítulo también se incluyó un estudio sobre la distribución de distintos iones metálicos en la EDAR de León.

Capítulo 6: describe el estudio comparativo de sistemas de tratamiento a escala de laboratorio con distintas poblaciones bacterianas dominantes: nitrificantes, desnitrificantes y heterótrofas aerobias y las tasas eliminación de varios antibióticos en los mismos. Se evaluó la eficacia de las diferentes reacciones bacterianas que

tienen lugar en un sistema de lodos activados. Se estudió también la respuesta de las comunidades bacterianas a la presencia de estos compuestos.

Capítulo 7: comprende el estudio sobre la eliminación de antibióticos de uso veterinario (en ganado porcino) en plantas reales de tratamiento de purines mediante la tecnología de fangos activados. Se determinó la evolución de las concentraciones de estos contaminantes en cada uno de los procesos unitarios del tratamiento y se realizó una estimación del rendimiento de eliminación global.

Capítulo 8: se exponen las conclusiones finales sobre la eficacia de la tecnología de los fangos activados en la eliminación de los contaminantes estudiados, así como posibles recomendaciones y líneas para futuras investigaciones.

Finalmente se incluye un anexo con las diferentes referencias bibliográficas consultadas.

Capítulo 2

Introducción

2.1. Aguas residuales

Bajo el término "aguas residuales urbanas" se engloban los residuos líquidos recogidos mediante la red de alcantarillado para su envío a una planta de depuración (Mujeriego, 1990). Las aguas residuales urbanas se definen también como los líquidos procedentes de la actividad humana, que llevan en su composición gran parte de agua y que generalmente son vertidos a cursos o masas de agua continentales o marinas (Seoanez, 1999).

Las aguas residuales urbanas producen una serie de alteraciones en los cursos de agua debido a los diversos productos que contienen y a que las áreas receptoras son cada vez menos capaces de la autodepuración (Seoanez, 1999).

Las aguas residuales de origen doméstico tienen una composición muy variada debido a la diversidad de factores que la afectan y a la naturaleza de la población residente (Mujeriego, 1990). Por otro lado, las aguas pluviales o de lavado de calles que drenan desde las zonas urbanas, aportan también una carga importante de contaminantes (sólidos en suspensión y disueltos).

La Directiva 91/271/CEE de 21 de Mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, transpuesta al Ordenamiento Español mediante el Real-Decreto Ley 11/1995 de 28 de Diciembre, en su artículo 2 realiza las siguientes definiciones:

- Aguas residuales urbanas: aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial.
- Aguas residuales domésticas: aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
- Aguas residuales industriales: aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.

En España la mayor parte de las aguas residuales urbanas están formadas por la unión de las aguas residuales procedentes del alcantarillado municipal, de las industrias asentadas en el casco urbano y, en la mayor parte de los casos, de las aguas de lluvia que son recogidas por el alcantarillado. En general, las aguas residuales urbanas se originan a causa de: Excretas, residuos domésticos, arrastres de lluvia, infiltraciones y residuos industriales (Seoanez, 1999).

Los principales contaminantes de las aguas son: organismos patógenos, materiales orgánicos sintéticos, minerales y productos químicos inorgánicos, nutrientes, calor,

sedimentos, sustancias consumidoras de oxígeno y sustancias radiactivas. Estos contaminantes se pueden clasificar según su naturaleza en:

Químicos: ácidos, álcalis, sales, pesticidas, detergentes, cationes específicos, fenoles y otros compuestos orgánicos, etc.

Biológicos: bacterias, virus, algas, hongos, etc.

Físicos: calor, olor, color, radiactividad, arena, sedimentos, sólidos en suspensión, lodos, etc.

En la tabla 1 se presenta un resumen sobre los principales contaminantes presentes en las aguas residuales urbanas y sus posibles efectos sobre los cauces receptores. Uno de los impactos más significativos es el de la eutrofización. Se trata de una respuesta del ecosistema al aumento de la disponibilidad de nutrientes, causando un crecimiento exponencial de algas y el desarrollo incontrolado de una especie. Todo ello ocasiona una mala apariencia de las aguas, olores, y disminución del oxígeno disuelto que afecta negativamente a la flora y fauna acuática (EPA, 1993; Winkler, 1998; Salgot y Tapias, 1999).

Tabla 1: *Contaminantes de las aguas residuales y posibles efectos en cauces receptores. Adaptado de Dewisme, 1997 y Matia et al., 1999*

Contaminantes del agua	Impactos más significativos
Materia en suspensión	Aumento de la turbidez del agua (alteración de la fotosíntesis y reducción de la producción de oxígeno) Sedimentación obstruyendo el lecho de los ríos
Compuestos inorgánicos	Ecotoxicidad de determinados compuestos (por ejemplo las sales de metales pesados) Reacciones con sustancias disueltas formando compuestos tóxicos
Conductividad	Concentraciones elevadas de sales impiden la supervivencia de diversas especies vegetales y animales
Nutrientes	Crecimiento anormal de algas y bacterias (aumento de la turbidez). Eutrofización
Materia orgánica	Disminución del oxígeno Emisión de metano en caso de procesos anaerobios Eutrofización
Compuestos orgánicos tóxicos	Toxicidad para la vida acuática
Organismos patógenos	Inutilización del agua para uso humano Contaminación de los organismos acuáticos que puede llegar al hombre a través de la cadena trófica
Contaminación térmica (descarga de aguas de refrigeración)	Modificación de la solubilidad del oxígeno Aceleración del metabolismo de flora y fauna (eutrofización) Alteración de los ecosistemas acuáticos

Como se puede ver en la tabla anterior, la variedad de contaminantes que pueden encontrarse en las aguas residuales urbanas es muy grande. Tanto, que desde el punto de vista práctico, resultaría imposible analizar la presencia de todos ellos. Para la caracterización de las aguas residuales urbanas, se emplean, comúnmente, una serie de parámetros físico-químicos como son: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), nitrógeno total, fósforo total, carbono orgánico total, etc. En la tabla 2 puede verse la composición típica de un agua residual doméstica en función de los valores de estos parámetros y en la tabla 3 el listado de los nutrientes típicamente contenidos en las mismas.

Tabla 2: *Composición típica del agua residual doméstica bruta (adaptado de Metcalf-Eddy, 1995)*

		Concentración		
Contaminantes	**Unidades**	**Débil**	**Media**	**Alta**
Sólidos totales (ST)	mg/L	350	720	1200
Disueltos totales		250	500	850
Fijos		145	300	525
Volátiles		105	200	325
Sólidos en suspensión (SS)		100	220	350
Fijos		20	55	75
Volátiles		80	165	275
Sólidos sedimentables		5	10	20
DBO_5 20°C	mg/L	110	220	400
COT	mg/L	80	160	290
DQO	mg/L	250	500	1000
N total	mg/L	20	40	85
Orgánico		8	15	35
Amoníaco libre		12	25	50
Nitritos		0	0	0
Nitratos		0	0	0
P total	mg/L	4	8	15
Orgánico		1	3	5
Inorgánico		3	5	10
Cloruros	mg/L	30	50	100
Sulfato	mg/L	20	30	50
Alcalinidad ($CaCO_3$)	mg/L	50	100	200
Grasa	mg/L	50	100	150
Coliformes totales	nº/100 mL	10^6-10^7	10^7-10^8	10^7-10^9
COVs	µg/L	<100	100-400	>400

Tabla 3: *Nutrientes contenidos en aguas residuales no tratadas (adaptado de Seoanez, 1999).*

Nutrientes	***Contenido (mg/L)***
K	*26*
P	*7*
Na	*180*
Mg	*24*
N total	*45*
N amoniacal	*33*
N (en forma de nitritos)	*0,1*
N (en forma de nitratos)	*0,1*

El impacto de la calidad del agua, en el ambiente y en la salud pública, hace necesario un tratamiento de las aguas residuales. El término "depuración" de aguas residuales engloba un conjunto de operaciones unitarias de tipo físico, químico y biológico cuya finalidad es la eliminación o reducción de la contaminación y características no deseables de las aguas residuales.

El objetivo de los tratamientos de las aguas residuales es reducir la contaminación del vertido y minimizar su impacto en el medio ambiente. La legislación establece límites legales de concentración para algunos parámetros como requisito para poder verter las aguas tratadas en el cauce receptor, de manera que la depuración de las aguas ha de asegurar el cumplimiento de tales límites.

2.2. Estaciones de tratamiento de aguas residuales

También llamadas plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) o, más comúnmente, estaciones de tratamiento de aguas residuales (EDARs), pueden definirse como el conjunto de operaciones unitarias de tipo físico, químico y biológico cuya finalidad es la eliminación o reducción de la contaminación o de las características no deseables de las aguas.

Las EDARs son instalaciones que recogen el agua residual de una población, procedente, en su mayor parte, del consumo de sus habitantes y, después de una serie de tratamientos y procesos, la devuelven al cauce receptor (río, embalse, mar).

Tradicionalmente los objetivos de una EDAR han sido:

- ✓ Eliminación de residuos, aceites, grasas, flotantes, arenas, etc.
- ✓ Eliminación de materias decantables orgánicas o inorgánicas.
- ✓ Eliminación de materia orgánica.

- ✓ Eliminación de compuestos amoniacales y que contengan fósforo
- ✓ Transformación de los residuos retenidos en fangos estables.

Habitualmente las EDARs se han clasificado en función del grado de complejidad y la tecnología empleada en tratamientos convencionales (en núcleos de población importantes, utilizan tecnologías que consumen energía eléctrica de forma considerable) y tratamientos para pequeñas poblaciones (en núcleos de población pequeños con costes de mantenimiento bajos y grado de tecnificación reducido), (Santos J.A., www.geocites.com).

En una EDAR tienen lugar distintas operaciones unitarias: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario.

En la figura 1 puede verse un esquema general del proceso de tratamiento de aguas residuales y, en la tabla 3, los procesos que se realizan en cada fase.

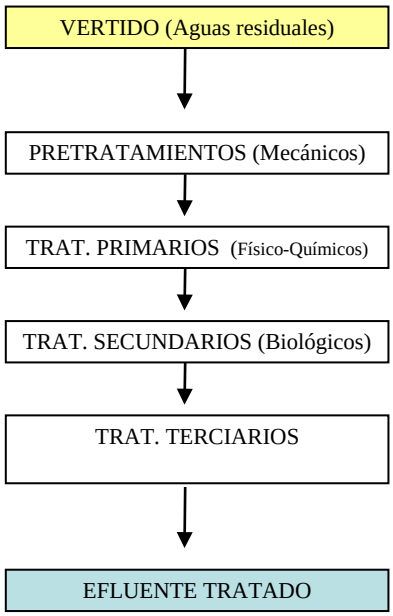


Figura 1: *Esquema general de una plata de tratamiento de aguas residuales (esquema basado en la información presentada por Gómez, 2008)*

El pretratamiento es un tratamiento mecánico que tiene como objetivo reducir grasas, aceites, arenas y sólidos gruesos. El tratamiento primario o físico-químico, generalmente consiste en un decantador o clarificador donde determinados sólidos decantan por gravedad y el material flotante, como grasa y plásticos, pueden desnatarse. El objetivo de esta etapa es producir un líquido homogéneo capaz de ser tratado biológicamente y unos fangos o lodos que pueden ser tratados por separado. La principal función del tratamiento secundario, o biológico, es transformar la materia orgánica disuelta en sólidos sedimentables que se retiran fácilmente del proceso mediante una

decantación secundaria. Los tratamientos terciarios, o de refino, como la ozonización o cloración se utilizan para mejorar la calidad final del agua, pero se emplean en menor medida que los tratamientos anteriores.

En la tabla 4 se recoge un resumen de los procesos comunes en una estación depuradora de aguas residuales.

Tabla 4: *Procesos típicos en una EDAR (tabla basada en información presentada por J.A Santos, en www.Geocities.com y Gómez, 2008)*

Pretratamientos	Desbaste Dilaceración Desarenado
Primarios (físico-químicos)	Homogeneización Sedimentación Separación de aceites y grasas Flotación Neutralización Precipitación (Coagulación/Floculación) Oxidación/Reducción
Secundarios (biológicos)	Tratamientos aerobios: biomasa en suspensión /adherida Tratamientos anaerobios: biomasa en suspensión/adherida
Terciarios	Físicos: filtración, destilación, flotación, congelación, ósmosis inversa, electroósmosis, extracción Químicos: adsorción, intercambio iónico, precipitación, desinfección, remineralización. Biológicos: asimilación bacteriana, cultivo de algas, eliminación de nutrientes.

Los tratamientos primario y secundario están definidos en el artículo 2 de la Directiva 91/271/CEE de 21 de Mayo de 1991 de la siguiente forma:

Tratamiento primario: tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso físico y/o químico que incluya la sedimentación de sólidos en suspensión, u otros procesos en los que la DBO_5 de las aguas residuales que entren se reduzca por lo menos en un 20% antes del vertido y el total de sólidos en suspensión se reduzca por lo menos en un 50%.

Tratamiento secundario: tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante un proceso que incluya, por lo general, un tratamiento biológico con sedimentación secundaria, u otro proceso en el que se respeten los requisitos expuestos en la tabla 5, que resume los requisitos que han de cumplirse en una EDAR para poder verter las aguas tratadas.

Tabla 5: *Requisitos para los vertidos de plantas de tratamiento de aguas residuales adaptado de: Directiva 91/271/CEE de 21 de Mayo de 1991*

Parámetros	Expresión de los resultados	Concentración media diaria máxima	Porcentaje de reducción
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5 a 20°C) sin nitrificación	mg/L	25	70-90
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg/L	125	75
Total de sólidos en suspensión	mg/L	35	90
Requisitos en zonas sensibles por la eutrofización			
Fósforo total	mg/L P	2	80
Nitrógeno total	mg/L N	10-15	70-80

Para poblaciones >100.000 hab. eq. Valor de 1 mg/L para el Fósforo total

Para el N total, 10 ppm para poblaciones >100.000 hab eq y 15 ppm para las de 10.000-100.000 hab. eq

El cumplimiento obligatorio de la Directiva Comunitaria 91/271/CEE, unido a la ejecución del Plan Nacional de saneamiento y Depuración, se traduce en España en el crecimiento de la construcción de estaciones depuradoras. En los últimos 10 años, se han puesto en marcha más de 100 actuaciones de reutilización directa, que cubren una demanda de, aproximadamente, 230 millones de metros cúbicos/año siendo el riego agrícola el aprovechamiento más extendido (88% del volumen total).

2.2.1. EDAR de León y su alfoz

Como se indicó en el capítulo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar la eficacia de la estación depuradora de León y su alfoz en la eliminación de ciertos contaminantes orgánicos e iones metálicos. En algunos casos, los estudios de eliminación no eran viables en el sistema real por lo que se recurrió a la modelización a escala piloto. Pero teniendo en cuenta que el inóculo de lodo activado de los sistemas piloto procedió de la EDAR de León, y que se realizó un seguimiento sobre la distribución de ciertos

metales pesados directamente en sus instalaciones, en este capítulo se incluye información sobre esta depuradora.

Cuando se realizó la parte experimental de este trabajo, se trataba de una instalación de tratamiento de aguas residuales que contaba con un pretratamiento y un tratamiento primario y secundario. La población de León y su alfoz, era de unos 330.000 habitantes equivalentes aprox. El caudal de entrada medio a la planta era de aproximadamente 110.000 m^3/día.

El pretratamiento eliminaba todos aquellos objetos de tamaño superior a 3 mm mediante un proceso físico (cuatro canales de desbaste con tamices autolimpiables). Realizaba también un desarenado-desengrasado. Contaba con un pozo de gruesos de 77 m^3, provisto de una cuchara bivalva para la retirada de gruesos. También contaba con una reja fija de 100 mm de paso antes del pozo de bombeo. Existía un tanque de tormentas de 5.520 m^3 y disponía de cuatro agitadores de fondo.

Presentaba tres decantadores primarios de forma rectangular, con una capacidad de 4.140 m^3 cada uno y un TRH de 2,78 horas a caudal medio.

El tratamiento secundario se realizaba en tres tanques rectangulares de flujo pistón, con nitrificación-desnitrificación, de un volumen de unos 10.140 m^3 cada uno (5 m de altura de agua). Cada tanque presentaba cinco carriles, el primero anaerobio con agitación mecánica y los restantes aerobios con tres turbocompresores (uno de reserva) con difusores de membrana que aireaban y agitaban. Había una recirculación del licor de mezcla del 300%. Se estimaba que el agua permanecía en el tratamiento biológico 6 horas y se calculaba una edad del fango aproximada de 16 días. Presentaba una purga de lodos en los reactores biológicos.

La decantación secundaria se realizaba mediante tres decantadores rectangulares de unos 7.756 m^3 y un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 5,21 horas a caudal medio. La captación del agua decantada se realizaba en canales, por medio de perforaciones sumergidas, a lo largo de 2/3 partes del decantador.

No presentaba tratamiento terciario, el efluente no se trataba con hipoclorito sódico (debido a la problemática sobre la generación de compuestos organoclorados), aunque había disponible una instalación adecuada para ello. El agua tratada se vertía al río, pero una parte era aprovechada por la propia instalación como agua de servicios.

Los lodos o fangos que se generaban en esta instalación (línea de fangos) se clasificaban en:

- Primarios: procedentes de la decantación primaria. Se concentraban en una arqueta desde donde se enviaban al tamiz rotatorio y posteriormente se bombeaban hacia un espesador de gravedad cubierto, de 10 m de diámetro.

- Secundarios: la purga de los fangos secundarios se concentraba en un canal común desde el cual mediante cuatro bombas axiales se realizaba una recirculación de fangos a la entrada del reactor biológico del orden del 100% del caudal medio. Los fangos en exceso eran enviados a una unidad de flotación de 10 m de diámetro.
- Fangos homogeneizados: los fangos una vez espesados y flotados se mezclaban en una cámara de homogeneización de fangos de 50 m^3 que estaba provista de un agitador y una cuba de sal para la corrección de pH.

Los fangos una vez homogeneizados, se transferían a dos digestores anaerobios de 4.000 m^3. La agitación se realizaba mediante cañas de gas y el calentamiento de la recirculación de fangos se hacía mediante dos intercambiadores de calor. La temperatura de los fangos en los digestores era de unos 35°C. Los fangos una vez digeridos pasaban a un espesador.

Posteriormente, los lodos eran deshidratados en dos centrífugas de caudal unitario de 5-12 m^3/h, previa adición de un polielectrolito. Estos fangos deshidratados se almacenaban en un silo de 60 m^3, de donde eran recogidos y posteriormente transportados a instalaciones de recepción mediante camiones. La planta contaba con una instalación de secado térmico, con la que se conseguía uno fango seco.

En la digestión anaerobia de los fangos se producía biogás, que se almacenaba en un depósito de membrana de 1350 m^3 acondicionado para ello. Este gas se utilizaba en las calderas para el mantenimiento de la temperatura en la digestión, en dos motores para la producción de energía eléctrica y en el secado del fango. Con la quema de ese gas se conseguía el calor necesario para el calentamiento de los fangos y además permitía la generación de energía eléctrica. Así mismo existía una antorcha con encendido eléctrico automático para la quema del gas sobrante.

En la tabla 6 se recogen los rendimientos medios de depuración de esta EDAR en el año 2008.

Tabla 6: *Rendimientos de depuración medios para el año 2008, adaptado de www.saleal.es*

Volumen	Calidad agua bruta		Calidad agua tratada		Rendimientos	
agua tratada	SST (mg/L)	DBO_5(mg/L)	SST (mg/L)	DBO_5(mg/L)	SST	DBO_5
116.782,63 m^3/día	237,39	195,5	8	14,05	94,5	92,2

En la figura 2 puede verse una panorámica aérea de la EDAR de León y en la figura 3 se recoge un esquema con los distintos diagramas de flujo (año 2008). La información

sobre esta EDAR fue recogida in situ gracias a la colaboración de sus gestores (en los años de la realización del trabajo experimental) y en la página web de la misma: www.Saleal.es.

Figura 2: *Vista aérea de la EDAR de León y su alfoz. Adaptado de www.Saleal.es*

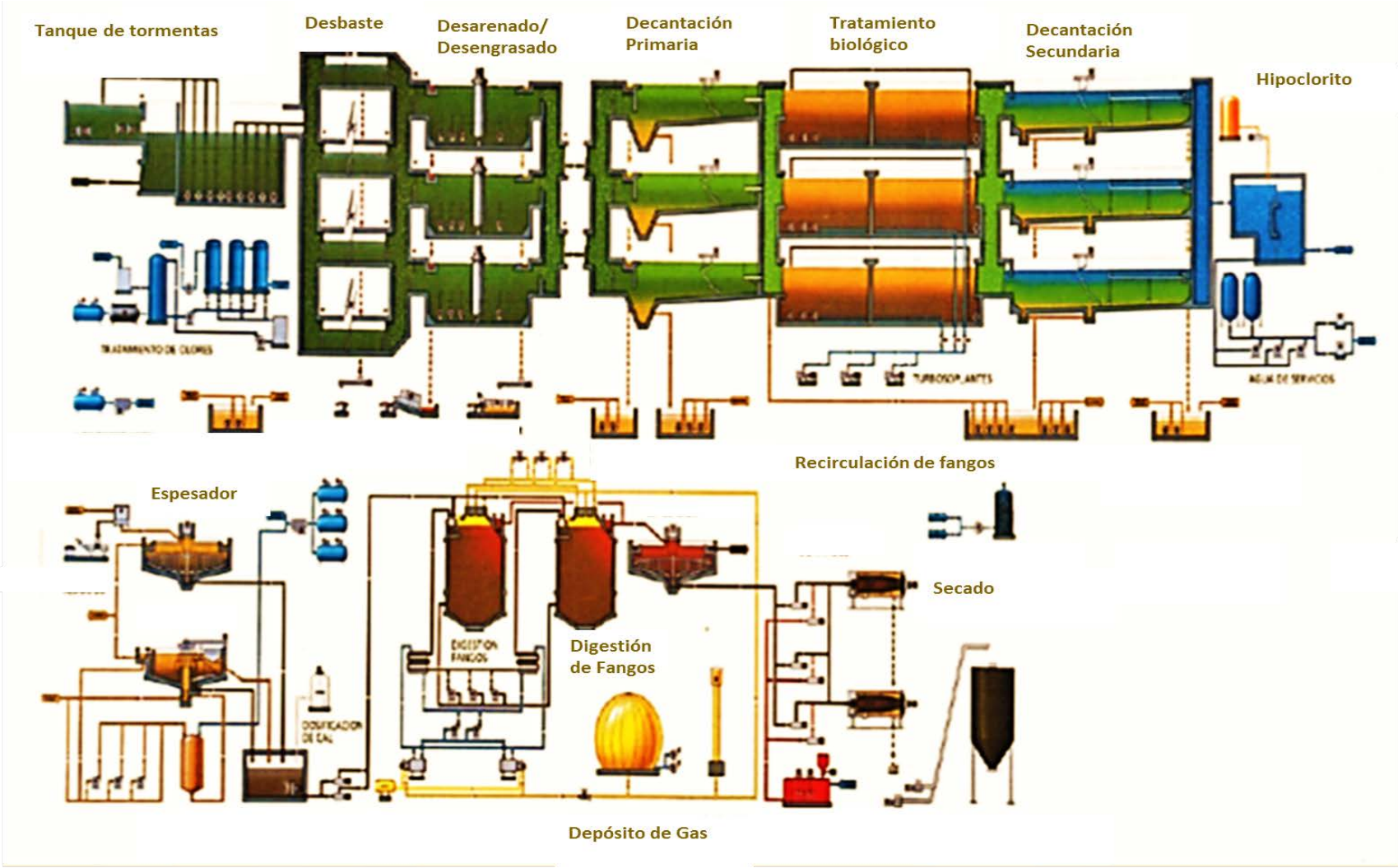


Figura 3: *Esquema de la EDAR de León y su alfoz. Por cortesía de SALEAL, adaptado de "León Ecosistema Urbano". Ed. Ayuntamiento de León y Junta de Castilla y León. Consta de una línea de aguas, una de fangos y una línea de gas.*

2.3. Tratamiento secundario

Uno de los objetivos fundamentales del tratamiento de las aguas residuales es la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), la legislación regula la concentración máxima y el porcentaje de reducción de este parámetro. Aunque el pretratamiento y tratamiento primario también contribuyen a la reducción de este parámetro, es fundamentalmente, durante el tratamiento secundario o biológico donde se produce la principal reducción junto con el nitrógeno y fósforo. Los tratamientos biológicos se basan en la utilización de microorganismos capaces de asimilar sustancias en suspensión o disueltas presentes en el agua residual. El principio de este tipo de tratamiento es el mismo que el que ocurre en la purificación de las aguas naturales.

En las EDARs, el tratamiento secundario se lleva a cabo en reactores diseñados para mantener a los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición. Con un control adecuado de las condiciones ambientales (pH, presencia o ausencia de oxígeno, temperatura y mezcla) puede conseguirse el desarrollo de una biomasa eficaz de depurar el agua residual hasta el nivel deseado (Gómez, 2008).

En el proceso participan diferentes reacciones microbiológicas para eliminar o transformar la materia orgánica y otros elementos. Estas reacciones pueden llevarse a cabo en condiciones aerobias (con presencia de oxígeno disuelto), anóxicas (sin oxígeno disuelto pero con nitrato) o anaerobias (sin oxígeno ni nitrato) dependiendo de la vía de degradación empleada. Así mismo, la biomasa empleada puede mantenerse en suspensión o adherida a un soporte (Lee, 1996; Droste, 1997).

En la tabla 7 se realiza un breve resumen de los diferentes tipos de tratamiento biológico utilizados para la depuración de aguas residuales.

Tabla 7: *Tratamientos biológicos, adaptado de Metcalf y Eddy, 1995*

<table>
<tr><td rowspan="5">Procesos aerobios</td><td rowspan="3">Cultivos en suspensión</td><td rowspan="2">Fangos Activados</td><td>Continuos</td><td>Flujo en pistón
Mezcla completa</td></tr>
<tr><td colspan="2">Discontinuos
Aireación prolongada
Canales de oxidación
Nitrificación</td></tr>
<tr><td colspan="3">Laguna aireadas</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Cultivos fijos en soporte</td><td colspan="3">Biodiscos rotativos</td></tr>
<tr><td>Filtros percoladores</td><td colspan="2">Alta carga
Baja carga</td></tr>
<tr><td>Procesos anóxicos</td><td colspan="4">Desnitrificación con cultivo en suspensión / fijo</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Procesos anaerobios</td><td>Cultivo en suspensión</td><td>Digestión anaerobia</td><td colspan="2">Alta / baja carga
Doble etapa</td></tr>
<tr><td>Cultivo fijo</td><td colspan="3">Filtro anaerobio
Lecho expandido</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Procesos combinados (anaerobios-anáoxicos-aerobios)</td><td colspan="4">Nitrificación- desnitrificación</td></tr>
<tr><td colspan="4">Nitrificación- desnitrificación- eliminación de fósforo</td></tr>
</table>

2.3.1. Sistemas de fangos activados

Existen diversos tratamientos biológicos pero el más ampliamente utilizado es el de los lodos o fangos activados (Hong et al, 2002).

2.3.1.1. Origen y breve descripción

El origen puede situarse en 1914, en Inglaterra, donde Ardern y Lockett, hicieron ensayos con un cultivo biológico en suspensión e introdujeron la idea de recircular la biomasa suspendida. Esta suspensión se denominó “fangos activados” y se trataba de la biomasa activa responsable de la depuración (Gómez, 2008). Estos investigadores observaron que al airear las aguas residuales se producían flóculos que se podían separar del agua por decantación. Después de la publicación de sus ensayos empezaron a desarrollarse instalaciones a gran escala en Inglaterra y Estados Unidos. Así, en 1917, la compañía Manchester Corporation puso en marcha una planta con capacidad para 943 m^3/día y en ese mismo año, en Houston (Texas), se construyó una estación de depuración para 38.000 m^3/día.

Pese al correcto funcionamiento de las primeras plantas se desconocía cuáles eran los fundamentos de esta tecnología, debido a esto, para el diseño de las primeras instalaciones el volumen de los reactores se determinaba de manera empírica, basándose en aplicaciones anteriores. No fue hasta las décadas de los 50 y 60 cuando se desarrolló una teoría válida sobre este proceso y se comenzaron a diseñar las plantas en función de las propias características del agua a tratar.

El proceso de fangos activados generalmente consta, en primer lugar, de un reactor donde se mantiene la biomasa en suspensión con un sistema de aireación y agitación que aporte el oxígeno necesario, evite la sedimentación de las bacterias y homogeneice el sistema; y, en segundo lugar, de un tanque de sedimentación (decantador secundario) donde se produzca la separación del fango biológico del agua. Una parte de la biomasa decantada es recirculada al reactor para mantener una concentración de microorganismos adecuada, mientras que el resto del fango se extrae del sistema para evitar una acumulación excesiva de biomasa y controlar el tiempo medio de estancia celular. Los fangos están formados por la biomasa y la materia particulada del agua residual (Winkler, 1998; Lee 1996). En la figura 4 puede verse un esquema muy simplificado del proceso.

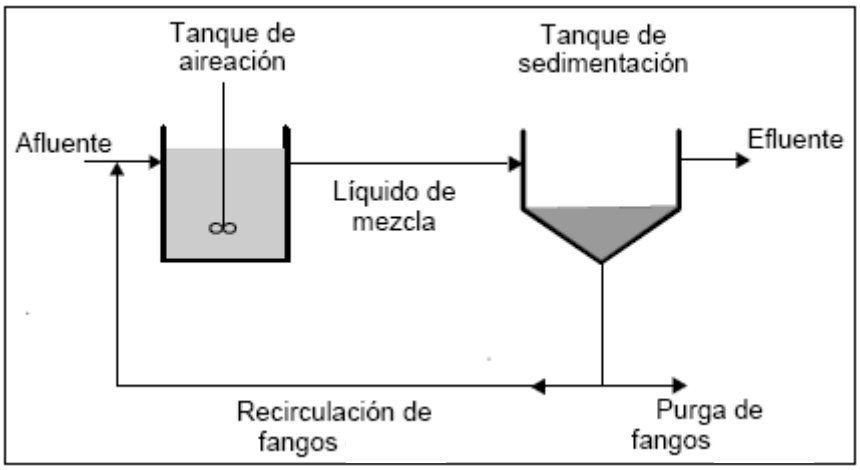


Figura 4: *Esquema del proceso de fangos activados, adaptado de Degrémont, 2007*

2.3.1.2. Fundamento

El sistema de fangos activados constituye un ecosistema artificial en el que se desarrollan microorganismos en condiciones controladas. Existe una competencia continua entre especies, lo que produce el predominio de unas sobre otras según las condiciones ambientales (Gómez, 2008).

El proceso biológico de fangos activados está constituido por bacterias, protozoos, hongos, algas, metazoos y bacteriófagos (virus de bacterias). Los hongos y las algas

generalmente no tienen mucha importancia dentro del proceso, mientras que las bacterias, filamentosos y protozoos participan activamente en el mismo. La mayoría de estos microorganismos se mantienen juntos dentro de flóculos mediante polímeros orgánicos producidos naturalmente.

Los miembros predominantes de esta comunidad son las bacterias heterótrofas (Rittman et al., 2001). Cada una de estas poblaciones desempeña un papel determinado en el proceso y en conjunto forman la comunidad biológica característica de los fangos activados (Muyima et al., 1997).

En la figura 5 se recoge un esquema de la composición biótica de los fangos activados.

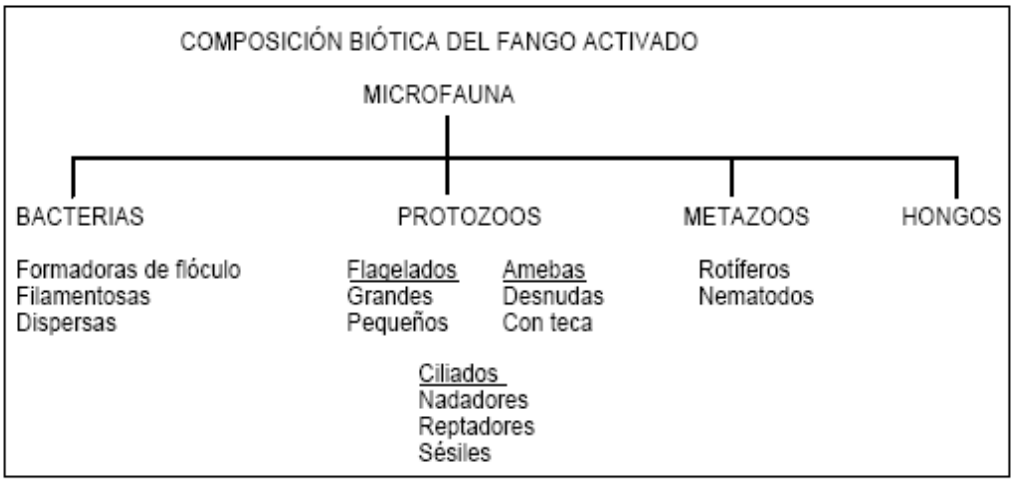


Figura 5: *Composición biótica del fango activado, adaptado de Parody, 1997*

Desde el punto de vista metabólico, los microorganismos pueden clasificarse en descomponedores, responsables de la biodegradación de los contaminantes de las aguas residuales (bacterias principalmente) y consumidores que tienen como sustrato a bacterias y otras células (determinados protozoos y metazoos), (Gómez, 2008).

Los microorganismos pueden clasificarse en función de la fuente de carbono utilizada para la síntesis celular, así, los autótrofos utilizan carbono inorgánico como el CO_2, mientras que, los heterótrofos, utilizan compuestos orgánicos.

Las bacterias constituyen la mayor parte de biomasa del proceso (aproximadamente constituyen un 95% del total de microrganismos), siendo el grupo dominante en la comunidad biológica. Su reducido tamaño y elevada relación superficie/volumen favorecen el intercambio de metabolitos con el medio que las rodea. Las bacterias predominantes son saprófitas, responsables de la degradación y

mineralización de los compuestos orgánicos y pertenecen en su mayoría a géneros aerobios gram negativos (Fernández-Galiano et al., 1996). Se clasifican genéricamente en: dispersas, formadoras de flóculos y filamentosas.

Otra característica importante que diferencia a los diferentes tipos de bacterias es su capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Así las aerobias son las que necesitan el oxígeno y lo utilizan como aceptor de electrones en sus reacciones para la producción de energía, mientras que, las anaerobias, viven en ausencia de oxígeno.

Las bacterias también se clasifican en función de su actividad metabólica en (Rius, 2003):

- ✓ Heterótrofas aerobias: responsables de la mineralización de sustancias orgánicas.
- ✓ Fermentativas: llevan a cabo reacciones en ausencia de oxígeno y nitrato.
- ✓ Nitrificantes: aerobias, autótrofas, quimiosintéticas.
- ✓ Desnitrificantes: heterótrofas anóxicas.
- ✓ Acumuladoras de polifosfatos: acumulan grandes cantidades de fosfato que en condiciones anaerobias emplean como fuente de energía para asimilar el carbono orgánico.
- ✓ Oxidantes de sulfuros: la más común es *Thiobacillus* sp.
- ✓ Reductoras de sulfatos: anaerobias estrictas.

Los protozoos son organismos unicelulares que presentan todas las estructuras necesarias para realizar sus funciones vitales. Son de dimensiones microscópicas variables entre las 10 micras y varios milímetros. El metabolismo de los protozoos es la base de su actuación en la depuración de las aguas; primero, por el consumo directo de materia orgánica disuelta en el agua y, segundo, por el consumo de las poblaciones bacterianas que se desarrollan en el medio. Constituyen un grupo muy diverso y son indicadores muy útiles del funcionamiento del proceso. En un sistema que funcione bien abundarán los ciliados, especialmente los adheridos a los flóculos más que los libres. Una población de protozoos también indica que el agua residual está libre de compuestos tóxicos ya que son altamente sensibles a los mismos (Rittman y McCarty, 2001). La presencia de flagelados es típica de las fases iniciales de funcionamiento.

Los nematodos que aparecen en estos procesos son, en su mayor parte, depredadores de bacterias dispersas y protozoos. Su papel en estos sistemas no es relevante aunque su presencia está relacionada con la edad del fango. Los rotíferos también eliminan bacterias dispersas y protozoos y contribuyen a la formación del flóculo

por la secreción de mucus. Se les considera indicadores de un buen funcionamiento del proceso de depuración (Fernández-Galiano et al., 1996).

El papel de los virus bacteriófagos no está muy claro, pero es posible que su presencia pueda ocasionar cambios rápidos en las especies dominantes de bacterias (Rittman y McCarty, 2001).

2.3.1.3. Mecanismos de eliminación de contaminantes

Las bacterias heterótrofas emplean la materia orgánica presente en las aguas residuales como fuente de carbono para la síntesis celular. Por lo tanto, la eliminación de materia orgánica en estos sistemas de tratamiento se lleva cabo en las siguientes etapas (Wanner, 1997):

a) Retención de las partículas en el flóculo.
b) Adsorción de la materia coloidal.
c) Absorción y acumulación celular de compuestos solubles de elevado peso molecular.
d) Asimilación y acumulación intracelular de sustancias fácilmente biodegradables.
e) Respiración endógena de la biomasa cuando existan limitaciones de sustrato biodegradables.

Las bacterias aerobias utilizan el oxígeno disuelto para la oxidación de la materia orgánica a CO_2.

La eliminación biológica de nitrógeno se consigue por dos procesos sucesivos, la nitrificación y desnitrificación. En la nitrificación el amonio es oxidado a nitrito y nitrato en condiciones aerobias, mientras que en la desnitrificación el nitrato es empleado por bacterias heterótrofas facultativas como aceptor de electrones, produciendo nitrógeno gas que se escapa a la atmósfera (Aravinthan et al., 2000; Drysdale et al., 2000).

El fósforo puede ser eliminado por precipitación química con sales de aluminio o hierro en un proceso sencillo pero costoso, por lo que los procesos biológicos de eliminación de fósforo están generando un interés creciente (Gómez, 2008). La eliminación biológica de fósforo consta de dos etapas, la primera requiere condiciones anaerobias y la presencia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como son los ácidos grasos volátiles de cadena corta, los microorganismos acumuladores de fósforo almacenan estos compuestos orgánicos en forma de polihidroxibutiratos o polihidroxivaleratos. La energía necesaria para esta síntesis la proporcionan los polifosfatos acumulados, que liberan ortofosfatos al líquido de mezcla (Sedlak, 1991). En una segunda etapa en condiciones aerobias, las células consumen los compuestos

orgánicos almacenados como fuentes de energía y carbono para el crecimiento celular y para la acumulación en forma de polifosfatos de los ortofosfatos disueltos en la fase anaerobia.

2.3.1.4. Evolución de la tecnología de fangos activados

Los primeros sistemas de fangos activados fueron operados en discontinuo, sin embargo los problemas de control de estos sistemas y la necesidad de tratar grandes caudales obligó a su transformación a reactores de flujo continuo (Droste, 1997). Inicialmente, el objetivo de estos sistemas era la eliminación de la materia en suspensión y la materia orgánica biodegradable.

El sistema básico de estos procesos ha sufrido una serie de modificaciones con el fin de adaptarse a los requisitos de tratamiento cada vez más exigentes, con normativas más estrictas con los límites de vertido. Por lo tanto, ha sido necesario incrementar los rendimientos de depuración contemplando la reducción de nutrientes presentes en las aguas residuales, por lo que las modificaciones han ido en la línea de la eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

La eliminación simultánea de nutrientes comenzó con los trabajos pioneros de Barnard, en 1976, que desarrollaban procesos que combinaban la nitrificación, desnitrificación y eliminación de fósforo mediante la implantación de diferentes comunidades bacterianas en ambientes separados.

A partir de ese momento comenzaron a desarrollarse diferentes procesos de fangos activados con características específicas enfocadas a la eliminación de nutrientes. Ejemplos de estos sistemas son (adaptado de Gómez, 2008):

- ✓ Proceso A/O (anóxico o anaerobio /aerobio): proceso de alta carga diseñado inicialmente para la eliminación de fósforo. La zona aerobia está diseñada para la oxidación de la materia orgánica y la anaerobia para la eliminación de fósforo. Para la eliminación de nitrógeno se cambia la zona anaerobia por una anóxica y se incluye una recirculación interna. El proceso AO_N no permite alcanzar una desnitrificación completa y requiere unas altas tasas de recirculación para alcanzar altas tasas de eliminación de nitrato.
- ✓ Proceso A_2O (anaerobio/anóxico/aerobio): diseñado para la eliminación de nitrógeno y fósforo. Es una modificación del sistema anterior que incluye una zona anóxica entre la aerobia y anaerobia.
- ✓ Proceso Bardempho (anóxico/aerobio/anóxico/aerobio): en él se alcanza la eliminación total de nitrógeno mediante dos zonas de desnitrificación. El

proceso de cinco etapas es una modificación que permite también la eliminación de fósforo.

- ✓ Proceso UCT: desarrollado en la Universidad de Ciudad del Cabo para la eliminación de fósforo y es muy parecido al A_2O. Presenta tres zonas: anaerobia/anóxica/aerobia y dos flujos de recirculación interna. Los fangos activados se recirculan hacia la zona anóxica.
- ✓ Proceso VIP (Virginia Initiative Plant): incluye una secuencia de zonas anaerobia/anóxica/aerobia pero el fango de decantador secundario se recircula hacia la zona anóxica y no a la anaerobia como en el Bardempho o A_2O, para evitar la entrada de oxígeno en zona anaerobia. En esencia es similar al UCT.

Como puede verse, la tecnología de los fangos activados ha ido evolucionando con el fin de optimizar la eliminación de nutrientes presentes en las aguas residuales. No fue hasta los años 80 cuando empezó a cobrar importancia la determinación y eliminación de determinados contaminantes de las aguas residuales que pudieran originar impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente.

2.3.1.5. Factores y parámetros de control

Existen una serie de factores que afectan al proceso de fangos activados, algunos de ellos son (Schleenstein, 2002):

- ✓ Temperatura: según la ley de Arrhenius la cinética de un proceso biológico depende de la temperatura en la que se desarrolla. Además influye sobre la velocidad de transferencia de gases, en la concentración máxima de oxígeno disuelto y en la sedimentación del lodo debido a su influencia sobre la viscosidad del agua (Metcalf y Eddy, 1995).
- ✓ pH: El valor óptimo para este proceso se estima entre 6,5 y 8,5 (Eckenfelder, 1989).
- ✓ Oxígeno disuelto: insuficiente oxígeno reduce la tasa de biodegradación. Se suministra por medio de sistemas de aireación que aportan este gas y además mantienen el sistema en agitación (Rittman y McCarty, 2001).
- ✓ Composición del sustrato: en estos sistemas se requiere una tasa de DBO_5/N/P de 100/5/1 para mantener el balance de nutrientes óptimo para la actividad heterótrofa de los microorganismos (Gray, 1990). Cuando no se alcanza esta relación, se considera un agua desequilibrada (Matsché et al., 1998; Rozano et al., 1995).

Los parámetros de control más importantes en estos sistemas de tratamiento son:

- ✓ Caudal de entrada: volumen de agua residual por unidad de tiempo que entra en el tanque de lodos activados. Es fundamental tener este dato para hacer un dimensionado adecuado del mismo.
- ✓ Tiempo de retención hidráulico (THR): se define como la relación entre el volumen del reactor que contiene los lodos activados y el caudal de entrada al mismo.
- ✓ Solidos suspendidos: la concentración de sólidos suspendidos en el licor de mezcla del reactor es una manera de evaluar la biomasa activa en el tanque, (Schleenstein, 2002).
- ✓ Edad celular: la edad celular, edad del lodo o tiempo de residencia celular (θ_x) se emplea para controlar las características físicas y biológicas del lodo. Unidades convencionales sin nitrificación operan con valores de este parámetro de 3-4 días llegando a los 30 días en unidades de aireación prolongada (Ronzano et al., 1995). La purga de lodo en el reactor hace que el θ_x sea diferente al tiempo de retención hidráulico, (Rittman y McCarty, 2001).
- ✓ Carga de alimentación aplicada (carga másica): la carga de alimentación se refiere a la DBO_5 o DQO aplicada por unidad de volumen del reactor, en tratamientos convencionales suele estar comprendida entre 0,4 y 1,5 $kgDBO_5/m^3d$ (Gray, 1990). El factor de carga se define como la relación entre la DBO_5 del afluente y la cantidad de microorganismos en el reactor. El valor óptimo de este parámetro se encuentra entre 0,3 y 0,6 kg DBO_5/kgSSV·d (Ramalho, 1995).

El control de estos dos últimos parámetros (carga másica y edad celular) se logra regulando el caudal de recirculación y la purga de lodos.

2.3.1.6. Potenciales problemas asociados al proceso

Para el correcto funcionamiento del sistema de fangos activados se requiere que los lodos sedimenten y compacten bien en el decantador secundario. Deben sedimentar bien para que el efluente tratado presente un bajo contenido de sólidos en suspensión. Por otro lado, el lodo debe ser recirculado hacia el reactor biológico (Rittman y McCarty, 2001). Por lo tanto los principales problemas que aparecen en estos sistemas están relacionados con la calidad del lodo (Schleenstein, 2002).

El apelmazamiento de lodos es el término que se utiliza para describir la formación de flóculos de lodo que sedimentan lentamente y compactan escasamente. Este hecho

dificulta la eliminación del lodo activo en el tanque de sedimentación para retornar al reactor. Se requieren tasas de recirculación más altas, la capa de lodo asciende hasta que llena el sedimentador y los sólidos de lodo activo comienzan a descargarse en el efluente, lo que ocasiona una pérdida masiva de biomasa, aumentando los valores de DBO y sólidos suspendidos en el mismo (Rittman y McCarty, 2001).

La naturaleza del flóculo está determinada por dos niveles estructurales denominados micro y macro-estructura (Jenkins et al., 1993). La microestructura está condicionada por los procesos de agregación microbiana y biofloculación (interacción entre los microorganismos y los polímeros extracelulares generados por ellos mismos) y la macro-estructura se genera por los organismos filamentosos que aportan el microesqueleto del interior del flóculo (Gómez, 2008). Si no hay suficientes filamentosos el flóculo es débil y está sujeto a descomposición en partículas más pequeñas. Por otro lado, si hay demasiados, son la causa del apelmazamiento de los lodos. El problema se acentúa cuando los filamentos se extienden fuera del flóculo y crean puentes entre los mismos, evitando que éstos se aproximen y compacten, reteniendo agua entre los flóculos y en su interior. Estos dos hechos hacen que el lodo sedimente lentamente y compacte deficientemente (Rittman y McCarty, 2001).

El inicio de un apelmazamiento de lodos puede diagnosticarse a partir del valor del índice volumétrico del lodo (SVI). Existen diferentes criterios: > 200 mL/g (Rittman y McCarty, 2001); > 150 mL/g (Matsché et al., 1998); >200 mL/g (Ronzano et al., 1995), indican un apelmazamiento importante. Un lodo con valores de SVI entre 75-125 mL/g producirá un efluente con escasos sólidos en suspensión (Parody, 1997).

En la Tabla 8 se realiza un resumen de las causas y efectos de los diferentes problemas en la sedimentación de los fangos activos. Todos ellos influyen negativamente en la calidad del efluente y son difíciles de solucionar en una EDAR.

Tabla 8: *Causas y efectos de los diferentes problemas en la sedimentación de los fangos activos, adaptado de Jenkins et al., 1993.*

Problema	Causas	Efectos
Crecimiento disperso	No hay biofloculación	Efluente turbio. Sedimentación difusa
Bulking viscoso	Producción excesiva de polímeros extracelulares	Baja velocidad de decantación y compactación. Formación de espumas. Salida de fangos con el efluente.
Pin-floc o Pinpoint floc	Ausencia de filamentos. Flóculos pequeños, compactos, débiles y esféricos	IVF < 70 ml/g. Efluente turbio
Bulking filamentoso	Exceso de filamentos	IVF > 150 ml/g. Sobrenadante claro
Ascensión de fangos	Desnitrificación en el decantador con formación de N_2	Salida de fangos con el efluente
Formación de espumas	Presencia de organismos filamentosos que forman espumas	Salida de fango con las espumas junto con el efluente

El crecimiento disperso ocurre a menudo durante la puesta en marcha de un sistema de lodo activado donde la edad celular es demasiado baja para la formación de un flóculo bien definido. Muchos de los microoganismos están dispersos en la fase líquida individualmente o en pequeños grupos (Rittman y McCarty, 2001).

El bulking consiste en la presencia predominante de organismos filamentosos en flóculos resistentes y grandes que afectan a la decantación y apelmazamiento, con un elevado SVI mientras el sobrenadante queda claro (Ronzano et al., 1995). Otra forma menos observada de bulking es el extremadamente mucoso, los flóculos en este caso son voluminosos y originados por bacterias de la familia *Zooglea* (Schleenstein, 2002).

El flóculo de cabeza de alfiler (pin-floc o pinpoint floc) consiste en la presencia de flóculos pequeños y ligeros con escasos o nulos filamentosos que no perturban la decantación (bajo SVI) pero generando un sobrenadante turbio. Este fenómeno ocurre cuando la concentración de sustrato es muy baja o muy alta (Ronzano et al., 1995).

La ascensión de fangos es un problema que ocurre en el decantador secundario en las plantas en las que el amonio se nitrifica a nitrato. Si se produce la desnitrificación de este ion en la capa del lodo del tanque de sedimentación, a las partículas de fango se les pueden unir burbujas de gas (N_2) y ascender agregados de lodo a la superficie del tanque (Rittman y McCarty, 2001).

Las espumas o natas son originadas por microorganismos como *Microthrix parvicella, Nostocodia* sp *y Nocardia* sp entre otros (Schleenstein, 2002). Estas espumas

originadas por microorganismos son mucho más persistentes que las denominadas espumas blancas, causadas por agentes tensioactivos.

2.4. Contaminantes emergentes en aguas residuales

Durante varias décadas las investigaciones sobre el impacto de los contaminantes químicos se centraron casi exclusivamente en contaminantes "convencionales". En la actualidad estos compuestos son menos relevantes, sobre todo en los países más desarrollados, porque sus emisiones se han reducido (debido a medidas legales adoptadas) y el interés se ha centrado en contaminantes denominados "emergentes" que se encuentran en menores concentraciones en las aguas residuales, pero que pueden tener potenciales efectos muy nocivos para el medio ambiente.

En 1962, la bióloga norteamericana Rachel Carson publicó un libro titulado "Primavera Silenciosa" (Carson, 1962) donde, por primera vez se habló del peligro de usar DDT y otros productos químicos como plaguicidas. Esta autora denunció no sólo la toxicidad de estas sustancias sino también su capacidad para persistir en los organismos por medio de la acumulación en los tejidos grasos y su actuación como disruptores endocrinos. El título de su libro hace alusión a la posibilidad de tener una primavera sin pájaros, esto es, silenciosa, culpando de ello a la industria química y a la falta de control sobre las sustancias que produce. Este libro, que tuvo una gran repercusión y sentó las bases del movimiento ecologista, sirvió para concienciar sobre la dificultad de prever los efectos que algunas sustancias pueden tener en el ambiente.

Más recientemente, se han definido los contaminantes emergentes como: Contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma (Barceló, 2007). Los denominados "contaminantes emergentes" son contaminantes que actualmente no están incluidos en los programas de monitorización y seguimiento y cuya inclusión en la legislación como parámetros regulados, depende de la investigación sobre su toxicidad, efectos potenciales sobre la salud, percepción pública y de los datos obtenidos en su seguimiento, determinando su presencia en los distintos compartimentos del medio ambiente (NORMAN Project, 2005). Se caracterizan por la escasez de datos ambientales y métodos analíticos sensibles, lo que deriva en una no regulación de los mismos.

El término "contaminantes emergentes" no necesariamente corresponde a nuevos compuestos, engloba también a aquellas sustancias cuyos efectos adversos sobre los ecosistemas se desconocían, incluidos los compuestos de origen natural (Barceló, 2007).

En la actualidad existen numerosos grupos de compuestos que están despertando un particular interés como pueden ser (entre otros):

- ✓ Fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs: pharmaceuticals and personal care products).
- ✓ Pesticidas y sus productos de degradación o transformación.
- ✓ Productos desinfectantes.
- ✓ Ftalatos.
- ✓ Aditivos de las gasolinas.
- ✓ Detergentes de tipo alquilfenol etoxilado y derivados.
- ✓ Toxinas de algas y cianobacterias.
- ✓ Compuestos organometálicos.
- ✓ Compuestos organofosforados.
- ✓ Retardantes de llama (difénil éteres policromados).

2.4.1. Compuestos farmacéuticos

Los compuestos farmacéuticos, productos de cuidado personal, hormonas y drogas ilícitas (PPCPs) son considerados actualmente como contaminantes emergentes, puesto que son compuestos biológicamente activos, persistentes y algunos de ellos producen reconocidas afecciones del sistema endocrino (Daughton y Ternes, 1999; Fent et al., 2006; Lin et al., 2015). Entre ellos, los compuestos farmacéuticos se caracterizan por ser moléculas complejas, con diferentes grupos funcionales y propiedades físico-químicas y biológicas. Su peso molecular generalmente oscila entre 300 a 1000. Bajo las diferentes condiciones ambientales pueden comportarse como aniones, cationes o en forma zwiteriónica (Kümmerer, 2004).

El interés por los fármacos como sustancias tóxicas en el medio ambiente y la necesidad de evaluar su riesgo medioambiental ha ido en aumento desde el inicio de la década de los 90 (Miége et al., 2009).

Los compuestos farmacéuticos representan un grupo creciente de contaminantes orgánicos en las aguas residuales, al ser excretados en su forma original o como un derivado metabolizado tras ser consumidos por las poblaciones humanas (Radjenonovic et al., 2009). Las EDARs son los principales puntos de liberación de estos compuestos al medio ambiente (Castiglioni et al., 2006; Ternes, 1998; Radjenovíc et al., 2007; Carballa et al., 2004).

Los fármacos se clasifican, generalmente, según su efecto terapéutico y pueden distinguirse varios grupos:

- ✓ Antibióticos: entre los más importantes (en uso humano y veterinario) se encuentran: tetraciclinas, tilosina, cloranfenicol y fluoroquinolonas.
- ✓ Antiinflamatorios y analgésicos: los más empleados son el paracetamol, ibuprofeno, diclofenaco y ácido acetilsalicílico.
- ✓ Antidepresivos: los más frecuentes son las benzodiazepinas.
- ✓ Antipilépticos: el más común es la carbamazepina.
- ✓ Antineoplásicos: se emplean en el tratamiento del cáncer, por ejemplo: bisulfán.
- ✓ Antilipemiantes: se usan para bajar los niveles de colesterol en sangre, por ejemplo: fibratos y estatinas.
- ✓ Betabloqueantes: se emplean en afecciones cardíacas, por ejemplo, atenolol.
- ✓ Antiulcerosos y antihistamínicos: por ejemplo ranitidina y famotidina.
- ✓ Otras sustancias: drogas de abuso.

2.4.1.1. Ocurrencia, vías de exposición y efectos

Los hábitos de consumo actuales en las sociedades están generando una serie de residuos que hace unos años no existían. Entre los nuevos contaminantes aparecen los fármacos y los productos de higiene y cuidado personal (PPCPS).

Anualmente se emplean toneladas de sustancias farmacológicamente activas para el tratamiento y prevención de enfermedades. Por otro lado, en ganadería y acuicultura, existe una gran dependencia de los fármacos (la mayoría se administran como aditivos alimentarios) para prevenir enfermedades, como promotores del crecimiento o parasiticidas. El consumo anual de estos productos depende del tipo fármaco, puede variar entre unos pocos kilogramos y cientos de toneladas. Según Halling-Sørensen (Halling-Sørensen al, 1998) en Dinamarca en el año 1995 (5,2 millones de habitantes) se consumieron 33,2 toneladas de Ibuprofeno, 3,7 de Furosemida, 0,049 de Estradiol, 37,7 de antibióticos para uso humano y 2,5 de antibióticos, estos últimos, empleados como aditivos del alimento en ganadería (promotores del crecimiento). Por lo tanto, estos compuestos se utilizan en elevadas cantidades para el tratamiento humano y animal.

En la Unión Europea unas 3.000 sustancias están registradas como fármacos (Joss et al., 2006). Tras su uso, la mayor parte de estos compuestos orgánicos son excretados, entran en las aguas residuales y en las EDARs son sólo parcialmente eliminados (Clara et al., 2005; Miao et al., 2004; Petrovic et al., 2003; Ternes et al., 2003). Muchos fármacos resisten el metabolismo humano y se excretan en la forma original, otros, son metabolizados y excretados como metabolitos activos. Cuando ocurre, la biodegradación

de los compuestos farmacéuticos modifica su estructura química, lo que se traduce en un cambio en sus propiedades físico-químicas. Sin embargo este metabolismo generalmente es incompleto, el ratio de excreción oscila entre 0 y 100%. Existen dos vías de metabolismo:

- Fase I: se forman metabolitos mediante hidrólisis, oxidación, reducción, alquilación y des-alquilación.
- Fase II: los metabolitos generados en la fase I son modificados mediante una glucuronidación o sulfatación para favorecer la excreción.

Para poder identificar las rutas de exposición a estos compuestos es necesario realizar una división diferenciando entre uso médico y veterinario, aunque determinados fármacos pueden tener ambos usos (Jørgesen y Halling-Sørensen, 2000). En la Figura 6 se ilustran las vías de exposición a ambos tipos de fármacos.

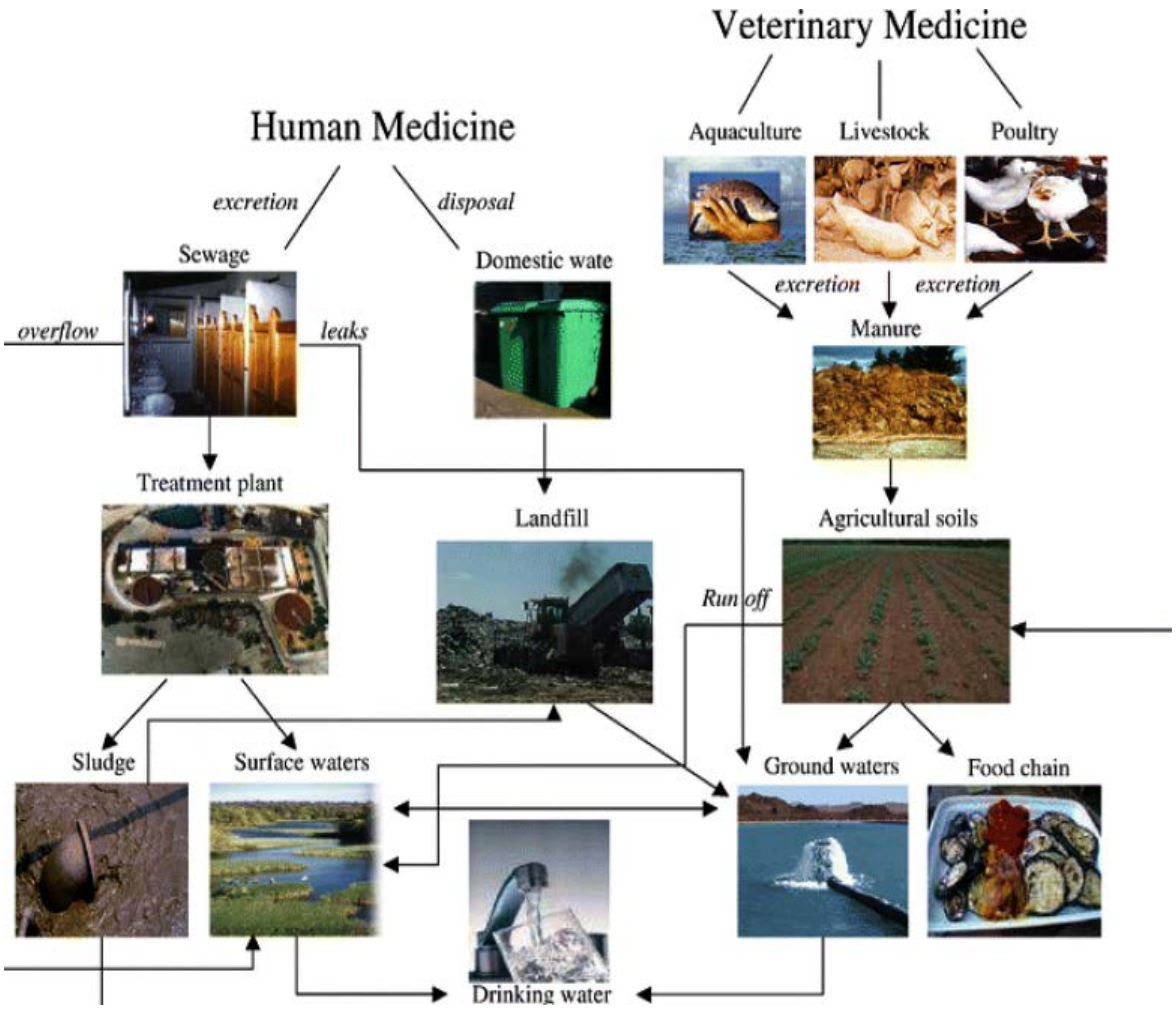


Figura 6: *Esquema que recoge las potenciales vías de exposición a fármacos de uso humano y veterinario (adaptado de Jørgesen y Halling-Sørensesn, 2000)*

Estos fármacos y sus metabolitos llegan a las EDARs y si estos sistemas de tratamiento no son capaces de eliminarlos completamente, pueden llegar a los cauces receptores e incluso incorporarse al agua potable. En ocasiones, los medicamentos excedentes o que están fuera de su periodo de caducidad son eliminados junto con los residuos urbanos, llegando a los vertederos donde por lixiviación pueden alcanzar las aguas subterráneas. En el caso de los fármacos de uso veterinario, son excretados junto con sus metabolitos en el estiércol. Éste es empleado en las granjas como abono de las tierras de cultivo por lo que estos contaminantes también llegan a los suelos. De ahí pueden pasar a las aguas superficiales arrastrados por el agua de lluvia. Por otro lado, los compuestos empleados en acuicultura pueden entrar directamente en aguas superficiales y sedimentos.

En la Directiva 93/39/EEC (reemplazada por la Directiva 2001/83/EC) se establece la evaluación del riesgo de los fármacos de uso humano. En 1996 una guía sobre la evaluación de riesgo de fármacos veterinarios (European Medicine Agency, EMEA, 1997) se completó e implementó en la U.E. En este año, un borrador sobre la evaluación de este riesgo (EMEA) se sometió a consulta y generó una fuerte oposición en algunos de los estados miembros de la U.E. En estos años se han emitido versiones mejoradas del mismo y han sido sometidas a diferentes consultas (EMEA, 2001/2003).

La importancia de estas sustancias como contaminantes con efectos perjudiciales para el medio ambiente reside en el hecho de que se han desarrollado con el fin de originar un efecto biológico. Aunque en los últimos años se han publicado numerosos artículos sobre la exposición y efectos de los compuestos farmacéuticos (Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton y Ternes, 1999; Jorgesen y Halling-Sørensen, 2000; Kummerer, 2001; Ternes et al., 2001; Heberer, 2002; Petrovic et al., 2003; Larsen et al., 2004; Jones et al., 2004; Kuster et al., 2004; Zwinner y Frimmel, 2004; Garric y Ferrari, 2005; Hernando et al., 2005; Fent et al., 2006; Zuccato et al., 2006), aún existe una información muy limitada sobre los efectos de estos compuestos en organismos en los ambientes acuáticos y terrestres. Se han encontrado efectos adversos a elevadas concentraciones (del orden de mg/L), sin embargo se han descrito estos efectos a muy bajas concentraciones en algas y bacterias. La mayor parte de los estudios se han realizado sobre compuestos disruptores endocrinos y antibióticos (Carballa, 2005). Por ejemplo, se han encontrado alteraciones reproductivas en la trucha arcoiris (*Oncorynchus mykiss*) a concentraciones inferiores a 1 ng/L (Segner et al., 2003; Metclafe et al., 2001). Por otro lado, se ha demostrado que los antibióticos pueden generar la aparición de bacterias resistentes en determinados ambientes (Ohlsen, et al., 2003).

En la Figura 7 se realiza un resumen de las vías de exposición, el destino y los principales efectos de estos contaminantes en el medio ambiente.

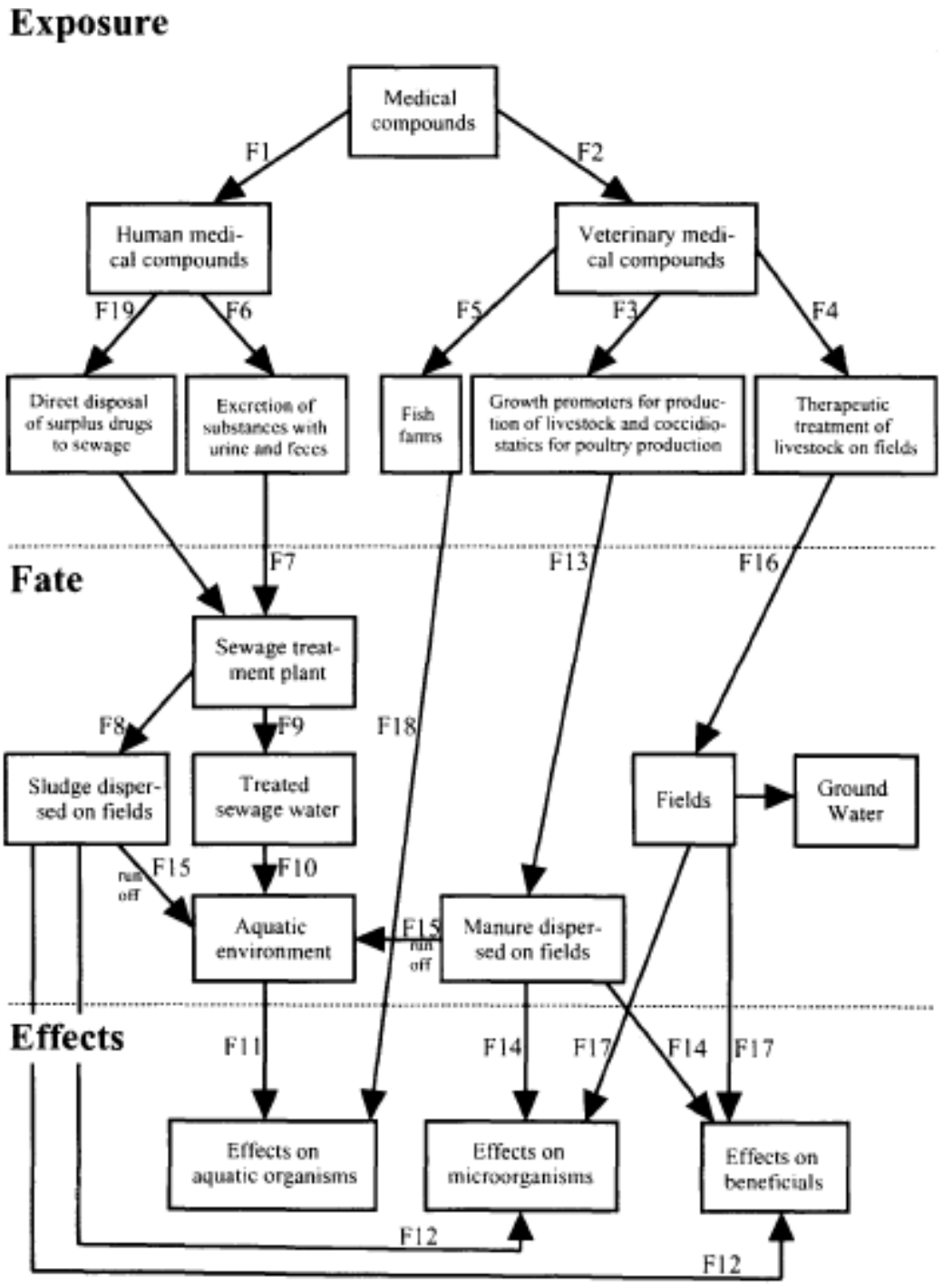


Figura 7: *Vías de exposición, destino y efectos de fármacos de uso humano y veterinario* (Halling-Sørensen, 1998)

2.4.1.2. Eliminación en sistemas de tratamiento

En los últimos años diversos estudios realizados en Europa y Norteamérica determinaron la presencia de compuestos farmacéuticos y estrogénicos en aguas residuales y ambientes acuáticos (Kolpin et al., 2000, Daughton y Ternes, 1999, Heberer, 2002). Como ya ha sido señalado en la sección anterior, estos compuestos son excretados, bien en forma no metabolizada o como metabolitos activos, llegando así a las aguas residuales. Las EDARs no fueron diseñadas para la eliminación de estos contaminantes emergentes de las aguas residuales, por lo que estos son eliminados sólo parcialmente. Como consecuencia, las propias EDARs son fuentes de estos contaminantes en el medio acuático, desde donde la contaminación se dispersa en el medio ambiente. Este paso hacia el medio ambiente depende de la combinación de varios factores: de la cantidad de fármaco que se produce, la dosis de aplicación y/o de la eficacia de excreción del compuesto original y sus metabolitos, pero también de la mayor o menor eliminación en las EDARs, esto es, de la adsorción/desorción en los fangos activados y de la descomposición metabólica en los sistemas de tratamiento (Díaz-Cruz, 2003).

La eficacia en la eliminación de estos compuestos en los sistemas de tratamiento depende en gran medida de la tecnología empleada en el tratamiento y de las propiedades físico-químicas de los contaminantes a eliminar. Los investigadores Kaspryzk-Horden et al. (2009) encontraron una alta eliminación (superior a un 85%) de 55 PPCPs en un sistema de tratamiento mediante fangos activados, mientras que en un sistema con filtros percoladores esta eficacia se reducía a menos del 70% de eliminación en todos los casos. Según estos autores, los efluentes tratados procedentes de las EDARs son las principales fuentes de PPCPs en los ríos y cauces receptores, ya que en ellas no son eliminados por completo, por lo que el efecto de estos vertidos sobre la calidad del agua de los cauces receptores es significativo y no puede pasarse por alto.

El comportamiento de los compuestos farmacéuticos en sistemas complejos como son los sistemas de tratamiento de aguas residuales depende de varios factores como son: pH, temperatura, TRH, concentración de biomasa, polaridad del compuesto, intercambio catiónico, biodegradabilidad etc. Estos compuestos pueden ser eliminados de la fase acuosa a través de procesos abióticos como puede ser la adsorción, hidrólisis, isomerización, o a través de transformaciones bióticas (biodegradación). La mayor parte de los estudios realizados se centran en la fase acuosa mientras que la fase sólida en muchas ocasiones no se tiene en cuenta. Sin embargo, estos contaminantes pueden ser adsorbidos en la estructura lipídica de las bacterias y en la fracción pesada del lodo mediante interacciones hidrofóbicas (por ejemplo: grupos alifáticos y aromáticos),

adsorbidos en estructuras de polisacáridos cargadas negativamente y situadas en la parte exterior de las células bacterianas a través de interacciones electrostáticas (por ejemplo grupos amino) o pueden unirse químicamente a las proteínas y ácidos nucleicos de las bacterias (Meakins et al., 1994). Además, otros mecanismos, como los puentes de hidrógeno e intercambio iónico, pueden intervenir en los procesos de adsorción (Tolls, 2001). Diversos autores han intentado determinar la contribución por separado de la adsorción y la biodegradación en la eliminación de estos contaminantes en los sistemas de lodos activados, basándose en los valores bibliográficos de coeficientes de distribución sólido/líquido (K_d) o mediante la determinación de las cantidades de estos compuestos adsorbidas y disueltas en experimentos realizados en batch (Kimura el at., 2007; Clara et al., 2005; Joss et al., 2006).

Los fármacos de uso humano entran en las EDAR junto con las heces y la orina. Según su comportamiento en estas instalaciones, estas sustancias se pueden clasificar en (Jørgesen y Halling-Sørensen, 2000):

- ✓ Fármacos o metabolitos de los mismos que son mineralizados por los microorganismos, por ejemplo la aspirina (Richarsdon y Bowron, 1985).
- ✓ Fármacos o metabolitos que son más o menos persistentes en la EDAR. Una parte de la sustancia puede ser retenida en el lodo dependiendo de su lipoficidad, interacciones iónicas o presencia de determinados grupos funcionales. Si posteriormente este lodo se emplea como abono, estos compuestos pueden dispersarse en los medios de cultivo.
- ✓ Fármacos o metabolitos muy polares que no son mineralizados por los microorganismos ni retenidos en el lodo. Son los que más fácilmente alcanzan los ambientes acuáticos al salir de la EDAR con el efluente tratado. Estos compuestos llegan de forma metabolizada y/o sin metabolizar a las aguas residuales tras el consumo humano y veterinario (Radjenovic et al, 2009).

Los estudios realizados indican que no todos los fármacos son totalmente eliminados de las aguas residuales por medio de los tratamientos convencionales de las EDARs y existen evidencias de que muchas de estas sustancias son poco o nada biodegradadas en el medio ambiente (Drewes, 2002).

Puesto que la reutilización del agua tratada se impone como la solución más adecuada para el futuro manejo sostenible del ciclo del agua, uno de los principales puntos a tener en cuenta en el reciclaje de las aguas residuales, es el problema de los contaminantes emergentes, como son los compuestos farmacéuticos, fragancias y

productos de cuidado personal, que son los principales contaminantes orgánicos traza de los ambientes acuáticos.

Compuestos farmacéuticos como los antibióticos o analgésicos se encuentran frecuentemente en aguas superficiales en concentraciones que alcanzan los microgramos por litro (Kasprzyk-Hordern et al, 2009).

También están surgiendo nuevos estudios que evalúan el riesgo de los contaminantes orgánicos en ambientes acuáticos, basados en la determinación de las concentraciones y en los datos de toxicidad de los compuestos de forma individual. Sin embargo, todos los contaminantes además de sus efectos individuales pueden mostrar efectos sinérgicos como componentes de mezclas complejas (Wang et al, 2002).

Dentro del grupo de los fármacos, hay dos subgrupos que presentan especial importancia por los potenciales efectos que puede tener su presencia en las aguas residuales y su persistencia en las aguas tratadas. Estos dos subgrupos son los antibióticos y los disruptores endocrinos (compuestos hormonales). Dentro de estos dos subgrupos el trabajo se ha centrado en los antibióticos por lo que simplemente se incluye una breve información sobre los disruptores endocrinos, profundizando más en los antibióticos.

Disruptores endocrinos

Un compuesto disruptor endocrino puede definirse como "una sustancia exógena que causa efectos negativos en la salud de los organismos, o en su descendencia como consecuencia de cambios en la función endocrina" (Comisión Europea, 1996). Son compuestos que incluso a muy bajas concentraciones pueden afectar o interferir con el sistema endocrino. Por lo tanto, se trata de contaminantes que son potencialmente muy perjudiciales para la salud puesto que el sistema endocrino produce hormonas que controlan el desarrollo, crecimiento, reproducción y comportamiento de los seres humanos y animales.

Existen numerosos estudios sobre los efectos de estos contaminantes en organismos del medio natural, los más significativos son: disminución de la fertilidad y el crecimiento, alteraciones sexuales, problemas en las cáscaras de los huevos y un funcionamiento tiroideo anormal. Se han determinado también una serie de efectos sospechosos en el ser humano: malformaciones en recién nacidos, problemas en los testículos, esperma anormal, posible cáncer de testículos y próstata entre otros muchos.

Se sabe que un amplio número de compuestos tienen la capacidad de interferir con el sistema endocrino, las evidencias sobre este comportamiento se han obtenido mediante observaciones sobre moluscos, crustáceos, peces, reptiles, pájaros y determinados mamíferos. Entre los compuestos que se ha comprobado que son disruptores endocrinos se incluyen: hormonas naturales, hormonas sintéticas,

compuestos naturales como los fitoestrógenos producidos por plantas y otros productos químicos como son los alquilfenoles, determinados cosméticos y fármacos, plaguicidas, compuestos organohalogenados e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Si se ordenan estos compuestos en función de su actividad estrogénica en base a varios estudios realizados (Hansen et al., 1998), la lista estaría encabezada por la hormona de origen natural 17β-estradiol y el estrógeno sintético más común, el etinil-estradiol (López de Alda, 2001).

Durante las últimas cinco décadas, el consumo de estrógenos en medicina (contracepción, tratamiento de la menopausia, etc) y veterinaria (promotores del crecimiento, desarrollo de poblaciones unisexuales en acuicultura, etc) se ha visto incrementado. Los estrógenos no se metabolizan completamente y pueden llegar a los ambientes acuáticos principalmente como efluentes de las EDARs. Recientes estudios han demostrado que los efluentes de sistemas de tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales constituyen la principal fuente de disruptores endocrinos en los ambientes acuáticos (Larsson et al., 1999). La falta de conocimiento sobre su toxicidad, niveles de exposición e impacto en los ecosistemas ha incrementado el interés sobre su presencia en el medio ambiente (Gabet, 2007).

2.5. Antibióticos

Los antibióticos forman parte de los denominados “contaminantes emergentes”, dentro del grupo de los compuestos farmacéuticos. Recientemente han sido catalogados como prioritarios debido a su toxicidad demostrada sobre algas y bacterias y su potencial generación de resistencia bacteriana (Watkinson et al., 2009).

Se definen como compuestos naturales, semisintéticos o sintéticos, con actividad antimicrobiana, que pueden ser aplicados por vial oral, parental o tópica. Se caracterizan por presentar diferentes mecanismos y espectro de acción a la hora de inhibir el crecimiento o la supervivencia de una o más especies de microorganismos y ser efectivos a bajas concentraciones.

Se emplean ampliamente en medicina humana y veterinaria con el propósito de prevenir o tratar infecciones microbianas pero además en ganadería se usan también como promotores del crecimiento (engorde de los animales).

Una sustancia presenta actividad antibiótica, cuando inhibe el crecimiento o la supervivencia de una o más especies de microorganismos y es efectiva a bajas concentraciones.

Se pueden clasificar en función de su estructura, su mecanismo de acción o por el tipo de actividad que desempeñan.

2.5.1. Ocurrencia y vías de exposición

Según los datos de la Federación Europea de Salud (European Federation of Health), en 1999 se emplearon 13.288 toneladas de antibióticos en la U.E. De esta cantidad un 65 % se usó para el tratamiento en humanos, 29% en tratamiento animal y un 6 % como promotores del crecimiento en ganadería. Según Wise (Wise, 2002) en el año 2002 se utilizaron en todo el mundo entre 100.000 y 200.000 toneladas de antibióticos. Según el artículo de Zhang (Zhang et al, 2015), en un estudio realizado en 2013 se utilizaron en China 92.700 toneladas de las cuales estimaban que 53.800 toneladas entrarían en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

En la Tabla 9 se presenta un resumen de los principales grupos de antibióticos y sus aplicaciones.

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones sobre la presencia y destino de los antibióticos en los ambientes acuáticos. Estos estudios revelaron la presencia de más de 30 tipos de antibióticos en muestras de afluentes y efluentes de EDARs, en aguas superficiales e incluso en aguas subterráneas y potables (Kemper, 2008).

Al igual que se expuso para el grupo de los compuestos farmacéuticos, los antibióticos son parcialmente metabolizados por los organismos y son excretados en la forma original (Hirsch et al., 1999) o como metabolitos cuyo destino son las estaciones de tratamiento de las aguas residuales. La mayor parte de estos compuestos son solubles en agua por lo tanto aproximadamente un 90% de la dosis suministrada puede ser excretada con la orina y más de un 75% con las heces (Halling-Sørensen, 2001).

El uso masivo de antibióticos está elevando de forma significativa la concentración de estos compuestos en las aguas residuales. Se emplean grandes cantidades en medicina para el tratamiento de enfermedades. Tras la administración, estas sustancias o sus metabolitos son excretados y llegan a las EDARs, donde si no son completamente eliminados, pueden llegar a los cauces receptores. Esto está sometiendo a muchas comunidades microbianas a una fuerte presión selectiva, eliminando las bacterias sensibles a los antibióticos, patógenas o no, y favoreciendo por tanto la proliferación de las bacterias multirresistentes.

Los centros de salud, especialmente los hospitales, constituyen importantes focos de emisión de estos compuestos que, a través del alcantarillado, llegan finalmente a las EDARs.

Los tratamientos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) no eliminan completamente estos productos que terminan por alcanzar los ecosistemas acuáticos. Esto se traduce en que muchos de ellos pueden encontrase en aguas naturales en concentraciones del rango de μg/L.

Tabla 9: *Grupos de antibióticos, compuestos representativos, usos y posibles efectos secundarios, adaptado de Kemper (2008)*

Grupo	Compuestos (Ej.)	Uso	Efectos secundarios
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Humanos, vacas, ovejas y cerdos	Hepatotóxico
	Clortetraciclina	Vacas y cerdos	
	Doxiciclina	Humanos, gatos, perros y cerdos	
	Tetraciclina	Humanos, caballos, ovejas y cerdos	
Macrólidos	Tilosina	Sólo en animales	--
	Azitromicina	Humanos	
	Claritromicina	Humanos	
	Eritromicina	Humanos, vacas y pollos	
	Roxitromicina	Humanos	
	Vancomicina	Humanos	
	Espiramicina	Animales	
Lincosamidas	Lincomicina	Cerdos, vacas, gatos y pollos	Efectos gastrointestinales
	Clindamicina	Humanos y perros	
B-lactámicos: penicilinas	Amoxicilina	Humanos y animales	Reacciones alérgicas
	Ampicilina	Humanos y animales	
	Penicilina G	Humanos	
	Bencilpenicilina	Animales	
B-lactámicos: Cefalosporinas	Cefalexina	Perros	Reacciones alérgicas
	Cefalotina	Humanos	
	Cefotaxima	Humanos	
Fenicoles	Cloranfenicol	Perros y gatos	Anemia
Aminoglucósidos	Gentamicina	Humanos y animales	Neurotóxico
	Neomicina	Animales	
	Estreptomicina	Obsoleto	
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Humanos	Nefrotóxico
	Sulfapiridina	Cerdos	
	Sulfadimidina	Vacas, ovejas y pollos	
Fluoroquinolonas	Flumequin	Humanos	
	Ofloxacin	Humanos	

2.5.2. Eliminación en sistemas de tratamiento

Los antibióticos pueden afectar a las comunidades microbianas presentes en los sistemas de tratamiento. La inhibición de la actividad de estas bacterias afecta negativamente al rendimiento de depuración del sistema.

En diferentes estudios se ha observado una reducción del número de bacterias junto con alteraciones en las poblaciones bacterianas en sistemas de tratamiento a los que se han aplicado antibióticos en concentraciones similares a las que aparecen en aguas residuales hospitalarias (Kümmerer et al., 2000).

En los últimos años se está haciendo hincapié en que no se puede confiar únicamente en sistemas de tratamiento "eficaces", se tiene que limitar la entrada de los antibióticos en las aguas residuales y aumentar su biodegradabilidad. Se debe evitar que entren en los sistemas de tratamiento donde pueden ser parcialmente eliminados o transformados en nuevos productos que pueden tener también efectos adversos (Haddad et al, 2015).

2.5.3. Potenciales efectos: resistencia bacteriana

El uso indiscriminado de antibióticos en las prácticas médicas y veterinarias se traduce en un vertido hacia el medio ambiente de una cantidad ingente de estas sustancias. Se sabe que los antibióticos a concentraciones inferiores a la de inhibición pueden tener un impacto sobre el funcionamiento de las células y cambiar la expresión genética transmitiendo resistencia a los mismos (Ohlsen et al., 2004; Salyers et al., 1995). Las bacterias adquieren esta resistencia de forma relativamente fácil.

Bacterias patógenas y potencialmente patógenas para el ser humano y los animales son constantemente liberadas en los ambientes acuáticos a través de las aguas residuales. Muchas de esas bacterias albergan en su interior genes de resistencia a antibióticos, generalmente insertados en plataformas genéticas móviles como pueden ser los plásmidos, capaces de difundir este material genético entre las comunidades bacterianas de los ambientes acuáticos y los suelos (Alonso et al., 2001; Baquero et al, 2008). El agua constituye un medio de propagación de los microorganismos resistentes a los antibióticos, en estos sistemas, bacterias no patógenas pueden constituir reservorios de genes de resistencia. La introducción en el medio de agentes antimicrobianos contribuye a la evolución y diseminación de estos microorganismos.

La problemática de la resistencia bacteriana ha ido aumentando en los últimos años hasta el punto que para todo tipo de antibiótico ya se han descrito aislamientos de bacterias resistentes.

Están surgiendo nuevas investigaciones sobre la aparición de resistencia a ciertos antibióticos en bacterias coliformes fecales en los sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, así como el estudio de la supervivencia de estas bacterias en los procesos de secado de los lodos, determinando si pueden llegar también a los campos de cultivo cuando estos lodos son utilizados como enmienda orgánica de los suelos. Según estos estudios, el tratamiento mediante lodos activados no incrementa la resistencia bacteriana en las bacterias coliformes fecales, se encontraron niveles similares en el agua sin tratar (71.05%) y tratada (77.77%), (Fars et al, 2005).

Aunque la generación de resistencia bacteriana es el principal potencial efecto adverso que pueden tener estos compuestos en el medio, también representan un riesgo para la salud humana debido a la posible aparición de alergias a los mismos (Mellon et al., 2001). Estas reacciones pueden ser generadas por determinados antibióticos como las penicilinas.

2.6. Contaminantes seleccionados en el estudio

El estudio se centró en el grupo de los antibióticos. Dentro de este grupo de contaminantes emergentes fueron seleccionados en base a datos sobre su frecuencia de uso y posible presencia en las aguas residuales: oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina (tetraciclinas); tilosina (macrólido) y amoxicilina (β-lactámico).

En este trabajo se estudió la eliminación de estos cinco antibióticos en sistemas de tratamiento mediante lodos activados aplicados a aguas residuales y a purines. Adicionalmente se evaluó la influencia que ciertos parámetros de estos sistemas tienen en esta eliminación.

2.6.1. Tetraciclinas

Se trata de un grupo de antibióticos ampliamente utilizado en veterinaria (acuicultura, ganado porcino y avícola) en las últimas décadas. Constituyen una de las familias de antibióticos, estando dentro del ranking de los 10 antibióticos más utilizados como promotores del crecimiento animal en USA. Sin embargo, como otros muchos antibióticos, son relativamente poco metabolizadas por los animales y los humanos, por lo tanto una importante fracción es excretada en la orina y heces (Gu et al, 2006).

La resistencia a la tetraciclina es mediada por plásmidos, por lo tanto, las bacterias se hacen resistentes sólo después de expuestas al antibiótico y son capaces de trasmitir esta resistencia a otras bacterias mediante la transferencia plasmídica.

Debido a su amplio espectro se emplean comúnmente para el tratamiento de infecciones originadas por bacterias gram positivas y gram negativas, inhibiendo la síntesis de proteínas. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste, es necesario su difusión pasiva por la membrana celular exterior. Una vez en el interior de la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas, impiden el acceso del aminoacil RNAt al sitio aceptor del complejo RNAm ribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.

En las dosis habituales las tetraciclinas producen *in vitro* un efecto bacteriostático. Sin embargo, en altas concentraciones se alcanza un efecto bactericida. En general se observa bastante similitud *in vitro* e *in vivo*.

En la farmacopea moderna, las tetraciclinas son consideradas drogas principales en presencia de *Ricketsias, Micoplasmas* y *Chlamydia spp.* Así también pueden ser usadas preferencialmente con algunos bacilos gramnegativos como *Brucella, Haemophilus ducrey* y la *Pseudomona pseudomallei, Vibriones* y en afecciones producidas por *Borrelia,* también pueden ser útiles ante algunos parásitos como son amebas y *Enterobius vermicularis*.

Las tetraciclinas han perdido parte de su utilidad inicial debido a la aparición de cepas resistentes.

Generalmente, todas las tetraciclinas se absorben en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente a nivel del estómago e intestino delgado superior, la absorción es menos completa a nivel del tracto intestinal inferior.

Se distribuyen ampliamente en los tejidos, se metabolizan en el hígado y se concentran en la bilis. Se excretan principalmente a través de esta última y por la orina.

2.6.2. Tilosina

Los antibióticos macrólidos tienen un amplio uso tanto en enfermedades humanas como animales. Entre ellos, los más consumidos son Eritromicina, Claritromicina, Tilosina y Roxitromicina. Se trata de moléculas básicas y lipofílicas con un anillo de lactona al cual se unen, mediante enlaces glicosídicos, grupos amino y desoxiazúcares. Generalmente son inestables en medio ácido.

Es un antibiótico utilizado ampliamente en ganadería (porcina) como promotor del crecimiento y con fines terapéuticos (Kolz et al, 2005).

La tilosina engloba a una serie de compuestos relacionados entre sí y que suelen aparecer juntos. El compuesto mayoritario es la Tilosina A, pero junto a él aparecen otros

muchos como la Tilosina B o Desmicosina, la Tilosina C o Macrosina y la Tilosina D o Relomicina (Kolz et al., 2005). Están constituidos por un anillo de lactona de 16 miembros con hasta tres radicales sustituidos por glúcidos (micaminosa, micinosa y micarosa).

2.6.3. Amoxicilina

Es una penicilina semisintética de amplio espectro y acción bactericida. Químicamente es la D (-) α-amino-p-hidroxibencil penicilina trihidratada, se trata de un antibiótico β-lactámico.

Se trata de un antibiótico de amplio uso en humanos. Se emplea también en animales para el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Es extremadamente activa frente a microorganismos gram positivos y negativos (Douša et al, 2004), incluidos varias enterobacterias patógenas. Suele añadirse junto con el alimento del ganado a niveles de 250-400 mg/kg debido a su resistencia al fluido gástrico (Pérez-Lozano et al, 2006).

En el capítulo 4 se recoge más información (propiedades físico-químicas) de estos cinco antibióticos.

Capítulo 3

Materiales y métodos

Como ya se indicó inicialmente, en este capítulo se incluyen los materiales y métodos generales utilizados, con excepción de los métodos cromatográficos que se incluyen en el capítulo 4 donde se recoge el procedimiento y resultados de su puesta a punto y validación analítica.

En este capítulo también se detallan los materiales y la descripción del diseño de las instalaciones y sistemas de tratamiento a escala de laboratorio (plantas piloto).

3.1. Reactivos y patrones generales

El grado de pureza o calidad de los reactivos empleados se determinó en función del uso de los mismos, en la Tabla 10 puede verse los reactivos empleados en este trabajo junto con su grado de pureza.

Tabla 10: *Usos y calidad de reactivos empleados*

Uso	Calidad	Proveedor
Preparación del agua residual sintética	Reactivos puros (PRS)	Panreac (Barcelona, España) Fluka (St. Louis, EEUU) Prolabo (St. Louis, EEUU)
Medios de cultivo bacterianos	Reactivos puros (PRS)	Panreac (Barcelona, España) Fluka (St. Louis, EEUU)
Reactivos análisis parámetros químicos (DQO, DBO, etc)	Reactivos de pureza analítica (PA) Reactivos puros (PRS)	Panreac (Barcelona, España) Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU) Fluka (St. Louis, EEUU) VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia)
Agua para la preparación de alimentación	Agua destilada	Equipo de destilación BUCHI (Postfach, Switzerland)
Agua milli Q	Agua ultra-pura	MILLIPORE (Bedford, Massachussets, USA)

Los patrones de antibióticos utilizados tanto en el desarrollo de métodos analíticos, como en los ensayos en los distintos reactores a escala de laboratorio fueron suministrados por Laboratorios Syva. Los patrones del resto de compuestos objeto de estudio fueron del proveedor Riedel de Häen. La pureza (assay) del principio activo en todos ellos se encontraba entre 85-100% (según los correspondientes certificados de análisis). Se realiza una descripción más detallada de los reactivos y patrones utilizados en los análisis cromatográficos en el capítulo siguiente (Capítulo 4).

3.2. Sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala de laboratorio

3.2.1. Diseño

Para la realización de los distintos ensayos, se diseñaron sistemas de tratamiento de lodos activos a escala de laboratorio que simulaban a pequeña escala el funcionamiento de un sistema convencional de tratamiento de aguas residuales. Reproducían las etapas de tratamiento secundario (tratamiento biológico) y decantación secundaria presentes en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR).

Este diseño básico fue común para los sistemas empleados en los diferentes ensayos, aunque para cada uno de ellos se realizaron diversos cambios y ajustes que se detallan junto con los parámetros operacionales en los capítulos correspondientes.

Los componentes básicos de las plantas depuradoras a escala de laboratorio fueron los siguientes:

a) Reactor: tanque dotado de una vía de salida regulada mediante una llave a modo de purga y comunicado con el decantador mediante dos conducciones unidas por una pinza de rótula. Su capacidad varió entre el mayor de 4 L (plantas piloto correspondientes a los ensayos sobre la influencia del tiempo de retención hidráulico y la carga másica) y el menor de 2 L (plantas piloto correspondientes a los ensayos sobre la influencia del tipo de comunidad bacteriana predominante).

b) Decantador: depósito de cuerpo cilíndrico y extremo cónico comunicado con el reactor, de capacidad inferior a la de éste (unos 2-3L) y de diseño más estrecho y alto. Comunicado con el exterior mediante una conducción a modo de salida del efluente depurado.

c) Sistema de recirculación: estructura tubular que comunicaba el fondo del decantador con el extremo superior del reactor. Permitía mantener una recirculación constante de lodo desde el decantador al reactor. En los sistemas aerobios el caudal de recirculación se impulsaba mediante un aireador, en el caso de los sistemas anóxicos la recirculación se realizaba mediante una bomba peristáltica.

d) Bomba dosificadora de caudal variable: permitía mantener una alimentación constante de las plantas piloto. Se utilizaron bombas peristálticas (Masterflex®) y magnéticas (ProMinent Beta ® BT4A).

e) Aireadores: suministraban oxígeno en el reactor de los sistemas aerobios y simultáneamente permitían mantener el lodo activo del reactor en constante agitación. Se complementaron con sistemas dosificadores (formados por materiales porosos) que permitían una dosificación uniforme del aire. Para el caso del proceso anóxico, no se emplearon aireadores, la agitación se realizó mediante un agitador mecánico (Heidolph ® RZR2041).

f) Depósitos de alimentación: tanques que contenían el agua residual sintética de alimentación de las plantas piloto. Como depósitos se utilizaron recipientes de plástico de 10, 25 y 50 L. Durante el periodo de aplicación de los antibióticos en el agua residual, se sustituyeron los bidones de plástico por recipientes de aluminio para evitar potenciales problemas de adsorción de los compuestos objeto de estudio.

g) Depósitos de recogida del efluente tratado: similares a los de entrada. En este caso no se utilizaron bidones de aluminio ya que no hubo problemas de adsorción debido a que las muestras del efluente se tomaron directamente de la salida del decantador.

En la Figura 8 puede verse la imagen real de uno de estos sistemas de tratamiento con cada uno de sus componentes identificados.

Los sistemas de tratamiento a escala de laboratorio se fabricaron en metacrilato o en vidrio. El diseño se complementó con diversas tuberías de goma y conducciones de material de elevada resistencia a la fricción (Masterflex®) para las bombas.

En todos los casos, las paredes del reactor y decantador se protegieron de la luz mediante plásticos oscuros y papel de aluminio para evitar el crecimiento de algas que pudieran afectar al desarrollo de las poblaciones bacterianas de interés, y por lo tanto influir sobre el rendimiento de los sistemas.

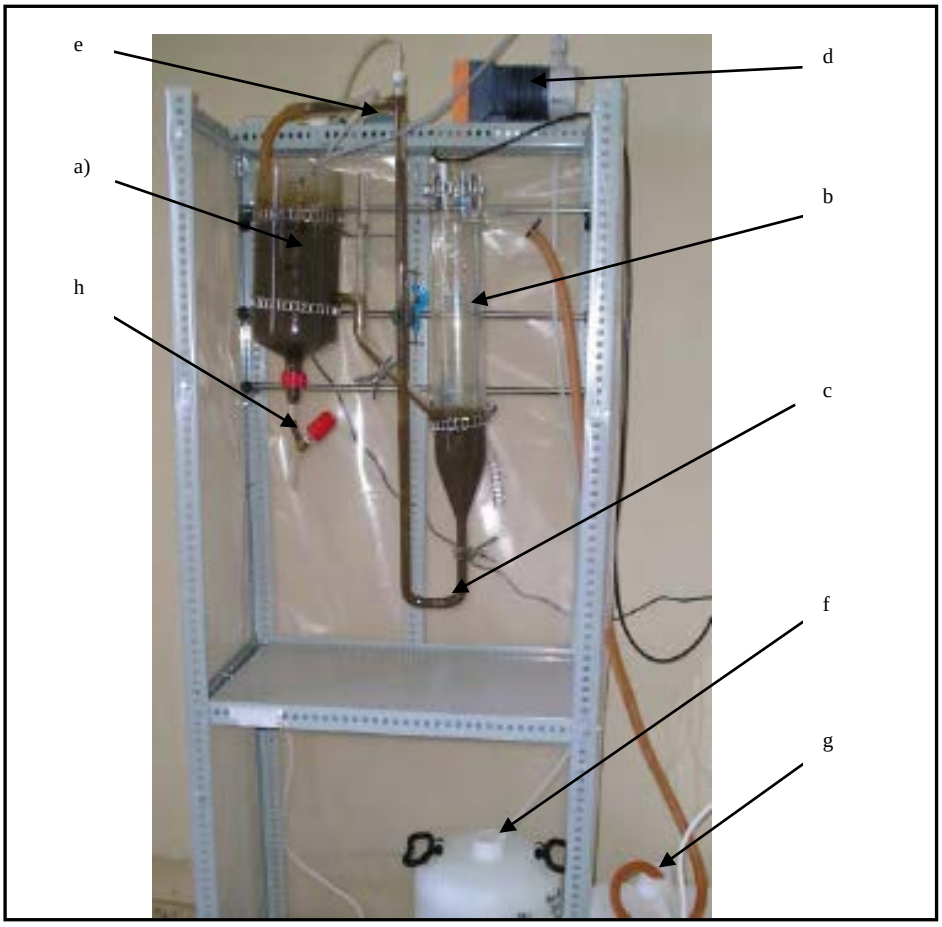


Figura 8: *Imagen de una de las plantas piloto. Componentes: .a) reactor, b) decantador, c) recirculación, d) bomba dosificadora, e) aireadores, f) depósito de alimentación, g) depósito de salida, h) purga del reactor.*

3.2.2. Agua residual sintética

En todos los ensayos se utilizó un agua residual sintética de composición controlada. La modificación de la misma permitió realizar los ensayos sobre la influencia del tiempo de retención, carga másica y comunidades bacterianas predominantes, en la eliminación de los distintos contaminantes estudiados.

Para establecer la composición del agua residual sintética se consideró como referencia un agua residual urbana de media carga contaminante (Metcalf y Eddy, 1995). La composición de la misma puede verse en la Tabla 11.

Tabla 11: *Composición típica del agua residual doméstica bruta. (Resumido de Metcalf-Eddy, 1995)*

Composición	Unidades	Agua residual urbana de media carga
SSV	mg/L	165
DBO	mg/L	220
DQO	mg/L	500
Nitrógeno total (N)	mg/L	40
Fósforo total (P)	mg/L	8
Cloruros	mg/L	50
Sulfato	mg/L	30
Alcalinidad ($CaCO_3$)	mg/L	100
Grasa	mg/L	100

Una vez establecida una composición aproximada y tras una revisión bibliográfica, se seleccionaron los componentes más adecuados para la preparación del agua residual. Estos compuestos se recogen en la Tabla 12.

Tras diversas pruebas utilizando distintas cantidades de cada uno de ellos, se determinó la composición definitiva del agua residual para cada ensayo concreto. Esta composición puede verse junto con los parámetros de operación específicos en los capítulos correspondientes a cada uno de ellos (capítulos 5 y 6).

Tabla 12: *Componentes del agua residual sintética.(Adaptado de Vives, 2005)*

Fuente de Carbono	Acetato de Sodio Propionato de Sodio Almidón Triptona Etanol Extracto de carne
Fuente de Nitrógeno	Cloruro Amónico
Microelementos	Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado Cloruro de Zinc dihidratado Cloruro de Cobre (II) dihidratado Sulfato de Magnesio dihidratado Cloruro de hierro (III) hexahidratado Cloruro de Calcio dihidratado
Fuente de Fósforo	Dihidrogeno fosfato de Potasio Hidrogeno Fosfato de Disodio
Alcalinidad	Bicarbonato Sódico

3.2.3. Lodo activo

Los sistemas de tratamiento a escala de laboratorio, salvo los correspondientes a los ensayos sobre la influencia en la eliminación de determinados contaminantes de las poblaciones bacterianas dominantes, fueron inoculados con lodos procedentes de uno de los reactores biológicos de la estación depuradora de aguas residuales de León y su alfoz. El lodo para la inoculación se extrajo de un tanque biológico rectangular con capacidad para unos 10.000 m^3 y cinco carriles de flujo pistón, el primero anaerobio con agitación mecánica y los restantes aerobios con soplantes (de uno de ellos, aerobio, se tomó la muestra de lodo). La edad del lodo se estimó en aproximadamente 16 días.

En el caso de las plantas piloto correspondientes a los ensayos sobre la influencia de las comunidades bacterianas dominantes (plantas de nitrificación, desnitrificación y actividad heterótrofa aerobia) fueron inoculadas con lodos procedentes de un reactor a escala de laboratorio situado en la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (Reactores piloto de Reif, 2006).

En el proceso de inoculación con el lodo procedente de la EDAR de León, no fue necesario realizar ninguna dilución ya que la concentración de sólidos suspendidos volátiles era de unos 2500 – 3000 mg/L, valor considerado óptimo para iniciar los ensayos. Por el contrario, el lodo del reactor piloto del laboratorio de Santiago de Compostela, presentaba un valor de 10.000 mg/L y fue necesario realizar una dilución 1:3 con agua destilada para alcanzar un valor de SSV próximo a los 3000 mg/L.

Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron en una primera fase de aclimatación hasta que los rendimientos de depuración alcanzaron unos valores constantes (etapa descrita en capítulos correspondientes).

3.3. Control de parámetros físico-químicos

En este apartado se describen los métodos que fueron empleados para la determinación de los parámetros convencionales que caracterizan típicamente a los sistemas de tratamiento de aguas residuales y que se utilizan para realizar un seguimiento de su funcionamiento.

Como puede verse en los capítulos 5 y 6, se realizó un seguimiento periódico de los mismos en cada una de las plantas, con el fin de monitorizar el funcionamiento de las citadas plantas de tratamiento.

Los análisis se realizaron según las técnicas especificadas en el “Standard Methods for the examination of water and wastewater” (APHA, 1999).

En todos los casos, en el muestreo periódico se tuvo en cuenta el máximo tiempo de almacenamiento y conservación de muestras, de acuerdo a las recomendaciones establecidas por la EPA (Environmental Protection Agency), (EPA-600/4-82-0129) y el libro “Standard Methods for the examination of water and wastewater” (APHA, 1999).

3.3.1. Velocidad de sedimentación e índices volumétricos

La determinación del índice volumétrico, también denominando Índice de Mohlman se llevaba a cabo dejando sedimentar el lodo durante 30 minutos, al cabo de los cuales, se medía el volumen ocupado por los mismos. Una vez conocida la concentración de biomasa en la probeta (cono Imhoff) se podía calcular el volumen ocupado por los gramos de biomasa presentes en la misma. Este parámetro daba una idea de lo mucho que se puede compactar un lodo, de forma que cuanto menos sea el volumen que ocupa una vez sedimentado, menor tamaño ha de tener el sistema de sedimentación que se requiera. Se define como el volumen que ocupa un gramo de lodo y se expresa según la Fórmula 3.1,

donde V_{30} es el volumen del lodo al cabo de los 30 minutos (mL) y X es la concentración de sólidos totales del lodo (g).

$$SVI(mL/g) = \frac{V_{30}}{X} \qquad \text{(ec. 3.1)}$$

Este parámetro da una idea del grado de compactación del lodo, así en la Tabla 13 se enumeran valores de este parámetro asociados a características de compactación del lodo.

Tabla 13: *Relación entre valores de SVI y grado de compactación del lodo. Adaptado de Grady et al, 1999*

SVI (mL/g)	Compactación lodo
<80	Excelente
80-150	Moderada
>150	Pobre

Este parámetro se determinó en momentos puntuales durante el funcionamiento de las plantas piloto a escala de laboratorio, no fue un parámetro controlado en rutina.

3.3.2. Temperatura y pH

Pese a que la temperatura en los sistemas biológicos aerobios no es un parámetro tan crítico para el rendimiento como en los sistemas anaerobios, es importante realizar un control de la misma ya que afecta a todos los gases en disolución (incluido el oxígeno), a la velocidad de las reacciones químicas y a las tasas de crecimiento de los microorganismos. Por lo tanto, se mantuvo monitorizada en todos los casos para controlar que no se produjeran elevadas fluctuaciones. Al tratarse de plantas piloto situadas dentro de un laboratorio estas fluctuaciones resultaban bastante improbables.

El pH es uno de los parámetros utilizados en el seguimiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Afecta a la presencia de metales en disolución y al equilibrio $NH_4^+ \leftrightarrow NH_3$. Su control es importante para mantener la actividad biológica y en muchos casos, es indicador de posibles problemas en los mismos, por ejemplo, un descenso brusco del mismo puede indicar la presencia de hongos en el sistema.

Ambos parámetros se determinaron mediante un electrodo conectado a un sistema de medida. Se utilizaron dos pH-metros (Multical pH 526, WTW y Crison GLP22) calibrados y verificados diariamente con dos disoluciones estándar de pH 4,00 y 7,02.

3.3.3. Oxígeno

El contenido en oxígeno es útil como indicador de posible contaminación (en cauces) y para el dimensionado de tratamientos aerobios. Es directamente dependiente de los valores de temperatura y afecta a los valores de potencial redox. Se determinó mediante un electrodo específico (equipo Multical WTW).

3.3.4. Sólidos en suspensión

El término sólidos en suspensión se aplica a un conjunto heterogéneo de sólidos que pueden llevar las aguas y que son los responsables del grado de turbidez de las mismas. Los sólidos suspendidos totales (SST), son los sólidos retenidos por filtración a través de un tamaño de poro de 0,45 µm y los sólidos suspendidos volátiles (SSV), es la fracción de los SST que desaparece por volatilización o combustión a 550°C. Estos últimos se relacionan con la materia orgánica suspendida y son indicadores de la biomasa de los reactores biológicos. Se determinaron conforme a los apartados 2540D y 2540E del libro "Standard Methods for the examination of water and wastewater" (APHA, 1999). Para ello, se filtraba un volumen conocido (V) de muestra a través de un filtro Whatman GF/A 0,45 µm de 47 mm de diámetro, previamente pesado (W1). Seguidamente se introducía el filtro en una estufa a 105°C hasta alcanzar un peso constante (pesado tras dejarlo atemperar en un deseador), (W2). La cantidad de SST se calculaba conforme a la ecuación (3.2). Para los SSV el mismo filtro se introducía en una mufla a 550°C hasta peso constante, (W3). La cantidad de SSV se calculaba según la Fórmula (3.3).

$$SST(g/L) = \frac{W_2(g) - W_1(g)}{V(L)} \qquad \text{(ec. 3.2)}$$

$$SSV(g/L) = \frac{W_3(g) - W_2(g)}{V(L)} \qquad \text{(ec.3.3)}$$

3.3.5. Carbono Orgánico Total (TOC)

El carbono orgánico total es independiente del estado de oxidación de la materia orgánica. Es la medida directa del carbono contenido en una muestra, excluyendo previamente el carbono inorgánico. Es un método rápido de estimación de la DQO en agua. Para su determinación (de forma puntual, no era una determinación realizada rutinariamente) en el laboratorio de la Universidad de Santiago de Compostela, se realizaba una dilución de las muestras y se filtraban a través de un filtro de 0,45 µm.

Después se analizaban mediante un analizador (Shimadzu TOC-5000). El TOC se calculaba a partir de la diferencia entre el carbono total (TC) y el inorgánico (TIC). El TC se determinaba en base a la cantidad de CO_2 producido durante la combustión de la muestra a 680°C, utilizando como catalizador platino inmovilizado sobre esferas de alúmina. El TIC se obtenía a partir de la medida mediante un analizador infrarrojo no dispersivo (NDIR) del CO_2 producido en la descomposición química de de la muestra con H_3PO_4 (25%) a temperatura ambiente. Como gas portador se utilizó aire de alta pureza con un flujo de 150 mL/min, empleando ftalato potásico como patrón de calibración para el TC y una mezcla de carbonato y bicarbonato sódico para el TIC.

3.3.6. Demanda Química de Oxígeno

La DQO se define como la cantidad de oxígeno necesaria para la oxidación química de la materia orgánica presente en una muestra (agua residual o lodo) y generalmente su valor es mayor que el de la demanda biológica de oxígeno (DBO), ya que hay más sustancias susceptibles de ser oxidadas químicamente que biológicamente. Su determinación se realizó conforme al apartado 5220C del libro "Standard Methods for the examination of water and wastewater" (APHA, 1999). El ensayo consistió en la completa oxidación de la materia orgánica presente en la muestra mediante un agente oxidante fuerte (dicromato potásico) en unas condiciones ácidas (adición de ácido sulfúrico). Como agente catalítico se utilizó el sulfato de plata y para evitar la interferencia de los cloruros se añadió sulfato de mercurio.

Preparación de los reactivos:

a) Disolución digestora de dicromato potásico: se prepararon dos tipos, una concentrada para muestras con una DQO de entre 90-900 mg/L (agua residual sin tratar) y otra más diluida para muestras entre 0-200 mg/L (agua residual tratada). Para la concentrada: se disolvieron 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ y 17 g de $HgSO_4$ en 500 mL de agua destilada, se añadieron 167 mL de H_2SO_4 al 98% y se llevaron a 1000 mL con agua destilada. La disolución diluida se preparó de forma análoga pero se añadieron 2,440 g de $K_2Cr_2O_7$.
b) Disolución catalítica: se disolvieron 10,700 g de Ag_2SO_4 en 1000 mL de H_2SO_4 al 98%. Se dejaba en agitación continua durante dos días hasta completa disolución.
c) Disolución indicadora de ferroína: se disolvieron 1,485 g de fenantrolina monohidrato y 0,695 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 mL de agua destilada.

d) Disolución valoradora de sulfato amónico ferroso (FAS): al igual que en la disolución catalítica también se prepararon dos tipos, una concentrada para la valoración de las muestras de DQO esperada más alta (agua residual) y una diluida para las muestras de DQO más baja (efluentes tratados). FAS 0,035 N (concentrada): se disolvieron 13,720 g de $Fe(NH)_4(SO)_2 \cdot 6H_2O$ en 500 mL de agua destilada, se añadieron 20 mL de H_2SO_4 (98%) y se llevaron a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. FAS 0,016 N (diluida): se añadieron 6,280 g de $Fe(NH)_4(SO)_2 \cdot 6H_2O$ en 500 mL de agua destilada, se añadieron 20 mL de H_2SO_4 al 98% y se llevaron a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. Tanto la disolución concentrada como la diluida se valoraron diariamente con una disolución patrón de $K_2Cr_2O_7$ de concentración 0,025 N.

e) Disolución patrón de $K_2Cr_2O_7$ 0,025 N: se disolvieron 1,2258 g de $K_2Cr_2O_7$ secado previamente en una estufa a 105°C durante al menos 2 horas, en 1000 mL de agua destilada.

f) Disolución de hidrógeno-malato potásico: se disolvieron en 1000 mL de agua destilada 0,425 g de este compuesto desecado previamente hasta peso constante. Esta disolución presentaba un valor de DQO de 500 mg/L y se utilizó como test patrón para garantizar el estado de los reactivos. Se mantuvo refrigerada y se consideró un periodo de caducidad de 3 meses.

Procedimiento analítico:

En un tubo de pírex se añadían 2,5 mL de la muestra a analizar, posteriormente se adicionaban 1,5 mL de disolución digestora concentrada o diluida según correspondiera en función del valor de DQO esperado. Seguidamente se añadían 3,5 mL de disolución catalítica con el tubo inclinado para que discurriera por las paredes y sin que las dos capas se mezclaran. Se cerraban los tubos herméticamente mediante las correspondientes tapas y teflón. Tras cerrarlos, los tubos se agitaban energéticamente hasta completa mezcla de sus componentes y se colocaban en un digestor (Stuart Scientific, WTW CSB-COD CR 1100), calentado previamente a una temperatura de 150°C. La digestión se mantenía durante 2 horas, tras lo cual los tubos se dejaban enfriar a temperatura ambiente. Paralelamente se preparaba un blanco con agua destilada de manera análoga a las muestras.

Antes de realizar la valoración de las muestras y el blanco, era necesario valorar la FAS. Para ello se pipetaban 10 mL de disolución patrón de $K_2Cr_2O_7$ 0,025 N en un matraz erlenmeyer junto con 3 mL de H_2SO_4 al 98%. Tras dejarlo enfriar se añadían 2 gotas de indicador de ferroína y se valoraba con las FAS hasta viraje de azul a rojizo. La concentración de la FAS se determinó según la Ecuación 3.4.

$$N_{FAS} = \frac{10 \times N_{K_2Cr_2O_7}}{C} \qquad \text{(ec.3.4)}$$

Donde:

C: ml de FAS consumidos en la valoración.

$N_{K_2Cr_2O_7}$: concentración de la disolución de dicromato potásico (0,025 N)

Para la valoración de las muestras se vertía el contenido de los tubos en matraces Erlenmeyer de 25 mL lavando los arrastres de los tubos con no más de 2 mL de agua destilada. Se añadían 2 gotas de indicador de ferroína y se valoraba con la correspondiente FAS (según correspondiera concentrada o diluida). Para la determinación del valor de la DQO se aplicó la Ecuación 3.5.

$$DQO(mgO_2/L) = \frac{(B-M) \times N_{FAS} \times 8000}{V} \qquad \text{(ec.3.5)}$$

Donde:

B: volumen de FAS utilizados en la valoración del blanco de agua destilada (mL).

M: volumen de FAS utilizados en la valoración de la muestra (mL).

N_{FAS}: normalidad de la FAS (calculada según la ecuación 3.4).

V: volumen de muestra (2,5 mL).

3.3.7. Demanda Biológica de Oxígeno

Se define como la cantidad de oxígeno empleada por los microorganismos en la degradación de la materia orgánica "biodegradable". El test de DBO mide el oxígeno consumido durante un período de incubación, en la biodegradación de la materia orgánica. También incluye la medida del oxígeno necesario para la oxidación de materia inorgánica y la cantidad utilizada en la oxidación de formas reducidas del nitrógeno. Para evitar la medida se este último consumo, se añadió en todos los ensayos, un inhibidor de la nitrificación, n-aliltiourea. El análisis se realizó conforme al apartado 5210B (APHA, 1999) que consistía en la medida del consumo de oxígeno en la muestra, tras una incubación de cinco días en una cámara a temperatura de 20°C y en completa oscuridad. Se utilizó un equipo automático que ofrecía los valores de DBO_5 de forma automática (Oxitop® de WTW).

Procedimiento analítico:

En las botellas de vidrio topacio se añadía un volumen de muestra en función de la DBO_5 esperada. Este volumen junto con los factores de corrección se determinaron según

lo expuesto en el manual del equipo Oxitop®. Tras añadir la muestra, se introducía un agitador magnético y las gotas de inhibidor de la nitrificación (N-aliltiourea) indicadas en la Tabla 14.

Tabla 14: *Volúmenes de muestra, factores de corrección y cantidad de inhibidor en la medida de la DBO_5. Adaptado de "Instruction manual of the measuring system Oxitop®"*

Tipo de muestra	Volumen (mL)	Rango de medida (mg/L)	Factor	Gotas de inhibidor de la nitrificación
Muestra de agua residual no tratada (bruta)	164	0-400	10	3
Efluentes tratados	432	0-40	1	9

Seguidamente se tapaban las botellas con una especie de obturador de goma en el que se introducían tres lentejas de hidróxido sódico, ya que el dióxido de carbono formado en la respiración se combinaba con el hidróxido sódico generando una disminución de la presión, que era medida por el sensor. Se cerraba con el cabezal de medida (sensor piezoeléctrico) y se introducía en una cámara a 20°C, en agitación continua y en completa oscuridad durante cinco días, tras los cuales se recogía la medida indicada en el cabezal.

3.3.8. Nitrógeno

El nitrógeno en las aguas residuales puede encontrarse en forma de: amonio, nitrito, nitrato y nitrógeno orgánico. El nitrógeno orgánico y el amonio pueden determinarse conjuntamente y se engloban bajo la denominación de nitrógeno Kjeldahl.

Los métodos analíticos empleados para la determinación de las distintas formas de nitrógeno fueron las siguientes:

Amonio

Se determinó mediante el método colorimétrico (denominado método de la lejía), de referencia 4500-NH_3 F (APHA, 1999). Está basado en la reacción del fenol con el ion hipoclorito formando el compuesto indofenol de color azul intenso, que se determinaba mediante un espectrofotómetro a 635 nm, (Shimadzu UV-A603 en el laboratorio de la

Universidad de Santiago de Compostela y Bausch & Lomb Spectronic en el laboratorio de la Universidad de León).

Los reactivos empleados fueron:

a) Disolución de fenol-nitroprusiato: se añadían 15 g de fenol y 0,05 g de nitroprusiato sódico en 250 mL de una disolución tampón. El tampón se preparaba con 30 g de $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, 30 g de $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2\ H_2O$ y 3 g de EDTA en un litro de agua destilada, ajustado todo ello a pH 12.
b) Disolución de hipoclorito: se añadían 15 mL de lejía comercial (NaClO) y 200 mL de una disolución de NaOH 1N en 500 mL de agua destilada.

Procedimiento analítico:

Las muestras previamente filtradas a través de filtros de 0,45 µm se diluían de forma adecuada de manera que la concentración esperada fuera inferior a 1 mg/L de Nitrógeno en forma de NH_4^+. Seguidamente se tomaban 2,5 mL de la muestra y se le añadía 1 mL de la disolución de fenol y 1,5 mL de la de hipoclorito. Tras esperar 45 minutos, necesarios para que se completara la reacción a temperatura ambiente, se realizaba la medida en el espectrofotómetro a 635 nm. Para conocer la concentración de $N\text{-}NH_4^+$/L, previamente se realizaba una línea de calibrado con 6 concentraciones de un patrón de NH_4Cl en el rango de entre 0 – 1 mg $N\text{-}NH_4^+$/L.

Nitrato

Se determinó conforme el método 4500-NO_3^- B (APHA, 1999). Este método se basa en la absorción UV del ion nitrato a 220 nm.

Procedimiento analítico:

Se tomaban 5 mL de muestra previamente filtrada a través de un filtro de 0,45 µm y diluida de forma que la máxima concentración esperada fuera 4 $N\text{-}NO_3^-$/L. Se le añadían 0,1 mL de HCl 1 N y a continuación se medía su absorbancia a 220 y 275 nm en los equipos descritos para el amonio, utilizando cubetas de cuarzo. La absorbancia debida al ion nitrato se obtenía aplicando la Ecuación 3.6.

$$A_{NO_3-} = A_{220nm} - (2 \times A_{275nm}) \qquad \text{(ec.3.6)}$$

La cuantificación se realizaba mediante una recta de calibrado elaborada a partir de 6 concentraciones conocidas de un patrón de KNO_3 en el rango de entre 0-4 mg $N\text{-}NO_3^-$/L.

En el caso de los análisis realizados en el laboratorio de la Universidad de Santiago de Compostela, la determinación también se realizaba mediante electroforesis capilar

(Waters Capillary Ion Analyzer) permitiendo su determinación en el rango de 0-80 mg NO_3^-/L.

Para medidas puntuales no cuantitativas, simplemente orientativas (por ejemplo para ver de forma instantánea si el proceso de nitrificación o desnitrificación funcionaban bien), se utilizaban las tiras Quantofix que permitían obtener un valor de la concentración de este ion dentro de una serie de rangos aproximados.

Nitrito

Se determinó conforme al método 4500-NO_2^- B (APHA, 1999). Consistía en una técnica colorimétrica basada en la reacción entre la sulfanilamida y el ion nitrito, seguida de una reacción con la N-(1-naftil)-etilendiamina (NED), generando un color rosa cuya intensidad es proporcional a la cantidad de N-NO_2^-.

Los reactivos empleados fueron:

a) Disolución de sulfanilamida: en 600 mL de agua destilada se añadían 10 g de sulfanilamida estabilizada en 100 mL de HCl (37%), se llevaba a 1 L con agua destilada.

b) Disolución NED: se añadían 0,5 g de NED en 500 mL de agua destilada.

Procedimiento analítico:

Se añadían 5 mL de muestra, previamente filtrada a través de 0,45 µm y diluida de forma que la máxima concentración fueran 0,24 mg/ de Nitrógeno en forma de NO_2^-. Se le adicionaban 0,1 mL de cada uno de los dos reactivos y se dejaba reposar 20 minutos para que se produjera la reacción. Seguidamente se medía la absorbancia a 543 nm en los equipos descritos en el apartado correspondiente a la determinación de amonio. La cuantificación se realizaba mediante una recta de calibrado con 6 concentraciones de entre 0-0,24 mg N-NO_2^-/L, utilizando $NaNO_2$ como patrón.

Como se apuntó para la determinación del ion nitrato, en este caso la determinación también se realizó mediante electroforesis capilar y de manera cualitativa mediante las tiras quantofix.

3.4. Caracterización de la biomasa

Según lo expuesto en el capítulo 1 de este trabajo, se han considerado tres grupos de bacterias asociadas al proceso de lodos activados: heterótrofas aerobias, nitrificantes y desnitrificantes.

En este capítulo se realiza la descripción general de los métodos empleados para la determinación de las tasas de actividad de estos grupos de bacterias, así como del grado de inhibición de ésta debida a la presencia de los contaminantes objeto de estudio.

3.4.1. Actividad heterótrofa aerobia

El método empleado se basaba en la determinación de la velocidad del consumo del oxígeno disuelto por las bacterias presentes en el lodo. Es decir, la actividad se determinó mediante técnicas de respirometría.

Para su determinación hubo que tener en cuenta los siguientes conceptos:

- Respiración celular: En términos bioquímicos es el proceso de producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) en el cual compuestos orgánicos o inorgánicos se emplean como donantes de electrones y compuestos inorgánicos como el oxígeno, nitrito o sulfato se utilizan como aceptores de electrones.
- Respiración aerobia: Es el proceso de respiración celular en el cual el aceptor de electrones es el oxígeno.
- Respiración endógena: Es el proceso de respiración en el que las células no degradan un sustrato presente en el medio, sino que emplean compuestos existentes en el interior de sus propios organismos para producir energía.

El equipo utilizado consistió básicamente en un baño termostático, una bomba de aireación, un monitor de oxígeno (oxímetro) con dos sensores (YSI 5300-5331) que transferían los datos a un PC y unos recipientes (viales) de 15 mL de capacidad con agitación magnética en los que transcurrían las reacciones a una temperatura constante de 25°C. La Figura 9 muestra el equipo utilizado.

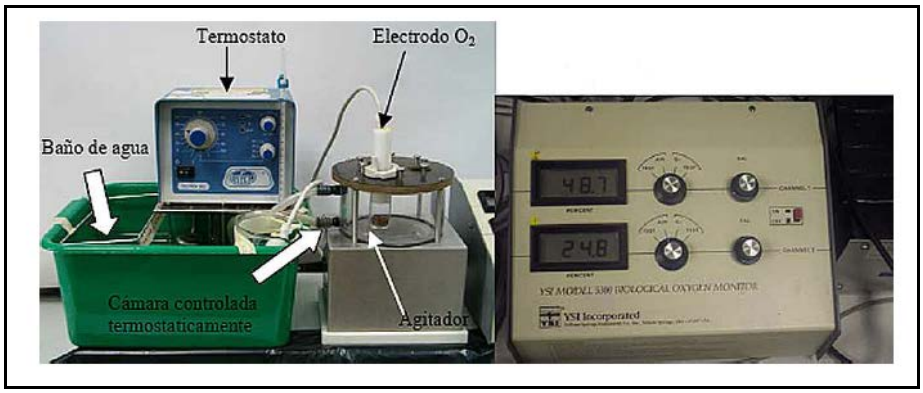


Figura 9: *Equipo para la determinación de la actividad por respirometría. Adaptado de Suárez, 2004(Universidad de Santiago de Compostela, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos)*

La concentración de biomasa que se determinó que era adecuada para la realización de los ensayos fue 1 g SSV/L, ya que se consideró que era lo suficientemente alta como para que se observara de forma clara el consumo de oxígeno y que además la respiración endógena no enmascarara la respiración debida al consumo de sustrato.

Reactivos:

a) Disolución concentrada de acetato sódico ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) 100g/L (substrato): se disolvían 16,58 g de acetato sódico trihidrato en 20 mL de agua destilada. Se llevaba a un volumen total de 100 mL con agua destilada.

b) Tampón fosfato: composición descrita en la Tabla 15.

Tabla 15: *Composición del tampón para ensayos de respirometría, adaptado de Suárez, 2004*

Compuesto	Fórmula	mg/L (en agua destilada)
Dihidrogenofosfato potásico	KH_2PO_4	3,31
Hidrogenofosfato potásico	K_2HPO_4	3,97
Sulfato de magnesio	$MgSO_4$	0,88
Cloruro sódico	NaCl	0,80
Cloruro de magnesio hexahidratado	$MgCl \cdot 6\ H_2O$	1,12

Procedimiento analítico:

Calibrado de las sondas: se ajustaba el baño termostático a 25°C y se añadían 10 mL de agua destilada en uno de los viales, se conectaba la agitación y se borboteaba aire en él durante unos 15 minutos para saturar el agua de oxígeno. Seguidamente se paraba la agitación y se introducía la sonda en el vial con cuidado de que no quedasen retenidas burbujas y se ajustaba la lectura del oxímetro a un valor de 100%, bloqueando el mando de la calibración.

Preparación de muestra: las muestras debían estar lo más frescas posible, ya que se trataba de materia celular viva e interesaba evitar procesos de muerte o decaimiento celular para que la actividad medida fuera representativa de la existente en el reactor. La biomasa se lavaba con el tampón (descrito en la tabla 15) en una probeta, durante al menos cuatro veces, separando y eliminando el sobrenadante por decantación de los sólidos

Determinación de la respiración endógena: se iniciaba el programa de adquisición de datos en el PC y se diluía la biomasa lavada con tampón hasta una concentración aproximada de 1g SSV/L. En los viales se añadían 10 mL de la biomasa resuspendida y se iniciaba la agitación de los mismos. Se borboteaba aire durante 15 minutos para obtener una concentración de oxígeno cercana a la saturación (solubilidad del oxígeno en agua a 25°C ≈ 8,24 mg O_2/L). Seguidamente se colocaban las sondas de oxígeno en los viales correspondientes. Para ello, se paraba la agitación con el fin de que no quedaran atrapadas burbujas de aire debajo de la sonda. Se volvía a conectar la agitación y tras observarse una estabilización en la respuesta de la sonda se comenzaba a adquirir datos. Debían registrarse suficientes datos de concentración de oxígeno frente al tiempo, de forma que se pudiera determinar la pendiente de la gráfica obtenida (respiración endógena).

Determinación de la respiración total: tras dos minutos de adquisición de datos para la determinación de la respiración endógena, se añadía el volumen de sustrato (disolución de acetato sódico) según el valor de DQO esperado mediante una microjeringa de vidrio a través de un lateral de la sonda de oxígeno. El ensayo se finalizaba a los 15 minutos o antes de llegar al 30% de saturación de oxígeno para evitar la disminución de la actividad por limitación de oxígeno. Finalmente se determinaba la cantidad de biomasa en el vial, expresada como SSV.

Cálculos y Resultados

- La velocidad de consumo de oxígeno debido a la respiración endógena (Kg O_2/L·d) se determinaba como la pendiente de la parte inicial de la curva antes de la adición de sustrato.
- La velocidad de consumo de oxígeno debido a la respiración total (Kg O_2/L·d) se determinaba como la pendiente de la parte de la curva posterior a la inyección de sustrato.
- La velocidad de consumo de oxígeno debido al sustrato (Kg O_2/L·d), se determinaba como la diferencia entre la velocidad de consumo de oxígeno debido a la respiración total y a la endógena.
- La actividad específica de la biomasa (Kg O_2/ Kg SSV·d) se obtenía dividiendo la velocidad de consumo de oxígeno debido al substrato y la concentración de biomasa, según la Ecuación 3.7.

$$Act.Het. = \frac{(Pte_f - Pte_e) \times V}{SSV} \qquad \text{(ec.3.7)}$$

Donde:

Act. Het: actividad heterótrofa aerobia (kgDQO/kg SSV·d)

Pte_f: pendiente de la parte final de la curva (mg O_2/L·d)

Pte_e: pendiente de de la parte inicial (respiración endógena), (mg O_2/L·d)

V: volumen ensayo (0,01 L)

SSV: cantidad de biomasa (mg)

En la Figura 10 puede verse una curva típica obtenida mediante este método.

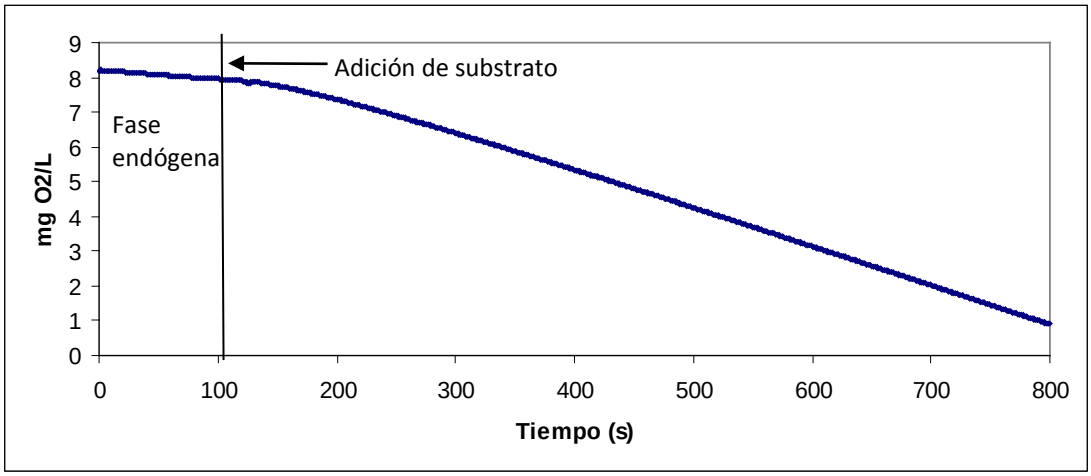


Figura 10: *Curva típica en ensayos de respirometría, con identificación de la fase endógena*

3.4.2. Actividad nitrificante

Las bacterias nitrificantes tienen bajas tasas de crecimiento (son las que crecen más lentamente en los procesos de lodos activos). La actividad nitrificante se determinó mediante respirometría, es decir, mediante el seguimiento del consumo de oxígeno de manera análoga a la determinación de la actividad heterótrofa aerobia, pero en vez de utilizar como substrato una disolución de acetato amónico, se utilizaba una fuente de amonio: disolución de cloruro amónico de concentración equivalente a 30 mg de Nitrógeno.

La actividad nitrificante se determinó según la Ecuación 3.8.

$$Act.nitrif = \frac{(Pte_f - Pte_e) \times V \times \frac{14 mgN}{64 mgO_2}}{SSV} \qquad \text{(ec.3.8)}$$

Donde:

Act.nitrif: actividad nitrificante (Kg $N\text{-}NH_4^+$/KgSSV·d)

Pte_f: pendiente de la parte final de la curva (mg O_2/L·d)

Pte_e: pendiente de de la parte inicial (respiración endógena),(mg O_2/L·d)

V: volumen ensayo (0,01 L)

SSV: cantidad de biomasa (mg)

La determinación de la actividad nitrificante mediante esta técnica en muchos casos no era muy exacta, ya que como se indicó, son bacterias con bajas tasas de crecimiento y en muchos casos su concentración (SSV) en el lodo activo era baja. Con esta técnica, en determinados ensayos se obtenían curvas en las que no se apreciaba con claridad la parte de la curva debida a la respiración endógena. Esto motivó que se desarrollara un método alternativo para la determinación de esta actividad: los ensayos de consumo de amonio bajo condiciones controladas en "batch".

Procedimiento de los ensayos de consumo de amonio bajo condiciones controladas en "batch":

En un matraz erlenmeyer de 100 mL se añadía un volumen conocido del lodo previamente lavado con el tampón descrito anteriormente, se introducía en un baño termostático a una temperatura controlada de 25°C. Como para la nitrificación se requiere oxígeno, se introducía aire en el matraz por medio de un aireador que a su vez permitía mantener el lodo en agitación constante. El montaje desarrollado está recogido en la Figura 11.

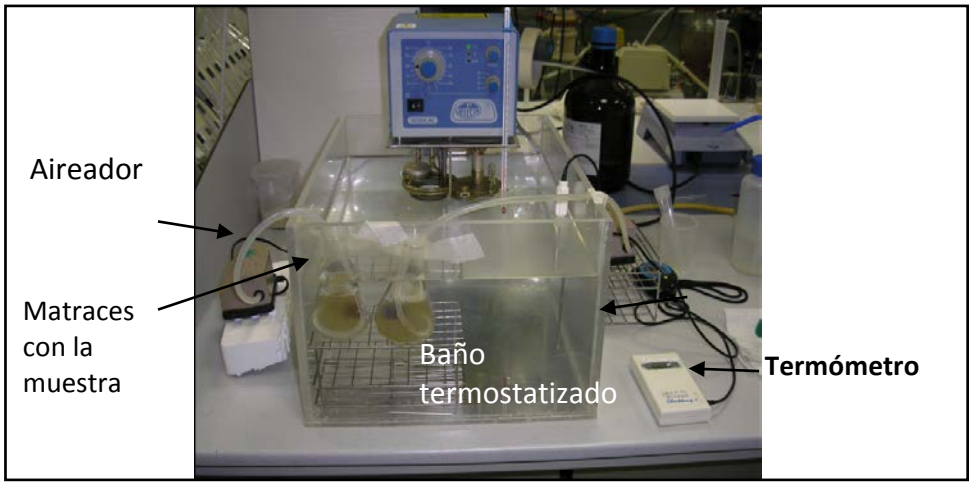


Figura 11: *Montaje para la determinación de la actividad nitrificante (Universidad de Santiago de Compostela, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos)*

Seguidamente se le añadía el substrato (cloruro amónico) junto con una cantidad de una disolución de bicarbonato sódico, con el fin de mantener la alcalinidad (ya que en el proceso de nitrificación se produce acidez). Posteriormente se tomaban pequeñas alícuotas de muestra cada cierto tiempo y se determinaba en ellas la cantidad de amonio, nitrato y nitrito según los métodos expuestos anteriormente. Finalmente para determinar la actividad nitrificante, se representaban los datos de consumo de amonio y producción de nitrato frente al tiempo.

3.4.3. Actividad desnitrificante

La medida de la actividad desnitrificante se realizó mediante el registro de un incremento de presión respecto al tiempo. Este incremento de presión se debía a la producción de N_2, producto de la reacción de desnitrificación.

Para la realización de este ensayo se utilizó un equipo formado por: botellas cerradas herméticamente en las que se introducía la muestra junto con el substrato ($NaNO_3$), un shaker (New Brunswick Scientific) o equipo de agitación de muestras con movimiento horizontal a temperatura y agitación constantes (25°C y 180 rpm) y un medidor de presión, todos ellos pueden verse en la Figura 12.

Procedimiento analítico:

Se estimó que la cantidad de biomasa (SSV) adecuada para la realización de este ensayo eran unos 2 g, por lo que las muestras una vez lavadas con tampón (sin bicarbonato sódico), se diluían hasta la concentración deseada con este mismo tampón. Seguidamente se pesaban las botellas vacías y llenas de agua con el fin de determinar el volumen total de la botella, se añadía la muestra y se volvían a pesar. Se preparaba un blanco (muestra sin añadirle el substrato) y dos réplicas de cada una de las muestras. Una vez cerradas, se introducía una válvula en el tapón y se desplazaba el aire de su interior mediante una corriente de helio. Se colocaban en el agitador (shaker) y se dejaban con la válvula abierta en agitación sin añadirle el substrato. Tras este tiempo, con una jeringa a través de la válvula, se introducía el substrato, 30 mg $N\text{-}NO_3^-$. Para esta concentración de nitrato, la presión máxima que se alcanzaban eran 10 mV. Se registraba la presión a distintos tiempos y se representaba en una gráfica. En la figura 12 puede verse una imagen del equipo utilizado.

El equipo de medida de presión, registraba los datos en mV, para transformar estas unidades en mm de Hg se empleó la Ecuación 3.9, obtenida a partir de una calibración previa (Suárez, 2004).

$$P(mV) = 0{,}1788 \times P(mmHg) + 0{,}0434 \qquad \text{(ec.3.9)}$$

En la parte final del ensayo podían observarse descensos anómalos en la presión, estas anomalías se debían a que con el paso del tiempo, el gas podía sufrir adsorciones y pequeñas pérdidas.

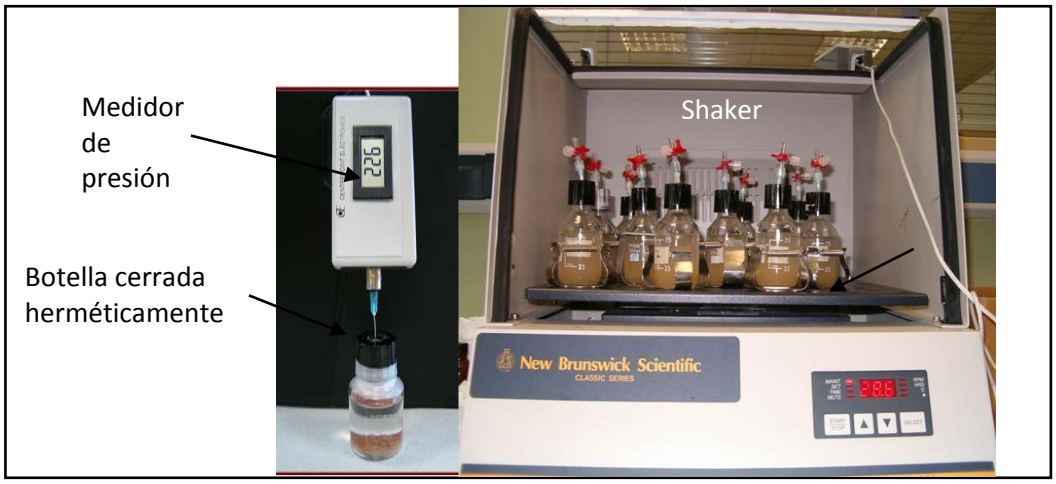


Figura 12: *Equipo para la determinación de la actividad desnitrificante, adaptado de Suárez, 2004 (Universidad de Santiago de Compostela, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos)*

Una vez finalizado el registro de presiones, se tomaba una alícuota del gas mediante la válvula y se analizaba en un cromatógrafo de gases (HP HP5890A con detector de conductividad térmica) para determinar la proporción de nitrógeno y de dióxido de carbono en la botella. Esta proporción se mantuvo en todos los casos en un valor aproximado de 97% de N_2 y 3% de CO_2.

Para concluir el ensayo, se realizaba la determinación de los SSV en cada una de las botellas conforme a lo descrito anteriormente.

En la Figura 13 se muestra una representación típica de los registros de presión respecto el tiempo para una muestra y el blanco.

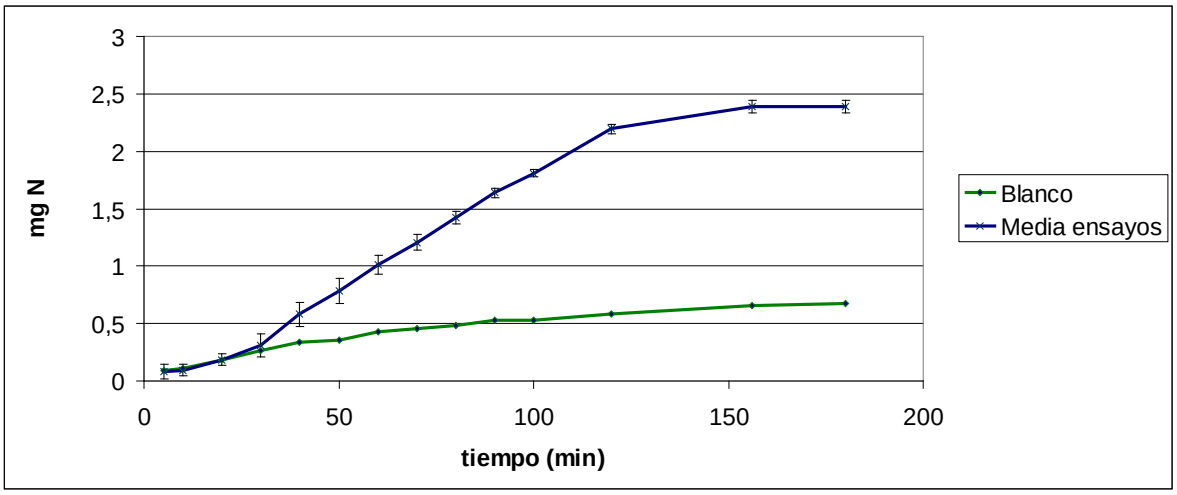


Figura 13: *Representación de la presión respecto al tiempo en un ensayo de determinación de la actividad desnitrificante*

Cálculos y resultados

La determinación del N_2 producido se determinó mediante la aplicación de la ecuación de los gases ideales, según se expone en la Ecuación 3.10.

$$P\,V = n\,R\,T \qquad \text{(ec.3.10)}$$

Donde:

P: presión en la botella (debida al N_2 y en menor medida al CO_2), (atm)

V: volumen de la botella (L)

n: número de moles del gas

R: constante de los gases ideales (0,082 atm·L/mol·K)

T: temperatura (298 K)

3.4.4. Ensayos de inhibición de la actividad

Inicialmente se realizaron una serie de ensayos con lodos procedentes de la EDAR de León, con el fin de estimar el grado de inhibición de la actividad bacteriana (heterótrofa aerobia y nitrificante) provocada por unas determinadas concentraciones de los contaminantes objeto de estudio (antibióticos). Para ello se utilizó un equipo automático (Strathkelvin Instruments) conectado a un PC. Con estos ensayos se pretendía estimar el rango de concentraciones de contaminantes con las que se podían realizar los ensayos sin provocar una inhibición generalizada de las actividades bacterianas.

Posteriormente, para determinar la inhibición de la actividad bacteriana debido a la presencia de los distintos contaminantes, se emplearon los ensayos para la determinación de la actividad bacteriana descritos en apartados anteriores, pero con la modificación consistente en la adición del contaminante junto con el substrato de alimentación en una cantidad conocida. En este caso, se realizaba simultáneamente el análisis de un blanco, es decir, el análisis de la muestra con substrato pero sin el contaminante. Esto permitía comparar ambos resultados y establecer un porcentaje de inhibición de la actividad bacteriana debido a la presencia del contaminante (antibiótico) objeto de estudio.

3.4.5. Cultivos en placa

En este estudio, el objetivo principal de los cultivos de bacterias a partir de muestras procedentes de los efluentes de los sistemas de depuración a escala de laboratorio, fue la investigación sobre la potencial aparición de cepas bacterianas resistentes a los contaminantes estudiados (antibióticos).

Los cultivos realizados, pretendían conseguir el crecimiento de microorganismos heterótrofos totales y se diseñaron conforme al método 9215 Heterotrophic Plate Count (APHA, 1999).

Reactivos:

a) disolución de cicloheximida (antibiótico para eucariotas): se disolvía 1 g de cicloheximida en polvo en 75 mL de agua destilada estéril y se añadían 25 mL de etanol (para disolverla mejor). Se mantenía refrigerada a 4°C.

b) medio de cultivo: como se pretendía realizar el cultivo de los heterótrofos totales, se utilizó un medio nutritivo generalista: agar nutritivo (Merck 105450). Se añadían 28 g de Agar en 1 L de agua destilada, se calentaba hasta ebullición en una placa calefactora hasta que el medio presentaba un color amarillento-transparente. Seguidamente se repartía en frascos de pírex más pequeños (de 100 y 250 mL) y se esterilizaban en autoclave (Selecta, Autotester-P), durante 15 minutos a 121 °C. Una vez atemperado, se añadían 10 mL de la disolución de cicloheximida por cada litro de medio. Si se iba a utilizar en el día, el medio se mantenía a 45°C en un baño, si no se conservaba en frío a unos 4°C. En el caso de los ensayos sobre la aparición de resistencia bacteriana, el contaminante (en este caso antibiótico) se aplicaba al medio de cultivo en la concentración deseada.

c) agua de dilución: se preparaba en recipientes estériles una disolución de cloruro sódico de concentración 180 mg/L y posteriormente se diluían 50 mL de esta

disolución hasta 1 L con agua destilada. Se esterilizaba en autoclave y se conservaba en frío.

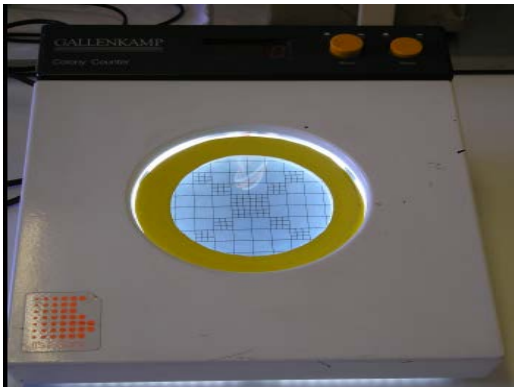
Procedimiento analítico:

Se esterilizaba en autoclave todo el material a utilizar (puntas de pipeta, tubos, etc.). Seguidamente se preparaban las diluciones de la muestra del efluente con el fin de tener un crecimiento en la placa de unas 30-300 colonias de bacterias. Para ello, se realizaban varios ensayos previos con distintas diluciones (10^{-1}: 1mL de muestra y 9 mL de agua de dilución, 10^{-2}, etc.) de la muestra hasta conseguir el crecimiento óptimo de las colonias. Todo el ensayo se llevaba a cabo en una campana de flujo laminar, esterilizada previamente mediante al menos 30 minutos de exposición a luz ultravioleta y en presencia de un mechero bunsen para mantener un ambiente estéril. El siguiente paso era la siembra, como se querían cultivar tanto bacterias aerobias como anaerobias, se tomaba 1 mL de la muestra adecuadamente diluida, se mezclaba en un tubo con unos 15-20 mL de medio templado. Tras agitarlo ligeramente se añadía en la placa intentando que la distribución fuera lo más homogénea posible.

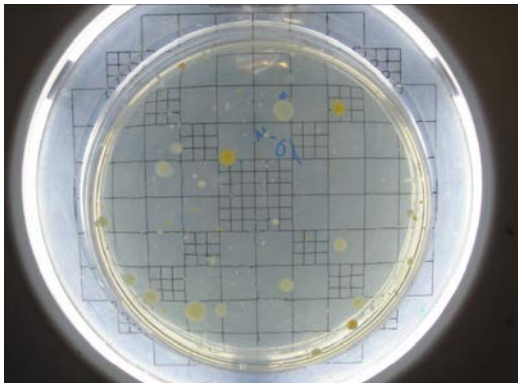
En todos los ensayos se preparaba un blanco para controlar que no hubiese crecimiento de microorganismos no deseados, es decir, no procedentes de las muestras de los efluentes de las plantas piloto.

La incubación de las placas se realizaba en una cámara a temperatura constante de 20°C durante al menos 5 días.

Una vez incubadas se procedía al recuento mediante un contador automático (Gallemkamp, Colony Counter) de las colonias que habían crecido en la placa, Figura 14.



(a)



(b)

Figura 14: *Contador automático de colonias (a) y placa sobre el contador en uno de los recuentos (b)*

El crecimiento de un mayor o menor número de colonias bacterianas indicaba una potencial resistencia o sensibilidad al compuesto testado.

Comparando los resultados del crecimiento de bacterias antes de la aplicación de los antibióticos a los sistemas piloto de tratamiento y los obtenidos tras una exposición prolongada a los mismos, se podía determinar el grado de aparición de cepas resistentes, debido a una exposición continuada de las comunidades bacterianas.

3.4.6. Seguimiento de microfauna

Como se indicó en el capítulo 2 de este trabajo, el sistema de depuración mediante lodos activos, es un ecosistema artificial donde los organismos vivos (biocenosis) forman comunidades complejas interrelacionadas entre sí y con el medio físico que les rodea.

En el conjunto de la microfauna presente en estos sistemas, los protozoos son los microorganismos más abundantes y están constituidos por los grupos: flagelados, ciliados y amebas. Les siguen en proporción los metazoos formados por los grupos: nematodos y rotíferos.

En el control de las plantas piloto, fue muy importante el seguimiento de la microfauna asociada ya que resultan ser excelentes indicadores del funcionamiento de los sistemas, por ejemplo, son indicadores de la edad celular del lodo, valor de la DBO, etc.

En este trabajo también se propuso investigar sobre como la presencia de determinados contaminantes podía afectar a esta microfauna. Todo ello determinó que fuera necesario el desarrollo de una metodología sistemática de seguimiento de estos microorganismos.

Procedimiento**:**

Se tomaban muestras de unos 5mL de cada uno de los reactores piloto, intentando que fueran lo más representativas posible y con una micropipeta se introducían 20 µL de esas muestras en un porta de vidrio. Se tapaba con un cubre de 15 x 15 mm, intentando que la distribución del lodo en el porta fuera lo más homogénea posible y se realizaba su observación mediante un microscopio óptico (Zeiss) acoplado a una cámara fotográfica digital (Olympus, DP11), primero con un aumento de 100x para identificar los microorganismos y posteriormente a 20x para realizar el contaje de los mismos.

Para el recuento se realizaban transeptos tomando como referencia una de las esquinas del cubre. En el registro de los contajes realizados, se rellenaban boletines de análisis con la identificación de la planta piloto, el volumen de muestra, la fecha, las características del cubre, los géneros o especies identificados, los cuadrantes y el número de individuos de cada género o especie en cada cuadrante. Al mismo tiempo, se tomaban

fotografías digitales de los microorganismos observados sobre los que existían incertidumbres en su identificación.

3.5. Determinación de iones metálicos

La determinación de iones metálicos (metales pesados) en las muestras de aguas residuales y lodos se realizó mediante un equipo ICP-AES (Espectroscopia de Emisión Atómica por Plasma Acoplado por Inducción). Esta técnica permitió la determinación simultánea de 12 elementos metálicos.El tratamiento previo de muestra (muestras de aguas residuales y lodos) fue el siguiente:

- ✓ Las muestras de aguas fueron digeridas mezclando 8 ml de muestra con 2 ml de ácido nítrico 65%.

- ✓ Para los lodos líquidos la proporción fue de 2 ml de la muestra con 8 ml del mismo ácido.

En todos los casos se digirieron en un horno de microondas a 200°C durante 10 minutos con una pre-digestión de 5 minutos a 100°C.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

Capítulo 4

Optimización y validación de métodos cromatográficos (HPLC)

4.1. Introducción

Para la consecución de los objetivos de este trabajo, ha sido especialmente importante y necesario desarrollar métodos cromatográficos que permitan determinar de manera precisa, exacta y a niveles de detección y cuantificación adecuados, los cinco antibióticos (OXT, CLT, DXC, AMX y TIL) en los estudios realizados.

Desarrollar métodos analíticos fiables es de especial importancia, dado que, estos métodos analíticos deben permitir detectar estos antibióticos a niveles de concentración muy bajos, cuando se encuentran presentes en matrices muy complejas como son los purines, lodos o aguas residuales.

La técnica empleada fue la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se trata de la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada; las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería y en el análisis de muestras en estudios medioambientales. Se trata de un método de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de ellas estacionaria y otra móvil. Se basa en las fuerzas competitivas que la fase fija o estacionaria y la fase continuamente renovada o móvil, establecen con las moléculas de un soluto. El soluto se distribuirá entre ambas fases en función de un equilibrio de partición dinámico. Éste quedará definido por su constante de equilibrio, es decir, por la constante de reparto o coeficiente de partición (García de la Marina, 1988).

$$k = \frac{[x_2]}{[x_1]} \quad \text{(Ec. 4.1)}$$

(Ec. 4.1): Constante de equilibrio o coeficiente de partición (x_1// x_2: concentración del soluto x en las fases 1 y 2)

La técnica se complementa con una serie de detectores cuya aplicabilidad se centra en distintas familias de compuestos. Se utiliza el detector que tenga una alta sensibilidad para el analito de interés.

Se ha seleccionado la técnica HPLC debido a que los compuestos objeto de estudio eran poco volátiles, lo que hacía descartar la utilización de técnicas de Cromatografía de

Gases (GC). El detector seleccionado fue el de absorción UV-Visible (photodiode-array, PDA), debido a la elevada absorbancia que presentaban en la zona UV-Visible.

Para realizar el estudio planteado se necesitaban métodos rápidos y sensibles, que permitieran determinar las concentraciones de cada uno de los compuestos en las distintas etapas del tratamiento de las aguas residuales, para poder realizar una estimación de la eliminación de los mismos en estos procesos.

Para tener la garantía de que esos métodos desarrollados eran adecuados para la determinación de los analitos de interés, cada uno de ellos fue validado. La validación analítica fue realizada teniendo en cuenta los parámetros y criterios recogidos en la Guía Internacional ICH Q2 (R1) de validación de métodos analíticos. Lo que permitió establecer evidencias de que el procedimiento analítico desarrollado conducía a resultados exactos y precisos, con una adecuada sensibilidad, siempre dentro de los criterios previamente establecidos.

A continuación se recogen los métodos desarrollados para determinar y cuantificar los antibióticos objeto de estudio, oxitetraciclina (OXT), clortetraciclina (CLT), doxiciclina (DXC), tilosina (TIL) y amoxicilina (AMX), así como los materiales y equipos utilizados, y por último los resultados obtenidos en la validación analítica de los mismos.

4.2. Equipos, reactivos, patrones y materiales

Aunque se citan de forma general los materiales utilizados en este trabajo en el capítulo 3, en este apartado se incluye un listado de los equipos, materiales, reactivos y patrones específicos utilizados en la puesta a punto y posterior validación de los métodos cromatográficos. Todos los equipos pertenecían al Departamento de Química y Física Aplicadas y al Laboratorio de Técnicas Instrumentales, de la Universidad de León (excepto los utilizados en los ensayos del capítulo 6, realizados con instrumental de la Universidad de Santiago de Compostela).

Equipos:

Cromatógrafo de líquidos Waters 600E con detector de fotodiodos Waters 2996 (Photodiode Array). Figura 15.

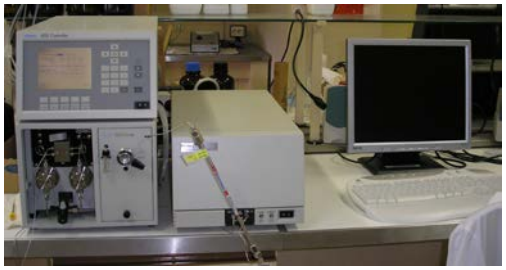


Figura 15: *Cromatógrafo (HPLC –PDA) utilizado en el estudio*

✓ Cromatógrafo HPLC Agilent 1100 con detector DAD (figura 16).

Figura 16: *Cromatógrafo (HPLC –PDA) utilizado en los ensayos correspondientes al capítulo 6 de este trabajo (Universidad de Santiago de Compostela, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos)*

✓ Evaporador centrífugo a vacío (Speed Vac) de Thermo, figura 17.

Figura 17: *Speed Vac (LTI Universidad de León)*

✓ Otros equipos de laboratorio: Baño de ultrasonidos P-Selecta®, Rotavapor Büchi Waterbath B-480, Centrífuga Beckman GR-6S, pH-metro Crison, etc.

Reactivos:

- ✓ Acetonitrilo grado HPLC (Labscan Ltd; Merck; Romil)
- ✓ 1-propanol grado HPLC (Labscan Ltd)
- ✓ Agua ultrapura, milliQ (Millipore System).
- ✓ Ácido tricloroacético (Carlo Erba)
- ✓ Decanosulfonato sódico (Fluka; Panreac)
- ✓ Tetrahidrofurano (Labscan Ltd)
- ✓ Ácido ortofosfórico 85% PA (Panreac)
- ✓ Ácido oxálico dihidrato, puro (Panreac)
- ✓ Oxalato sódico. ACS reagent (Sigma Aldrich)
- ✓ Dihidrogenofosfato de potasio (Sigma Aldrich)
- ✓ Hidrogenofosfato de dipotasio (Sigma Aldrich)

Estándares (patrones de trabajo):

- ✓ Oxitetraciclina dihidrato EP (pureza 99,0%), Proveedor: Laboratorios Syva, León España. Fabricante: Chifeng Pharmaceutical, LTD.
- ✓ Clortetraciclina clorhidrato (pureza 96,4%), Laboratorios Syva, León España.
- ✓ Doxiciclina hiclato (pureza 98,7%), proveedor: Laboratorios Syva, León España. Fabricante: Yancheng Suhai Pharmaceutical, LTD.
- ✓ Tilosina tartrato (pureza 88,9%), proveedor: Laboratorios Syva, León España. Fabricante: Biovet.
- ✓ Amoxicilina trihidrato micronizada EP (pureza 99,2%), proveedor: Laboratorios Syva, León España. Fabricante: Norbrook UK.

Materiales:

- ✓ Columnas cromatográficas C8, C18 (Phenomenex) y NH_2 (Waters)
- ✓ Precolumnas C8 y C18 (Phenomenex)
- ✓ Filtros de 0,45 µm (Millipore)
- ✓ Material volumétrico (Scott Duran)
- ✓ Viales cromatográficos (Waters)
- ✓ Jeringas de inyección (Hamilton)

4.3. Propiedades físico-químicas de los antibióticos objeto de estudio

4.3.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas presentan múltiples grupos funcionales ionizables. Tienen un grupo tricarbonilamida (C-1: C-2: C-3), dicetona fenólico (C-10: C-11: C-12) y dimetilamina (C-4) que les confieren una dependencia muy marcada respecto al pH, influyendo en la solubilidad en agua. Tienen un comportamiento anfótero con 3 constantes de disociación: pK_a= 3,3; 7,68 y 9,69 y existen como cationes, zwiteriones y aniones, especies correspondientes a condiciones de acidez, moderadamente ácidas y alcalinas, respectivamente (Cheng et al., 2007). A un valor de pH de aproximadamente 3 se encuentran como cationes, a un pH entre 3,5-7,5 como zwiteriones y a pH superior a 7,5 como aniones. Las disoluciones de tetraciclinas son bastante estables a pH neutro y ligeramente ácido. A pH alcalino son inestables (Youssef et al, 1971) y biológicamente inactivas. A un pH ácido, por debajo de 3, se forman las anhidro-tetraciclinas que presentan una bioactividad limitada.

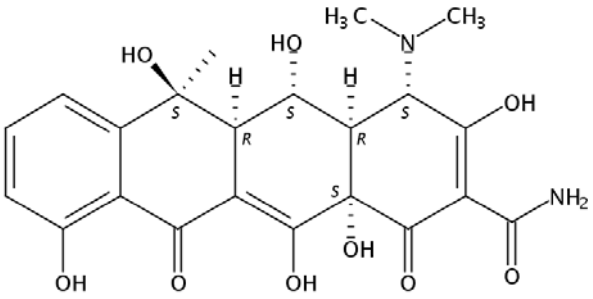
La solubilidad de las tetraciclinas es mayor en alcoholes como el metanol y etanol mientras que en otros disolventes orgánicos como el acetato de etilo, acetona y acetonitrilo varía. Son insolubles en hidrocarburos saturados como el hexano (Anderson et al, 2005).

En la tabla 16 se presenta un resumen de las propiedades físico-químicas.

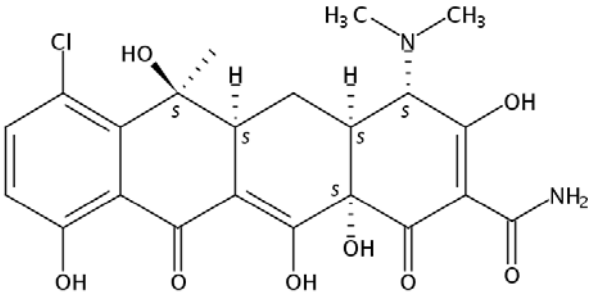
Tabla 16: *Principales características y propiedades físico-químicas de las tetraciclinas (fuente: SciFinder®)*

Tetraciclina	OXT	CLT	DXC
CAS	79-57-2	57-62-5	564-25-0
Fórmula molecular	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
MW	460,44	478,89	444,45
S (g/L)	0,31	0,63	0,63
pKa	3,27 7,32 9,11	3,30 7,44 9,27	3,30 7,68 9,69
Densidad	1,63 g/cm^3 (T= 20°C)	1,52 g/cm^3 (T= 20°C)	1,63 g/cm^3 (T= 20°C)
Punto de fusión	185°C	169°C	201°C

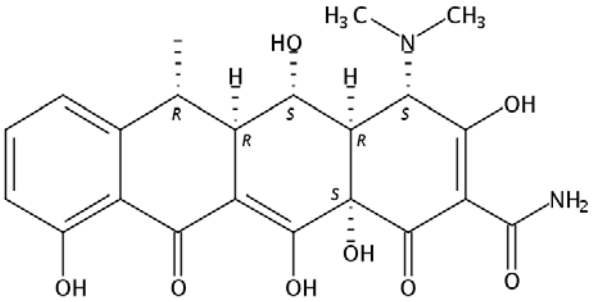
A continuación se presenta su estructura (figura 18).



a)



b)



c)

Figura 18: Estructura de las Tetraciclinas. a) oxitetraciclina (OXT); b) clortetraciclina (CLT); c) doxiciclina (DXC). Fuente: SciFinder®

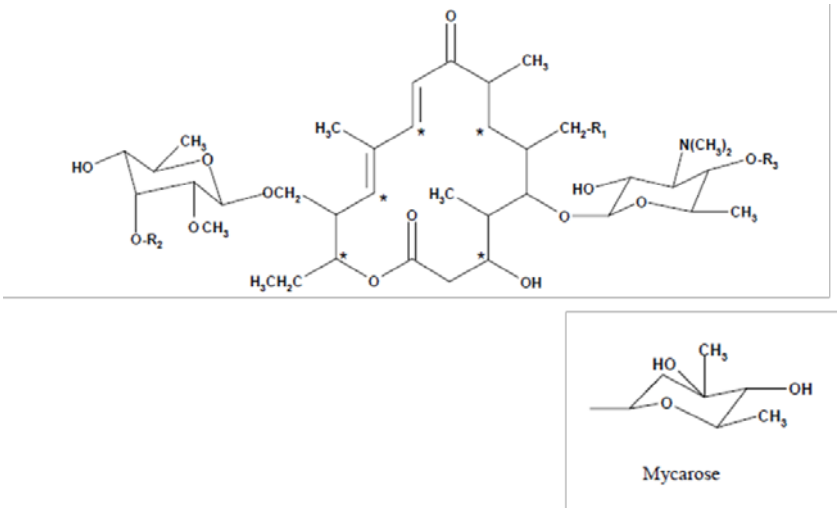
4.3.2. Tilosina

La tilosina es un antibiótico de la familia de los macrólidos, que está compuesto principalmente por tilosina factor A (80-90%) y una pequeña cantidad de los factores B,C y D (Teeter et al, 2002). En la tabla 17 se resumen algunas de sus propiedades y características.

Tabla 17: *Principales propiedades físico-químicas de la tilosina (fuente: SciFinder®)*

	TIL
CAS	1401-69-0
Fórmula molecular	C_{46} H_{77} N O_{17}
MW	916,12
S (g/L)	5 (en agua)
pKa	13,06 ± 0,70
Densidad	1,24 g/cm^3 (20°C)
Punto de fusión	132°C

A continuación en la figura 19 se presenta la estructura encontrada en bibliografía que resume todas las formas potenciales de la tilosina (Teeter et al, 2002). En este estudio solo se ha considerado la forma principal (tilosina A) que es la más bioactiva.



Compuesto	R1	R2	R3
Tilosina A	-CHO	-CH3	Mycarose
Tilosina B	-CHO	-CH3	-H
Tilosina C	-CHO	-H	Mycarose
Tilosina D	-CH2OH	-CH3	Mycarose
Dihidrosemicosina	-CH2OH	-CH3	-H

Figura 19: *Estructura de las distintas formas de la tilosina (adaptado de Teeter et al, 2002)*

4.3.3. Amoxicilina

La amoxicilina pertenece a la familia de los antibióticos betalactámicos. Algunas de sus propiedades se presentan en la siguiente tabla (tabla 18).

Tabla 18: *Principales propiedades físico-químicas de la amoxicilina (fuente: SciFinder®)*

	AMX
CAS	26787-78-0
Fórmula molecular	C_{16} H_{19} N_3 O_5 S
MW	365,4
S (g/L)	3430 g/L (agua)
pKa	2,8* 7,2*
Densidad	1.54 g/cm^3
Punto de fusión	140°C

*(Githinji et al, 2010)

A continuaciónen la figura 20 se presenta su estructura.

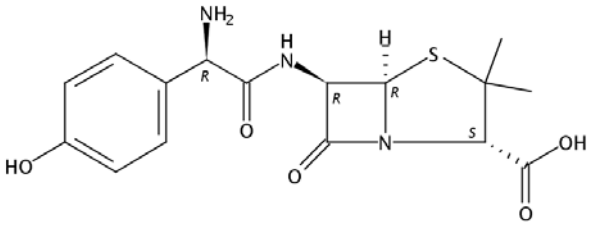


Figura 20: *Estructura de amoxicilina (fuente: SciFinder®)*

4.4. Optimización de los métodos y discusión

Como se indicó anteriormente, la técnica que se consideró más adecuada para la determinación de los cinco antibióticos en muestras de aguas residuales, lodos de depuradora y purines, fue la cromatografía líquida con detección UV (HPLC-UV).

En todos los métodos desarrollados las fase móviles fueron previamente desgasificadas mediante ultrasonidos, y todas las disoluciones acuosas que componían las mismas se filtraron mediante filtros de 0,45 µm.

Previo al análisis cromatográfico, era necesario hacer un tratamiento de las muestras, ya que por un lado se debían pre-concentrar con el fin de mejorar la

sensibilidad del método y por otro lado se trataba de matrices complejas con muchos componentes que podían generar interferentes con los picos de interés e incluso dañar el sistema cromatográfico (taponar la columna o las conducciones, incluso deteriorar la celda y la lámpara del detector). Debido a la naturaleza de las muestras el tratamiento previo era clave. Debía buscarse un equilibrio entre un método que permitiera una buena "limpieza" de las muestras, es decir, la eliminación de los posibles interferentes con los analitos de interés, pero que no resultara costoso y largo, para que los análisis pudieran realizarse inmediatamente, permitiendo el seguimiento de los compuestos en los distintos procesos. Es decir, se buscó un equilibrio entre el tiempo de análisis y el tratamiento final de la muestra. Para ello, se realizaron pruebas con distintas técnicas de tratamiento de muestra:

- Extracción líquido-líquido: es una de las técnicas de tratamiento de muestra más ampliamente utilizada. Una de las variables a tener en cuenta en el proceso de extracción es el disolvente orgánico utilizado como extractante. En la selección de éste se han de considerar aspectos como su polaridad, volatilidad y compatibilidad con otras técnicas analíticas. A pesar de la simplicidad de esta técnica de extracción hay que considerar también algunos inconvenientes entre los cuales hay que destacar que la separación entre las dos fases es, a menudo, problemática, por formación de emulsiones y por la limitación de trabajar con bajos volúmenes de disolventes. Por este motivo, muchas veces se incluye un paso de centrifugación para romper las emulsiones obtenidas y generar una mejor separación entre las dos fases. Los disolventes apolares inmiscibles con el agua más frecuentemente utilizados son: hexano, diclorometano y éter dietílico.
- Extracción líquido-líquido asistida con ultrasonidos: en este caso a la muestra se le añade un extractante líquido en el que el analito de interés es muy soluble y se somete a ultrasonidos que facilita la disolución en este disolvente.
  Se trataba de encontrar un disolvente en el que los analitos de interés fueran solubles y el resto de componentes de la matriz de muestra fueran poco solubles. Se realizaron pruebas con distintos disolventes orgánicos y con diluyentes acuosos a pH ácido y básico.
- Extracción en fase sólida: se realiza mediante cartuchos de extracción en los que el soporte es de silica-gel modificado con un determinado polímero poroso: cadenas hidrocarbonadas C_{18}, polímeros de poliestireno-divinilbenceno, resinas del tipo amberlita-XAD y poliuretano. En la tabla 19 se recogen los rellenos utilizados en las distintas pruebas de extracción.

Tabla 19: Rellenos de cartuchos de SPE

Tipo de relleno	Marca comercial
C_{18}	Sep-Pak^{R} Waters
HLB	Oasis ^{R} Waters
C_8	Isolute®
DSC-HH_2	Supelco®
ENV^+	Isolute®
DSC-CN	Supelco®

En todas las pruebas de extracción de muestra en fase sólida realizadas se siguieron las siguientes etapas:

- Acondicionamiento del adsorbente con el disolvente orgánico de elución.
- Inyección de la muestra.
- Etapa de limpieza: los componentes de la matriz no deseados se trataron de eliminar con distintos disolventes sin arrastrar el analito de interés. Para ello se realizaron pruebas con distintos disolventes.
- Elución de la muestra con un disolvente orgánico.

Este proceso de tratamiento de muestra se realizó a vacío mediante un sistema que denominado Manifold® de Waters, que permitía trabajar simultáneamente con 10 cartuchos de extracción.

4.4.1. Tetraciclinas

Tras una búsqueda bibliográfica se encontraron algunos artículos que describían métodos para la determinación de las tetraciclinas en distintas matrices como eran muestras de leche, aguas, carnes o suelos.

Los métodos encontrados utilizaban distintas fases estacionarias y móviles:

- En una publicación (Furusawa, 2002) se determinaban las tetraciclinas OXT, CLT, DXC y TC en muestras de leche mediante HPLC-DAD. Utilizaban una columna Lichrospher® 100RP-8 endcapped de tamaño de partícula 5µm y dimensiones 250 x 4,6 mm, con una fase móvil 7% AcN: 93% (mezcla ácido acético: agua 35:65 v/v) v/v, en modo isocrático y con detección ultravioleta. Para el tratamiento previo de muestra utilizaba extracción en fase sólida con relleno C8 acondicionado con etanol, y agua para la elución de las TCs.

- En otro artículo (Sunderland et at, 2003): Determinaban la clortetraciclina en muestras de purines mediante HPLC-UV y par iónico (PI), con una columna Prodigy® ODS3 (5µm, 4,6 x 150 mm) y fase móvil 34% AcN: 66% ácido oxálico y decanosulfonato sódico, ambos 4mM (disolución de par iónico) v/v. Para la preparación de muestra describían una

extracción líquido-líquido, añadiendo AcN (probablemente para provocar la precipitación de proteínas y otros compuestos), posteriormente acidificándolas con ácido fosfórico concentrado y diluido y finalmente centrifugando para obtener un sobrenadante claro.

- En otra publicación posterior (Yang et al, 2005) se realizaba la cuantificación de 11 antibióticos de la familia de las tetraciclinas en aguas residuales mediante HPLC-MS, con columna LiChrospher® 100 RP-8 endcapped (5µm, 4,6 x 250 mm) y fase móvil AcN: ácido fórmico 0,1% v/v, en gradiente. La muestra la preparaban añadiendo Na_2EDTA al 5%, ácido cítrico y sulfúrico, seguido de una extracción en fase sólida con cartuchos Oasis HLB, utilizando como primer disolvente MeOH, HCl 0,5 M y agua desionizada. Como disolvente de elución utilizaban MeOH.

Diversas publicaciones utilizaban HPLC-MS con SPE para la determinación de las TCs: aplicado a muestras de músculo y riñón de animales (Blanchflower et al, 1996); aplicado a muestras de suelos agrícolas (Jacobsen et al, 2003), en muestras de leche (Carson et al, 1998) etc.

4.4.1.1 Optimización de la separación cromatográfica

Tomando como base los métodos de bibliografía enumerados anteriormente, se realizaron distintas pruebas con fases móviles y estacionarias. En el caso del método propuesto por Furusawa et al (2002), se producía una interferencia en un pico procedente de un componente de las muestras de purines, por lo tanto esta opción se descartó.

Se realizaron pruebas aplicando el método propuesto por Yang et al (2005), en este caso el tratamiento de muestra propuesto no funcionaba correctamente para el caso de las muestras de lodos y purines, se producía una obturación de los cartuchos afectando a la extracción, no obteniendo recuperaciones aceptables de las tres tetraciclinas.

El método propuesto por Sunderland (Sunderland et al, 2003), aplicaba sólo a la determinación de clortetraciclina. Cuando se realizó la primera prueba manteniendo las condiciones analíticas que proponía, se observó experimentalmente que el pico de la doxiciclina presentaba un tiempo de retención muy elevado y además no era simétrico. Sin embargo, se consideró que este método podría ser la base para la optimización. Según estas primeras aproximaciones experimentales, la cromatografía con par iónico era la técnica más adecuada para la separación de estos tres antibióticos.

Seguidamente se realizaron distintos ensayos para optimizar el método:

Fase estacionaria

Todas las pruebas se realizaron con una fase estacionaria C18, si bien se probaron dos tipos de columnas cromatográficas:

- Phenomenex Luna® C_{18} ,5µm 4,60 x 150 mm
- Phenomenex Luna® C_{18} ,5µm 4,60 x 250 mm

En este caso la resolución entre los picos de los analitos de interés y los componentes de las muestras era mucho mejor con la columna de mayor longitud, por lo que se seleccionó la columna de 250 mm.

Fase móvil

El estudio se llevó a cabo en modo isocrático con distintas proporciones de fase acuosa y orgánica.

Las mezclas binarias de acetonitrilo y disolución de PI basadas en el método de Sunderland (Sunderland et al, 2003), originaban un pico no simétrico de la doxiciclina, por lo que se decidió incorporar otro disolvente orgánico, con mayor fuerza de elución que el acetonitrilo; Se seleccionó el 1-propanol. Las mezclas ternarias ensayadas fueron (en modo isocrático y con disolución de PI compuesta por ácido oxálico y decanosulfonato sódico ambos 4mM en agua ultrapura):

- 30% AcN: 5% 1-propanol v/v/v: 65% PI: el tiempo de retención de la doxiciclina seguía siendo elevado y el pico no simétrico (con cola).
- 23% AcN: 10% 1-propanol: 67% PI v/v/v: se obtenían similares resultados al anterior, si bien el pico de la doxiciclina se adelantaba.
- 20% AcN: 15% 1-propanol: 65% PI v/v/v: con esta fase móvil la presión alcanzada en la columna era muy elevada, estando cercano al límite superior permitido por el equipo (4000 psi), por lo tanto se descartó la opción de añadir más 1-propanol debido a que se trataba de un disolvente muy denso que incrementaba la presión en el sistema.

Tras estos ensayos modificando la fase orgánica, se decidió realizar modificaciones en la fase acuosa (disolución de par iónico) para intentar mejorar la forma de los picos de las tetraciclinas. Para ello las pruebas llevadas a cabo fueron:

- Aumento de la concentración de ácido oxálico y decanosulfonato sódico de 4 mM a 6 mM, manteniendo la fase orgánica 10% de 1-propanol y 25% de AcN. En este caso no se consiguió ninguna mejora en el cromatograma y el filtrado de la fase acuosa (por 0,45 µm era más dificultoso), por lo tanto se descartó esta opción.
- Se optó por modificar la disolución PI añadiendo una sal del ácido oxálico. Con este ajuste de la fase acuosa se consiguió que todas las tetraciclinas eluyeran en un

intervalo de tiempos de retención razonables y con una resolución óptima entre ellas, y respecto a los picos procedentes de las distintas matrices de las muestras. Al añadir el oxalato el pH de la fase acuosa estaba más próximo al pKa de las tetraciclinas.

Por lo tanto la fase móvil con la que se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a forma de pico, resolución y tiempos de retención fue: 23% AcN: 10% 1-propanol: 67% PI (ácido oxálico, oxalato sódico y decanosulfonato sódico 4 mM) v/v/v.

Flujo

Aunque todas las pruebas de fase móvil se realizaron en modo isocrático a flujo 1 mL/min, cuando se determinó la fase móvil más adecuada se realizaron pruebas a flujo 1,5 mL/min. En estas pruebas se obtuvo una buena resolución y forma de picos, reduciendo los tiempos de análisis sin producir un problema de presión en el sistema. Por lo tanto este flujo también se incluyó en la validación del método.

Volumen de inyección

Los tres volúmenes ensayados fueron:

- 20 µL: era el recomendado en la publicación de Sunderland (Sunderland et al, 2003). Este volumen era adecuado para tener una buena detección en el caso de la oxitetraciclina que era la TC que presentaba una mayor señal. Sin embargo no permitia llegar a los límites de detección adecuados para este estudio en el caso de las otras dos TCs.
- 50 µL: Con este volumen de inyección se obtuvieron resultados con una buena sensibilidad para los tres compuestos.
- 100 µL: Si bien con este volumen se conseguía un aumento en la señal de las tres TCs, los picos presentaban un ligero “hombro” en la parte delantera lo que indicaba un exceso de carga en la columna. Además dada la composición de las muestras a analizar era necesario minimizar al máximo el volumen de muestra inyectada (sin comprometer la sensibilidad del método) para evitar un deterioro de la columna cromatográfica.

Longitud de onda (detección)

Las tres tetraciclinas presentaban un máximo de absorción a 274-275 nm, pero esta longitud no resultó adecuada, ya que se producía una interferencia con ciertos componentes de las matrices de muestra que presentaban una alta absorción a estas longitudes de onda.

Se seleccionó la longitud de onda de 350 nm ya que la oxitetraciclina y doxiciclina presentaban un máximo de absorción a esa ƛ, si bien la clortetraciclina presentaba el máximo a una longitud ligeramente mayor (367 nm). A esta longitud no se producía ningún tipo de interferencia con los componentes de las muestras (la materia orgánica y los disolventes generalmente presentan absorción a longitudes más bajas).

En la figura 21 se recogen los espectros de absorción de las tres tetraciclinas.

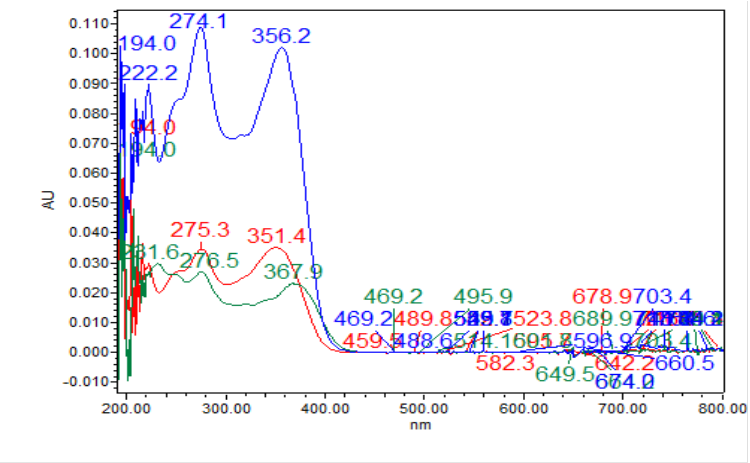


Figura 21: *Espectro de absorción UV de las tetraciclinas. Azul: OXT; Verde: CLT; Rojo: DXC*

En la figura 22 puede verse el cromatograma obtenido en una disolución patrón de las tetraciclinas de concentración 5 mg/L. En la figura 23 se presenta un cromatograma de una muestra de purines dopada con las tres tetraciclinas.

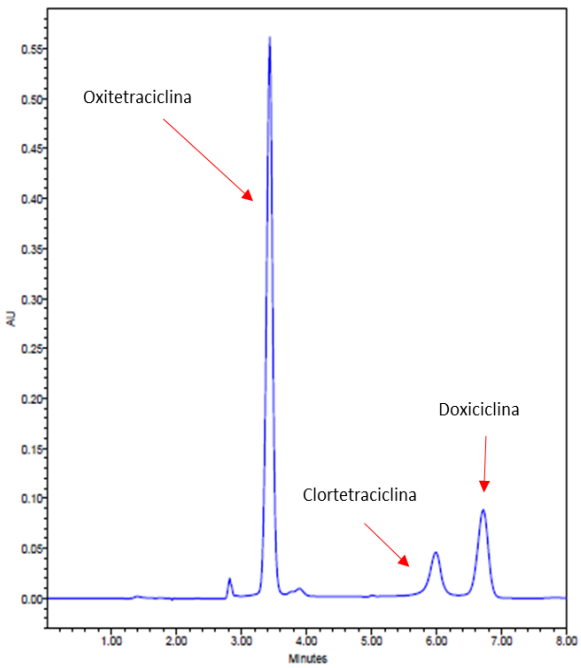


Figura 22: *Patrón tetraciclinas 5 mg/L (flujo 1,5 mL/min)*

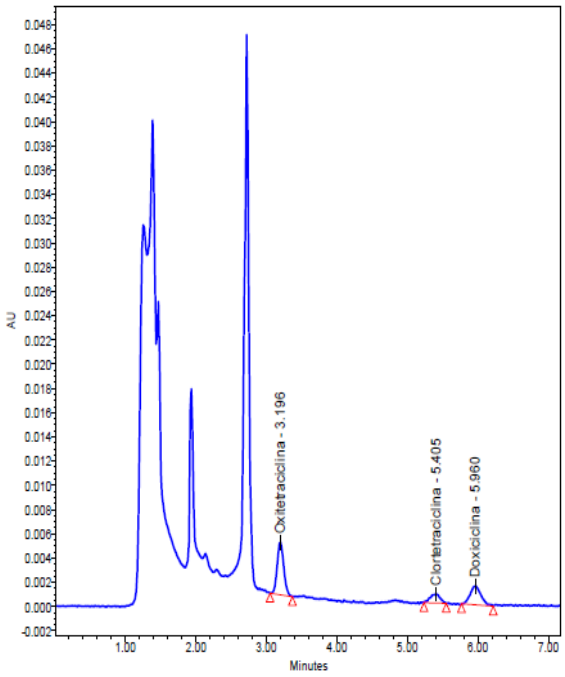


Figura 23: *Muestra real de purines dopada con las tetraciclinas*

Finalmente en la figura 24 se recoge el cromatograma de una muestra de lodos activados procedente de una de las plantas piloto tras la aplicación de los antibióticos a la misma.

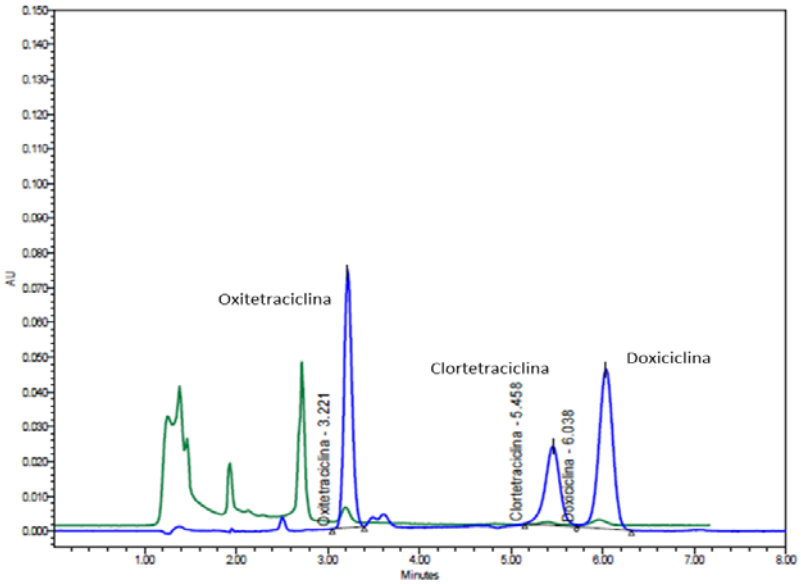


Figura 24: *Patrón tetraciclinas 5 mg/L (flujo 1,5 mL/min) en azul; muestra real de lodos activados tras aplicación de antibióticos a la planta piloto en verde*

En la tabla 20 se recoge una comparativa entre el método que sirvió de punto de partida en la puesta a punto y el método final que se optimizó para este estudio.

Tabla 20: Parámetros del método desarrollado comparado con el propuesto por Sunderland et al, 2003

	Sunderland et al, 2003 método para determinar CLT en purines	**Nuevo método desarrollado** para determinar OXT, CLT y DXC en purines, aguas residuales y lodos
Columna	Prodigy® ODS3 (5µm, 4,6 x 150 mm)	Phenomenex Luna® C_{18} (5µm 4.60 x 250 mm)
Fase móvil	34% AcN : 66% (ácido oxálico y decanosulfonato sódico ambos 4mM) v/v	Acetonitrilo 23%: 1-Propanol 10%: Disolución de par iónico 67% (Disolución de par iónico: decanosulfonato sódico, ácido oxálico y oxalato sódico 4 mM (cada uno), en agua mili Q). v/v
Flujo	1 mL /min Isocrático	1,5 mL/min; válido también 1,0 mL/min Isocrático
Detección	UV ƛ= 370 nm	UV ƛ= 350 nm
Volumen de inyección	20 µL	50 µL
T inyector / columna	No controlada (ambiente)	No controlada (ambiente)

4.4.1.2 Optimización del tratamiento previo de las muestras

Los cromatogramas anteriores muestran el perfil de muestras de purines y lodos activados una vez que se habían procesado con el método de tratamiento previo de muestra. Al igual que el método cromatográfico, se optimizó un procedimiento basado en el propuesto en la publicación de Sunderland (Sunderland et al, 2003). Hubo que realizar modificaciones ya que el que describían estos autores no era adecuado para la extracción de las tres TCs en las muestras de aguas, lodos y purines. El método descrito en esta publicación, estaba desarrollado para la extracción de la CLT en purines, por lo que hubo que optimizarlo. Estos autores describían el siguiente tratamiento de muestra:

- Se pesaban 100 mg en un homogeneizador de vidrio y se añadían 990 µL de AcN y se homogeneizaba mediante agitación manual durante unos 2 minutos. Posteriormente las muestras se sometían a 4°C durante 30 minutos en un refrigerador, y seguidamente se les añadían 1,1 mL de H_3PO_4 0,1 M y se mezclaban. Se tomaban 1,5 mL de esa mezcla y se centrifugaban durante 10 minutos a 5800 rpm en tubos de fondo cónico. Se tomaba una alícuota del sobrenadante y se introducía en un vial para su posterior análisis cromatográfico.

Aplicando este método sin ninguna modificación, las recuperaciones de CLT obtenidas eran aceptables en torno a 95%, pero para la OXT y DXC las recuperaciones obtenidas no superaban el 75%. Por lo tanto el citado método fue optimizado, además se observó que el tratamiento requerido para las muestras procedentes de las plantas piloto y los purines no eran los mismos.

Las muestras de purines requerían una preconcentración previa (provenían de sistemas reales donde las concentraciones esperadas de los antibióticos eran menores que en los sistemas de laboratorio) y un proceso de limpieza de muestra más exhaustivo (la matriz de las muestras de purines era mucho más compleja que la de las aguas residuales y lodos). Por lo tanto se desarrollaron dos tratamientos de muestra. La técnica utilizada fue la extracción en medio ácido asistida por ultrasonidos. La descripción de estos tratamientos puede verse en la tabla 21.

Tabla 21: *Tratamiento previo de muestra para la determinación de las TCs en muestras de aguas residuales, lodos y purines*

Aguas residuales y lodos de los sistemas piloto de laboratorio	**Purines procedentes de sistemas reales de tratamiento**
Sin preconcentración	100 mg de purín (muestras de purín bruto y efluente tratado) se concentraban 10 veces en rotavapor a 80°C y vacío
10 mL del agua residual o lodo + 1,1 mL de ácido fosfórico (0,1 M)	0,1 g del purín concentrado + 1,1 mL de ácido tricloroacético (0,1 M)
Agitación en baño de ultrasonidos 15 minutos	Agitación en baño de ultrasonidos 15 minutos
Centrifugación de la muestra 15 minutos a 4000 rpm	Adición de 2,2 mL de ácido tricloroacético (0,01 M)
Tomar una alícuota del sobrenadante en un vial de vidrio para posterior análisis cromatográfico	Agitación en baño de ultrasonidos 15 minutos
--	Centrifugación de la muestra 15 minutos a 4000 rpm
--	Tomar una alícuota del sobrenadante en un vial de vidrio para posterior análisis cromatográfico

4.4.2. Tilosina

Al igual que en el caso de las tetraciclinas se realizó una búsqueda sobre métodos analíticos para la determinación de tilosina mediante cromatografía líquida. Estos métodos se tomaron como punto de partida para la optimización de un método adecuado para la determinación de este antibiótico en las muestras de aguas residuales, purines y lodos. Todos estos métodos encontrados utilizaban la técnica de cromatografía en fase reversa.

En la publicación de Fish (Fish et al, 1986), se recogía una comparativa de métodos con el objetivo de seleccionar el más adecuado para ser incluído en la farmacopea bitánica (BP) para el análisis del principio activo de la tilosina y formas farmacéuticas.

Uno de los primeros métodos desarrollados mediante HPLC, utilizaba detección UV a ƛ=290nm, con una columna µBondapak® C18 de 300 mm y una fase móvil compuesta por 40% AcN: 60% de una disolución acuosa al 2% de etanolamina v/v. El pH de la fase móvil que proponían era muy elevado (pH= 11,7) para utilizar columnas C18 (inicialmente las columnas no soportaban valores de pH extremos, actualmente existen en el mercado columnas especiales adaptadas a pHs muy ácidos o básicos). En la tabla 22 se recogen los métodos examinados en esta publicación para su inclusión en la Farmacopea Británica.

Tabla 22: *Métodos mediante HPLC evaluados para el análisis de tilosina principio activo y producto final para dosificación (Fish et al, 1986)*

	System 1	*System 2*	*System 3*	*System 4*
Column	Nucleosil ODS 5 μm 20 cm × 0.46 cm I.D.	Zorbax C_8 pre-packed by Du Pont 15 cm × 0.46 cm I.D.	Hypersil C_8 5-μm pre-packed by Jones 15 cm × 0.45 cm I.D.	Zorbax C_8 20 cm × 0.46 cm I.D.
Mobile phase	40% acetonitrile in 0.85 *M* aq. sodium perchlorate (adjusted to pH 2.5 with 1 *M* hydrochloric acid)	acetonitrile–THF–0.0014 *M* sodium pentanesulphonate in 1% (v/v) acetic acid (1:1:3)	acetonitrile–THF–0.015 *M* sodium pentanesulphonate in 3% (v/v) formic acid (3:3:19)	acetonitrile–THF–0.0014 *M* sodium pentanesulphonate in 1% (v/v) acetic acid (23:19:58)
Flow-rate	1.0 ml/min	1.5 ml/min	1.5 ml/min	2.0 ml/min
Temperature	ambient	ambient	ambient	50°C
Injection volume	20 μl	15 μl	20 μl	20 μl
Detection wavelength	290 nm	280 nm	280 nm	290 nm
Sensitivity	0.08 a.u.f.s.	0.08 a.u.f.s.	0.08 a.u.f.s.	0.08 a.u.f.s.
Mobile phase pH	2.5	3.2	2.1	3.3

En otra publicación (Kay et al, 2004) se describe un método para la determinación de la tilosina en suelos. El método consistía en una extracción de las muestras con Na_2EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico seguido de una extracción en fase sólida con cartuchos Oasis® HLB. El análisis cromatográfico se realizaba mediante HPLC-UV a 285 nm y con una columna Genesis® 4 µm 150 x 4,6 mm, utilizando como fase móvil THF, AcN y TFA en gradiente.

En otra publicación posterior (González de la Huebra et al, 2005) se puede encontrar una recopilación de los métodos analíticos más representativos para la determinación de antibióticos macrólidos en muestra biológicas y muestras de alimentos. Según estos autores se han desarrollado varios métodos mediante HPLC con detección UV, FLD, electroquímica o con detectores de MS utilizando en la mayor parte de los casos columnas con relleno C18.

En otro artículo publicado (Thompsom et al, 2007) se proponía un método mediante HPLC-MS para la determinación de la degradación de la tilosina a desmicosina en muestras de miel, con una columna C8 y fase móvil compuesta por AcN y disolución acuosa de ácido heptafluorobutírico 0,04%, con elución en gradiente.

4.4.2.1 Optimización de la separación cromatográfica

Fase estacionaria

Se realizaron varias pruebas con columnas de relleno C8 y C18. Las columnas utilizadas en estos ensayos fueron:

-Columna: Phenomenex® Luna C18 250 x 4,60 mm 5µm

-Columna: Zorbax® C8 250 x 4,60 mm 5µm

La columna con relleno C8 no resultó adecuada para la determinación de la tilosina. En ninguna de las pruebas iniciales se obtuvieron buenos resultados en cuanto a resolución y forma de pico. Se decidió continuar sólo con la columna C18. Además en este caso se añadió una precolumna de relleno C18 que permitía reducir la entrada del resto de componentes de las muestras a la columna, aumentando su vida útil.

Fase móvil

El pKa de la tilosina según los datos bibliográficos era entorno a 13. A pH tan básico no era posible trabajar con las columnas disponibles en el laboratorio, el pH recomendado para trabajar con las columnas disponibles era entre 2-8. Por lo tanto se decidió realizar pruebas con distintas fases móviles.

Como modificador orgánico se seleccionó el AcN debido a su baja absorbancia, pero viendo la estructura del macrólido a determinar, se optó por incluir otro modificador orgánico con una fuerza de elución mayor, se seleccionó el tetrahidrofurano (THF).

Las fases móviles probadas fueron:

-10% AcN: 10% THF: 80% disolución reguladora de acetatos (0,01 M, pH=5,0) v/v/v

-15% AcN: 7% THF: 78% disolución reguladora de acetatos (0,01 M, pH=5,0) v/v/v

-25% AcN: 5% THF: 70% disolución reguladora de acetatos (0,01 M, pH=5,0) v/v/v

Se obtuvieron mejores resultados en cuanto a resolución, forma de pico y tiempo de retención con la tercer (figura 25).

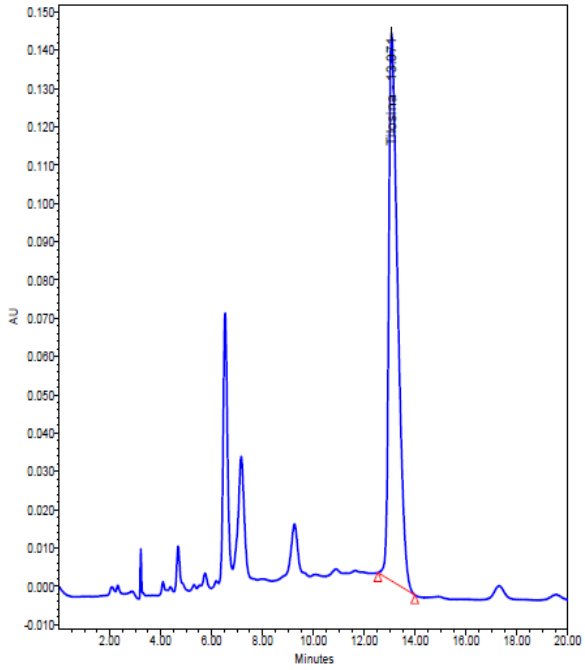


Figura 25: *Cromatograma de un patrón de tilosina (5 ppm) con fase móvil 25% AcN: 5% THF: 70% Tampón de acetatos (0.01 M, pH=5,0) v/v/v*

Con este método se obtenía un pico bien resuelto del resto de los componentes de las muestras, el problema era la proporción de THF en la fase móvil. Este disolvente no debe utilizarse en altas concentraciones, puesto que genera un deterioro de las conducciones internas de los equipos cromatográficos, especialmente en aquellas conducciones de material peek (polyether ether ketone) y además genera altas presiones en el sistema. Debido al elevado número de análisis que se preveía realizar se decidió modificar el método eliminando este disolvente de la fase móvil.

El nuevo método desarrollado sustituía el tetrahidrofurano por 1-propanol. En este caso la composición de la fase móvil con la que se obtuvieron unos mejores resultados fue:

- 30% Acetonitrilo: 10% 1-Propanol: 60% Tampón de acetatos (0,01 M, pH=5,0)

En la figura 26 se recoge un cromatograma obtenido para un patrón con esta fase móvil.

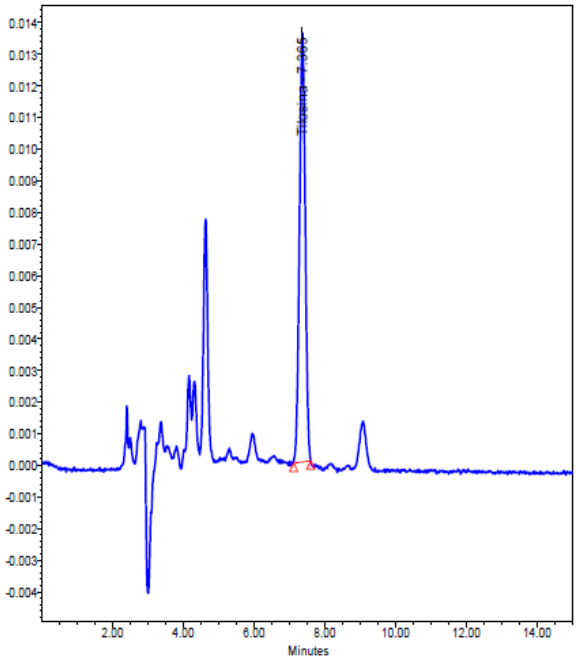


Figura 26: *Cromatograma de un patrón de tilosina (5 ppm) con fase móvil* 30% *Acetonitrilo: 10% 1-Propanol: 60% Tampón de acetatos (0.01 M, pH=5,0) v/v/v*

Volumen de inyección

Al igual que en el caso del método de las tetraciclinas, se realizaron pruebas con 20, 50 y 100 µL. Finalmente se seleccionó un volumen de 50 µL que permitía obtener un buen equilibrio entre sensibilidad y carga de columna.

Longitud de onda (detección)

La tilosina presentaba un máximo de absorción a 287 nm (figura 27), por lo cual se seleccionó esta longitud de onda pese a que en ella la absorción de los componentes de la muestra podía ser potencialmente alta. Aunque se registraban picos en el cromatograma (debido a absorción de algunos de los componentes de las muestras), la resolución con el pico del analito de interés fue adecuada.

En la figura 28 se muestra un cromatograma de una muestra de agua residual de entrada de uno de los sistemas piloto, superpuesto con el correspondiente a una muestra del efluente ya tratado de ese mismo sistema de tratamiento, ambas muestras obtenidas durante el período inicial de inoculación de los antibióticos.

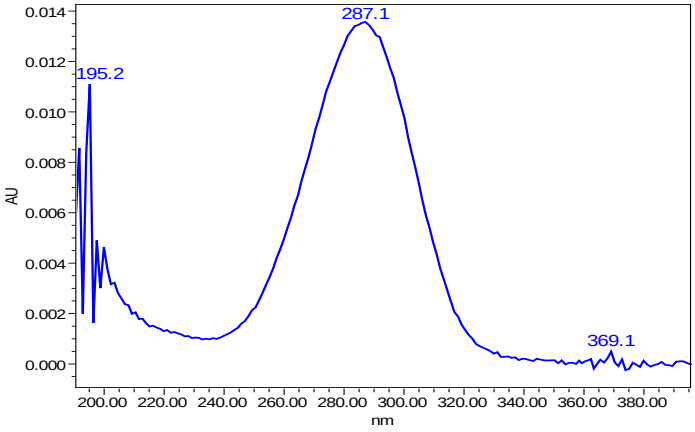


Figura 27: *Espectro UV de la tilosina*

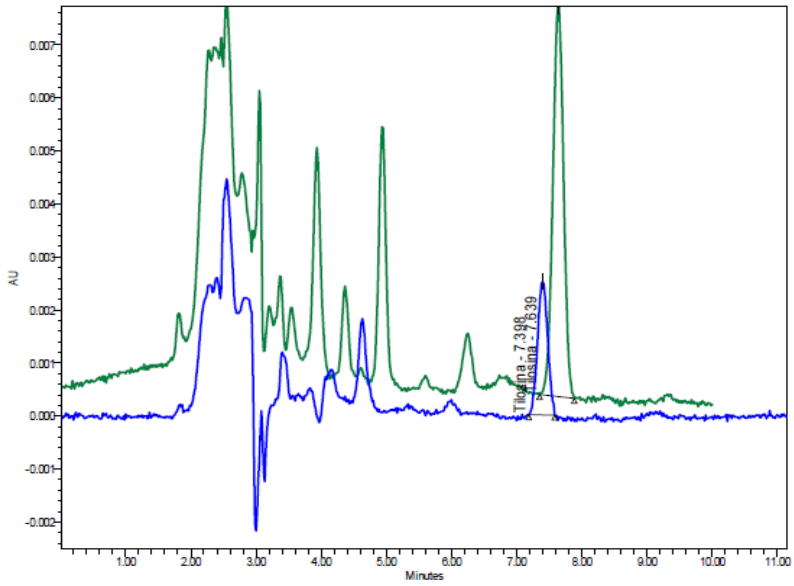


Figura 28: *En verde cromatograma de una muestra de agua residual sintética (inoculada con tilosina) y en azul cromatograma del efluente tratado*

Por lo tanto, las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de tilosina en este estudio fueron:

- ✓ Cromatografía de fase reversa
- ✓ Columna Phenomenex Luna® C_{18} 250 x 4,60 mm, 5µm (con precolumna C18)
- ✓ Fase móvil: 30% Acetonitrilo: 10% 1-Propanol: 60% Tampón de acetatos (0.01 M, pH=5,0) v/v/v
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL
- ✓ Longitud de onda del detector: 287 nm

- ✓ Temperatura de columna e inyector: no controladas (ambiente 20-25°C)
- ✓ Flujo: 1,0 mL/min

4.4.2.2. Optimización del tratamiento previo de muestra

En cuanto al método de tratamiento de las muestras para la determinación de la tilosina, al igual que para las tetraciclinas, se realizaron pruebas con distintas técnicas (extracción en fase líquida y sólida). Finalmente con el que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a recuperación y limpieza de muestra fue el siguiente:

-Para muestras de aguas residuales y lodos activados:

- ✓ Se tomaba una muestra de unos 10 mL y se llevaba a sequedad en evaporador centrífugo a vacío (speed-vac), condiciones: 40°C, máximo vacío. Este proceso tenía una duración de unas 2,5 – 3 horas.
- ✓ Una vez llevado a sequedad se re-suspendía con fase móvil (2-5 mL).
- ✓ Se facilitaba la extracción en un baño de ultrasonidos durante unos 15 minutos.
- ✓ Finalmente se centrifugaba para eliminar cualquier sustancia que pudiera obturar la columna o el inyector del HPLC. Este proceso se realizaba a 4000 rpm durante 15 minutos. Seguidamente, se llevaba a un vial una alícuota del sobrenadante para su análisis en el HPLC.

-Para muestras de purines:

- ✓ Se tomaban 100 mL de purín, se concentraban en rotavapor o speed-vac hasta un volumen final de 10 mL.
- ✓ Esos 10 mL se llevaban a sequedad en el speed-vac (40°C, vacío máximo)
- ✓ Una vez llevado a sequedad se re-suspendía con fase móvil (5 mL).
- ✓ Se agitaba en baño de ultrasonidos durante 15 minutos
- ✓ En la última etapa de tratamiento, las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 4000 rpm. En los casos en los que el sobrenadante presentaba mucha turbidez, se filtraba a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, PVDF).
- ✓ Se llevaba a un vial, para su posterior análisis mediante HPLC.

Nota: en el análisis de este antibiótico debía evitarse la utilización de materiales plásticos debido a que este compuesto se adsorbía con facilidad en este material. Por lo tanto todo el material debía ser de vidrio.

4.4.3. Amoxicilina

Al igual que en los casos anteriores se realizó una búsqueda bibliográfica inicial como punto de partida para el desarrollo del método analítico.

En un estudio publicado (Godwin et al, 1984) se planteaba un método analítico para la determinación de impurezas en cápsulas de amoxicilina mediante HPLC, con columna Spherisorb®-ODS 5 µm (150 x 4,6 mm) y fase móvil AcN: MeOH: tampón de fosfato 0,05 M (pH 5,9) en gradiente. La detección era UV a ƛ= 220 nm.

Otro autores (Benito-Peña et al, 2005) evaluaron la eficacia de dos tipos de cartuchos de SPE (Oasis® MAX y Bond Elut® C18) para la pre-concentración de antibióticos β-lactámicos en muestras de aguas residuales. Para la cuantificación de los antibióticos utilizaban un método HPLC-DAD con columna Luna® C18 5µm (150 x 4,6 mm) y fase móvil en gradiente compuesta por una disolución acuosa de TFA 0,01% y TFA 0,01% en AcN. La detección era a 220 nm.

Sin embargo otros invetigadores (Andreozzi et al, 2005) optaban por un análisis mediante HPLC-MS para la determinación de la amoxicilina en la evaluación de la eficacia de la ozonización de las aguas residuales en la eliminación de este antibiótico. La columna como en los casos anteriores era una C18 (C18 Hypersil Gold® 5µm, 150 x 2,2 mm) y la fase móvil disolución de ácido fórmico al 0,1% con MeOH en gradiente.

Posteriormente otra publicación (Tavakoli et al, 2007) proponía un método para la determinación de la amoxicilina en una formulación de comprimidos de liberación sostenida mediante HPLC-DAD. La columna que utilizaban era Whatman® Partisil ODS-3 5µm (100 x 4,6 mm), con fase móvil 95% tampón de fosfato (pH 4,7, 0,05 M): 5% MeOH v/v, isocrático y detección a 254 nm.

4.4.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

Fase estacionaria

Todos los métodos encontrados en bibliografía utilizaban cromatografía líquida en fase reversa, sin embargo en las pruebas realizadas en este trabajo con columnas C18, se obtenía un pico para la amoxicilina con “cola”, es decir no simétrico, con un factor de simetría (tailing) mayor a 2,0. En la figura 29 se muestra un ejemplo de cromatograma (columna Phenomenex Luna® C18 250 x 4,60 mm, 5µm).

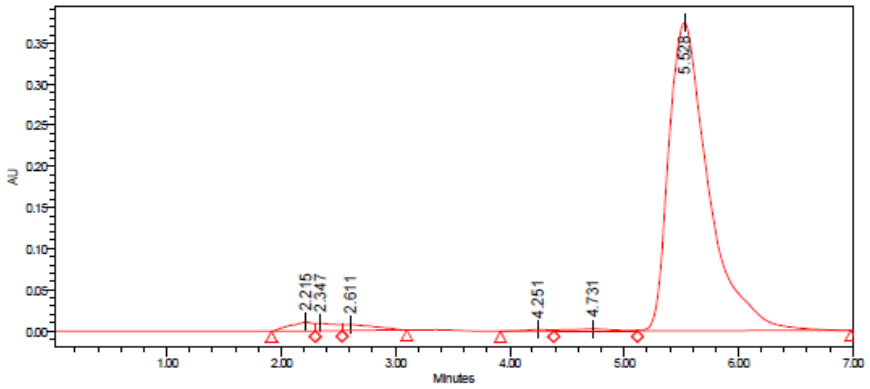


Figura 29: *Patrón de AMX en las primeras pruebas con columna C18 (método no optimizado)*

Aunque no se encontró ninguna publicación en la que se utilizara cromatografía en fase normal para la cuantificación de la AMX, a la vista de los primeros resultados obtenidos con las columnas C18, se decidió probar con una columna con relleno NH_2. La columna utilizada en las pruebas fue Columna Waters Spherisorb® NH_2 250 x 4,60 mm, 5µm.

Fase móvil

Se realizaron pruebas con mezclas binarias en medio isocrático. Como modificador orgánico se utilizó el AcN por su baja absorción, como se indicó anteriormente y también ante la potencial degradación que el MeOH podría causar en la AMX. Como fase acuosa se probaron disoluciones reguladoras con pH próximo al pKa del analito de interés. Las proporciones probadas fueron:

- 30% Acetonitrilo: 70 % Tampón fosfato (0,1 M, pH=6,0) v/v
- 40% Acetonitrilo: 60 % Tampón fosfato (0,1 M, pH=6,0) v/v
- 65% Acetonitrilo: 35 % Tampón fosfato (0,1 M, pH=6,0) v/v

En todos los casos se realizó una prueba previa en un recipiente para descartar que se produjera una precipitación del tampón fosfato con esas proporciones de AcN.

En la tercera prueba de fase móvil es en la que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a resolución, tiempo y forma de pico.

Volumen de inyección

Al igual que en el caso del método de las tetraciclinas y tilosina, se realizaron pruebas con 20, 50 y 100 µL. Finalmente se seleccionó un volumen de 50 µL que permitía obtener un buen equilibrio entre sensibilidad y carga en columna.

Longitud de onda (detección)

La AMX presenta máximos de absorción a 194, 229 y 273 nm. A estas longitudes de onda no se conseguía una resolución óptima del pico de interés. Debido a esto, se probó

con una longitud de onda intermedia (240 nm) con la que se obtuvieron los mejores resultados cromatográficos. En la figura 30 puede verse el espectro de la amoxicilina.

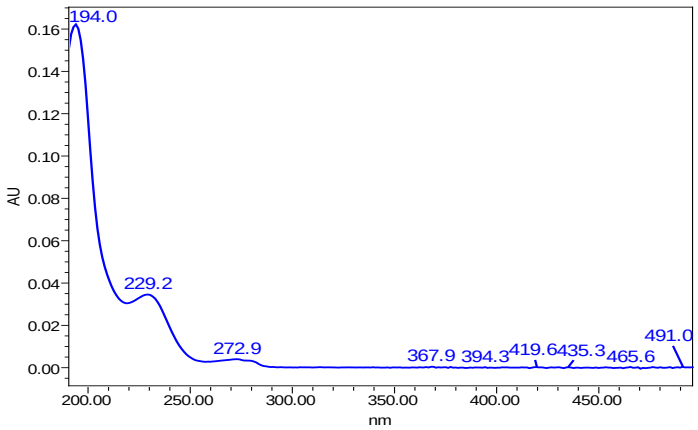


Figura 30: *Espectro de la amoxicilina*

De acuerdo a estas pruebas experimentales, el método de amoxicilina más adecuado para este estudio fue el siguiente:

- ✓ Columna Waters Spherisorb® NH_2 250 x 4,60 mm, 5µm
- ✓ Fase móvil: 65% Acetonitrilo: 35% Tampón fosfato (0,1 M, pH=6,0) v/v
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL
- ✓ Longitud de onda del detector: 240 nm
- ✓ Temperatura de columna e inyector: no controladas (ambiente 20-25°C)
- ✓ Flujo: 1,0 mL/min

En la figura 31 se expone un cromatograma obtenido para un patrón de AMX de concentración 5 mg/L.

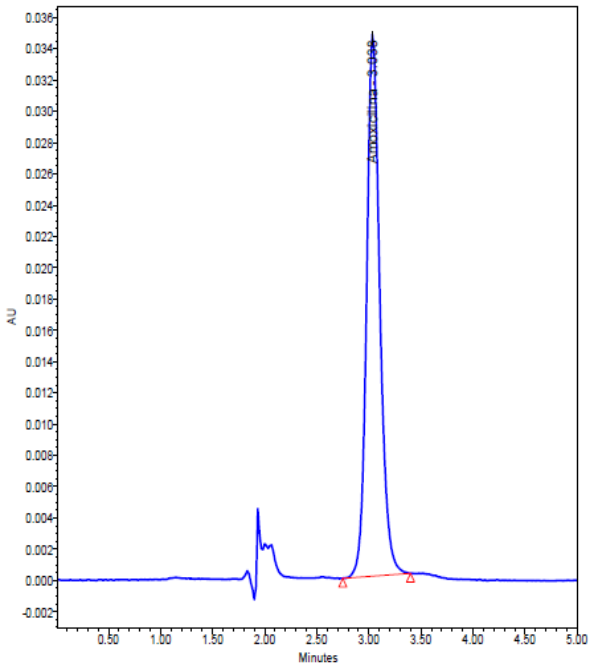


Figura 31: *Patrón amoxicilina 5 mg/L con el método optimizado (columna con relleno NH_2)*

4.4.3.2. Optimización del tratamiento previo de muestra

Como ya se expuso para el caso de las tetraciclinas y la tilosina, las muestras eran matrices complejas con numerosos componentes que podían interferir en la determinación de los compuestos objeto de estudio por lo que el tratamiento previo de muestra era un factor clave previo al análisis cromatográfico.

Según datos bibliográficos, determinados cartuchos de SPE ofrecían buenos resultados para este antibiótico. Se realizaron pruebas con cartuchos Oasis HLB, pero el problema al igual que en los apartados anteriores eran las muestras de purines que dificultaban la extracción haciéndola inviable. Por este motivo se desarrolló un método de extracción líquida asistida con ultrasonidos. El método que se optimizó fue el siguiente:

-Para aguas residuales y lodos activados:

- ✓ Se tomaba una muestra de unos 10 mL y se llevaba a sequedad en evaporador centrífugo a vacío (speed-vac), condiciones: 40°C, máximo vacío. Este proceso tenía una duración de unas 2,5 – 3 horas.
- ✓ Una vez llevado a sequedad se re-suspendía con fase móvil (2-5 mL).
- ✓ Se facilitaba la extracción en un baño de ultrasonidos durante unos 15 minutos.
- ✓ Finalmente se centrifugaba para eliminar cualquier sustancia que pudiera obturar la columna o el inyector del HPLC. Este proceso se realizaba a 4000 rpm durante 15 minutos.

- ✓ Seguidamente se llevaba una alícuota del sobrenadante a un vial para su análisis en el HPLC.

-Para purines:

- ✓ Se tomaban 100 mL de purín, se concentraban en rotavapor o speed-vac hasta un volumen final de 10 mL.
- ✓ Esos 10 mL se llevaban a sequedad en el speed-vac (40°C, vacío máximo)
- ✓ Una vez llevado a sequedad se re-suspendía con fase móvil (5 mL).
- ✓ Se agitaba en baño de ultrasonidos durante 15 minutos
- ✓ En la última etapa de tratamiento, las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 4000 rpm. En los casos en los que el sobrenadante presentaba mucha turbidez, se filtraba a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, PVDF).
- ✓ Se llevaba una alícuota a un vial, para su posterior análisis mediante HPLC.

4.5. Validación analítica de los métodos

4.5.1 Tetraciclinas

Las condiciones del método validado fueron las siguientes:

- ✓ Cromatografía de Par Iónico.
- ✓ Columna Phenomenex Luna® C_{18} 250 x 4.60 mm, 5µm, con precolumna C18.
- ✓ Fase móvil: 23% Acetonitrilo: 1-Propanol 10%: 67% Disolución de par iónico (PI: disolución acuosa de decanosulfonato sódico, ácido oxálico y oxalato sódico 4 mM).
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL
- ✓ Longitud de onda del detector: 350 nm
- ✓ Temperatura de columna e inyector: no controladas (ambiente 20-25°C)
- ✓ Flujo: 1,5 mL/min (válido también 1,0 mL/min)

Un punto importante a tener en cuenta en este método es que el sistema de par iónico debía ser acondicionado y estabilizado durante al menos 6-8 horas antes de los análisis.

A continuación se incluye un resumen de los parámetros validados y los resultados obtenidos. Todos los criterios de aceptación para cada uno de los test se cumplieron, por lo que el método se consideró adecuado y validado para las determinaciones de las TCs en las muestras de aguas residuales, purines y lodos activados.

4.5.1.1. Selectividad

La selectividad del método se evaluó inyectando muestras de purines, lodos activos y aguas residuales tratadas previamente con el método descrito anteriormente, así como el diluyente, el patrón de las tetraciclinas y la fase móvil. No se obtuvieron picos interferentes con los analitos de interés, siendo la resolución en todos los casos superior a 1,0. Por lo tanto, se demostró que el método era específico para la determinación de estos tres compuestos en aguas residuales, lodos activados y purines.

4.5.1.2. Linealidad

La linealidad se estudió en un rango de concentraciones entre 0,1 y 10 mg/L, con 9 niveles. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 23 y las figuras 32 a 34.

Tabla 23: *Linealidad: Datos de concentración frente a resultados de áreas (para establecer la linealidad entre estas magnitudes para las TCs)*

Concentración (mg/L)	Área (AU) **Oxitetraciclina**	Área (AU) **Clortetraciclina**	Área (AU) **Doxiciclina**
0,1	12998,34	3698,21	17801,61
0,2	19925,35	7396,42	16885,04
0,5	44207,41	19008,17	31457,18
0,7	60047,75	28527,04	43076,99
1	88452,68	33734,20	62790,68
2	162587,15	76032,69	128251,60
5	406398,00	179165,21	287146,11
7	576184,33	258874,63	409953,69
10	847841,62	371708,79	588214,36

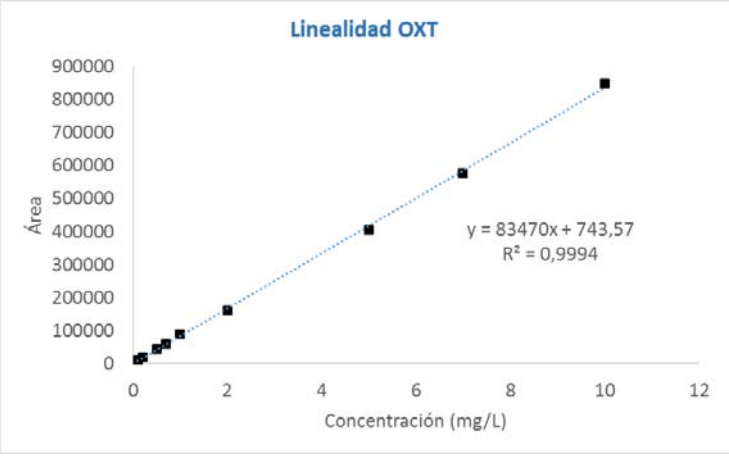


Figura 32: *Linealidad oxitetraciclina: representación de la señal (área) frente a concentración (mg/L)*

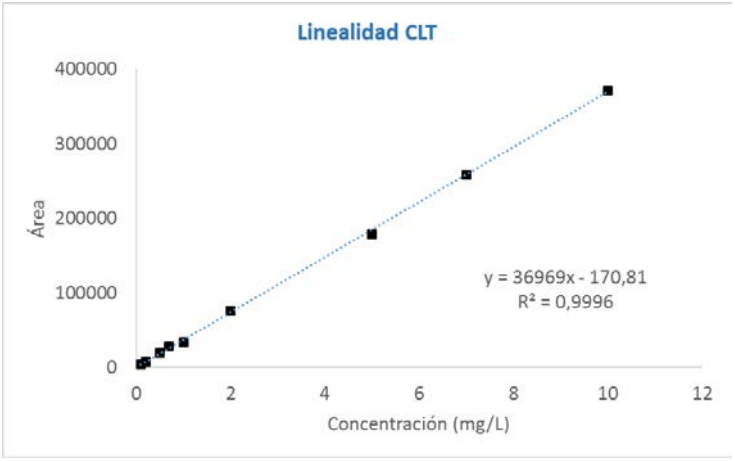


Figura 33: *Linealidad clortetraciclina: representación de la señal (área) frente a concentración (mg/L)*

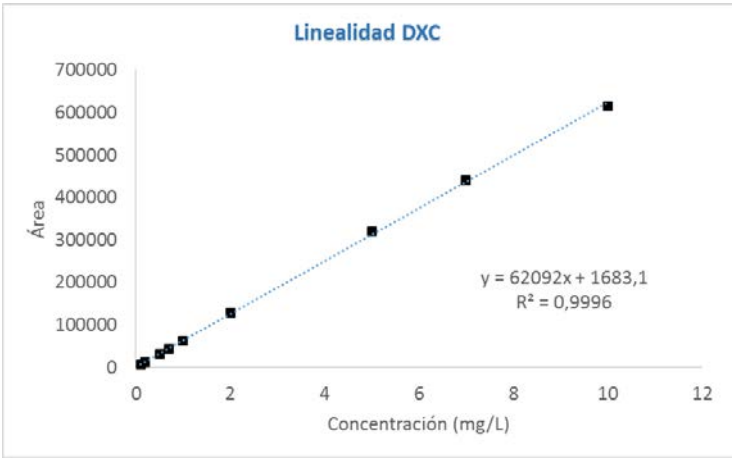


Figura 34: *Linealidad doxiciclina: representación de la señal (área) frente a concentración (mg/L)*

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos que puede verse en las siguientes tablas y figuras:

Tabla 24: *Estadística de la regresión, resultados de los principales parámetros estadísticos en el estudio de linealidad de las TCs (concentración vs señal)*

	OXT	CLT	DXC
r	0,999691281	0,999790746	0,999797332
r^2	0,999382658	0,999581536	0,999594704
r^2 ajustado	0,999294467	0,999521755	0,999536805
Error típico	7909,895411	2884,056857	4767,075065
t intercepción	0,212	-0,134	0,797
t variable x	106,45	129,31	131,39
Número de muestras	9	9	9

Tabla 25: *Valores de residuos obtenidos (residuos obtenidos en el ajuste estadístico por mínimos cuadrados)*

Muestra	*Residuos OXT*	*Residuos CLT*	*Residuos DXC*
1	3907,79398	172,100111	-1613,23245
2	2487,81842	173,394487	-1793,75825
3	1728,92639	694,401178	-1271,8
4	875,297334	2819,4359	-2070,33031
5	4239,28561	-3064,1483	-984,159697
6	-5096,07991	2265,18472	2385,04991
7	-11694,7201	-5509,76215	8487,31891
8	-8848,05918	261,348515	4075,4825
9	12399,7375	2188,04554	-7214,5706
SUMA	1,72804E-10	1,40972E-10	2,27374E-10

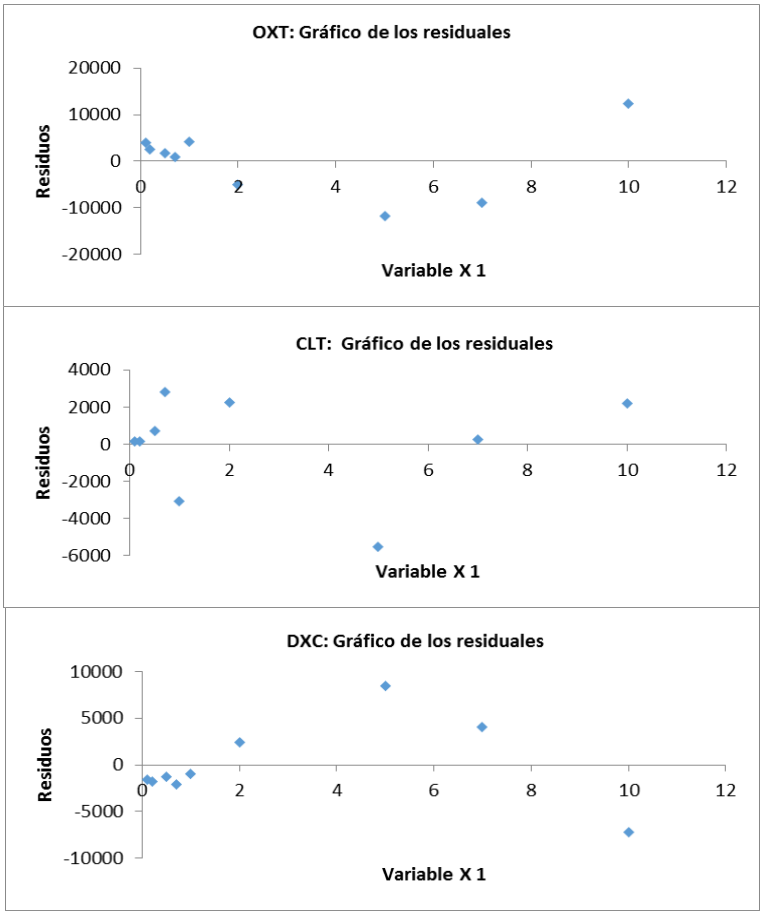


Figura 35: *Gráfico de los residuales frente a la variable x (concentración en mg/L)*

El valor del coeficiente de correlación r era en los tres casos 0,999, lo que indicaba una buena correlación de los datos. El valor del estadístico t (t student) para 8 grados de libertad era 1,8595. En los tres casos el valor de t para la pendiente era mayor que ese

valor, lo que significaba que la pendiente era significativamente diferente de cero. Por otro lado, el valor de t intercepción era mayor que el correspondiente "t teórico" recogido en las tablas, por lo tanto el error sistemático del método no era significativo. En cuanto a los residuales, su representación era aleatoria (figura 23) y no reflejaba ninguna tendencia lo que indicaba un buen ajuste lineal. Por lo tanto, se concluyó que el método era lineal en el rango de 0,1 a 10 ppm para los tres antibióticos.

4.5.1.3. Precisión y exactitud

La precisión y exactitud del método se evaluó dopando una matriz de lodos activados y de purines (consideradas las dos matrices que constituyen un peor caso) a un nivel de concentración (5 ppm), por triplicado.

La exactitud se determinó a partir de la recuperación obtenida en las extracciones, y se consideró un criterio de recuperación, dada la naturaleza de este método de 80-120%. En cuanto a la precisión, se determinó a partir de coeficiente de variación obtenido en las tres preparativas, como criterio de aceptación se consideró un 5,0% (RSD). En las siguientes tablas (26 y 27) pueden verse los resultados obtenidos.

***Tabla 26**: Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de las TCs en muestra de lodos activados*

Matriz muestra: Lodo activado	Recuperación OXT (%)	Recuperación CLT (%)	Recuperación DXC (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	90,4	90,5	83,9
Nivel 5 ppm Preparativa 2	95,3	92,7	87,7
Nivel 5 ppm Preparativa 3	91,5	89,5	89,8
Media	**92,4**	**90,9**	**87,1**
RSD	**2,8**	**1,8**	**3,4**

Los resultados obtenidos demostraban que el método presentaba una exactitud y precisión aceptables para el estudio propuesto.

Los resultados obtenidos cumplían los criterios previamente fijados, aunque los porcentajes de recuperación eran ligeramente bajos especialmente para la doxiciclina, por lo que en los análisis de muestras reales, se aplicaron los factores de corrección: 1,06 (OXT); 1,09 (CLT) y 1,2 (DXC).

***Tabla 27**: Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de las TCs en muestra de purines*

Matriz muestra: Purines	Recuperación OXT (%)	Recuperación CLT (%)	Recuperación DXC (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	93,9	89,6	86,4
Nivel 5 ppm Preparativa 2	90,3	90,1	83,9
Nivel 5 ppm Preparativa 3	92,8	90,7	85,7
Media	**92,3**	**90,1**	**85,3**
RSD	**2,0**	**0,6**	**1,5**

4.5.1.4. Límite de detección y cuantificación

Se acepta como límite de detección (LOD) aquella concentración de analito que produce una señal ruido de 3:1 y como límite de cuantificación (LOQ) aquella que produce una señal ruido de 10:1.

En este caso, en el equipo Waters E-600 con detector PDA 2996, el LOD para la OXT se estableció en 0,05 ppm y el LOQ en 0,1 ppm. En el caso de la CLT y DXC, si bien se demostró una linealidad entre 0,1 y 10 ppm, la señal ruido al nivel de 0,1 ppm no llegaba en todas las inyecciones realizadas a 10:1, por lo que el LOQ tuvo que establecerse en 0,2 ppm y el LOD en 0,1 ppm para estos dos antibióticos, siendo éste menos sensible.

4.5.1.5. Estabilidad de las disoluciones

Se evaluó la estabilidad de las soluciones patrón y muestra refrigeradas en nevera (4-10°C) durante un periodo de 72 horas para las muestras y de 7 días para los patrones. Como criterio de aceptación se estableció que el área de los picos de los antibióticos no variara en más de 5,0% con respecto al valor inicial. Para este ensayo se utilizaron las muestras de lodos activados y purines dopadas del ensayo de exactitud y uno de los patrones (5 ppm) del ensayo de linealidad (tablas 28 y 29).

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se concluyó que las muestras podían almacenarse durante 48 horas a temperatura ambiente y 1 mes en congelador antes de su análisis si era necesario y que los patrones preparados eran válidos durante una semana a temperatura ambiente y durante dos meses almacenados en congelador.

***Tabla 28**: Estabilidad de los patrones de las TCs (preparados en el mismo diluyente que las muestras)*

Patrón (5 ppm)	Área (AU) OXT	Área (AU) CLT	Área (AU) DXC
Tiempo 0	406398,00	179165,21	287146,11
7 días TA*	398876,54	170988,67	276987,54
Diferencia (%)	**1,9**	**4,6**	**3,5**
2 meses T= -10°C**	382765,98	168322,09	277654,33
Diferencia (%)	**1,9**	**4,6**	**3,5**

*TA: Temperatura ambiente (20-25°C)

**En congelador convencional

***Tabla 29**: Estabilidad de las TCs en las muestras de lodos y purines (muestras de lodos y purines dopadas con las TCs)*

Muestra lodos activados dopada	Área (AU) OXT	Área (AU) CLT	Área (AU) DXC
Tiempo 0	367383,79	187585,97	308682,06
48 h TA	355719,90	179876,56	296549,65
Diferencia (%)	3,2	4,1	3,9
1 mes T= -10°C**	356278,09	182365,22	298765,15
Diferencia (%)	3,0	2,8	3,2
Muestra purines dopada	Área (AU) OXT	Área (AU) CLT	Área (AU) DXC
Tiempo 0	388922,88	178627,71	266471,51
48 h TA	377654,76	172347,65	255477,32
Diferencia (%)	2,9	3,5	4,1
1 mes T= -10°C**	384659,99	175689,67	263897,82
Diferencia (%)	1,1	1,6	1,0

*TA: Temperatura ambiente (20-25°C)

**En congelador convencional

4.5.1.6. Robustez

En este caso, se realizó un ensayo de robustez muy sencillo ya que no se esperaba que pudieran darse variaciones significativas en la ejecución del método. Se estudió el parámetro: flujo de fase móvil (1,5 – 1,0 mL/min).

Para determinar la equivalencia entre ambos flujos, se inyectó una de las preparativas de la matriz de purines del ensayo de exactitud y se calculó su recuperación. Se consideró como criterio de aceptación que los resultados no difirieran en más de un 3,0%, los resultados obtenidos pueden verse en el tabla 30.

Tabla 30: *Robustez del método analítico: Influencia del flujo de fase móvil en los resultados del método analítico (en las recuperaciones en muestras dopadas)*

Matriz muestra: Purines	Recuperación OXT (%)	Recuperación CLT (%)	Recuperación DXC (%)
Nivel 5 ppm Ensayo 1 Flujo 1,5%	95,7	99,7	92,8
Nivel 5 ppm Ensayo 1 Flujo 1,0%	93,5	99,1	94,7
Diferencia	2,2	0,6	1,9

Por lo tanto, se demostró que el método era robusto para flujo 1,0 y 1,5 mL/min. Esto no excluye que en función de las matrices de muestra tuvieran que hacerse ajustes en la fase móvil y flujo.

4.5.2. Tilosina

Al igual que con las tetraciclina, a continuación se incluye un resumen de los parámetros validados y los resultados obtenidos. Las condiciones del método validado fueron las siguientes:

- ✓ Cromatografía de fase reversa
- ✓ Columna Phenomenex Luna® C_{18} 250 x 4,60 mm, 5µm (con precolumna C18)
- ✓ Fase móvil: 30% Acetonitrilo: 10% 1-Propanol: 60% Tampón de acetatos (0.01 M, pH=5,0) v/v/v
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL
- ✓ Longitud de onda del detector: 287 nm
- ✓ Temperatura de columna e inyector: no controladas (ambiente 20-25°C)
- ✓ Flujo: 1,0 mL/min

4.5.2.1. Selectividad

La selectividad del método se evaluó de la misma forma que en el caso de las tetraciclinas. No se obtuvieron picos interferentes con los analitos de interés, siendo la resolución en todos los casos superior a 1,0.

Por lo tanto, se demostró que el método era específico para la determinación de este antibiótico en aguas residuales, lodos activados y purines.

4.5.2.2. Linealidad

La linealidad se estudió en un rango de concentraciones entre 0,2 y 10 mg/L, con 7 niveles. En este caso la linealidad no se extendió hasta 0,1 ppm ya que para este compuesto ese nivel era inferior al LOQ determinado

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 31 y la figura 36.

Tabla 31: *Linealidad: Datos de concentración frente a resultados de área (para establecer la linealidad entre estas magnitudes para la tilosina)*

Concentración (mg/L)	Área (AU) **Tilosina**
0,2	8076,56
0,5	13675,9
0,7	23657,76
1	33561,8
5	160768
7	223075,7
10	321536

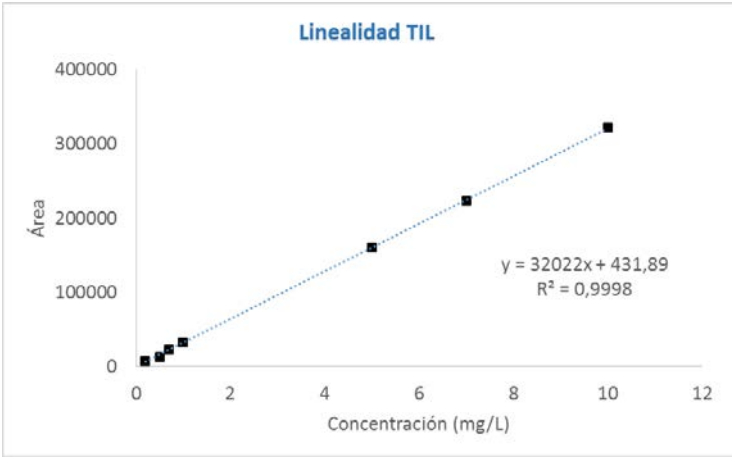


Figura 36: *Linealidad tilosina, representación de la señal (área) frente a concentración (mg/L)*

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos que puede verse en las tablas 32 y 33 y en la figura 37.

El valor del coeficiente de correlación r era 0,999, lo que indicaba una buena correlación de los datos. El valor del estadístico t, con intervalo de confianza del 95% y 6 grados de libertad era 1,9432. En los tres casos el resultado de t para la pendiente era mayor que ese valor, lo que significaba que la pendiente era significativamente diferente de cero. Por otro lado, el valor de t intercepción era mayor que el correspondiente "t teórico" recogido en las tablas, por lo tanto el error sistemático del método no era

significativo. En cuanto a los residuales (ver figura 38), su representación era aleatoria y no reflejaba ninguna tendencia, lo que indicaba un buen ajuste al modelo lineal. Por lo tanto, se concluyó que el método era lineal en el rango de 0,2 a 10 ppm para la tilosina (forma A).

Tabla 32: *Estadística de la regresión, resultados de los principales parámetros estadísticos en el estudio de linealidad de la TIL (concentración vs señal)*

	TIL
r	0,9999
r^2	0,9998
r^2 ajustado	0,9998
Error típico	1684,771
t intercepción	0,487
t variable x	18,040
Muestras	7

Tabla 33: *Valores de residuos obtenidos (residuos obtenidos en el ajuste estadístico por mínimos cuadrados)*

Muestra	*Residuos TIL*
1	1240,337537
2	-2766,820238
3	810,7079121
4	1108,250137
5	227,8131349
6	-1507,805366
7	887,5168824
SUMA	-3,36513E-11

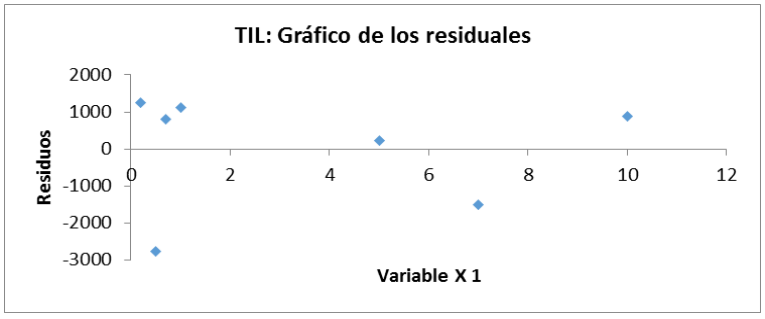


Figura 37: *Gráfico de los residuales frente a la variable x (concentración en mg/L)*

4.5.2.3. Precisión y exactitud

La precisión y exactitud del método se evaluó de manera análoga al caso de las tetraciclinas. La exactitud se determinó a partir de la recuperación obtenida en las extracciones, se consideró un criterio de recuperación, dada la naturaleza de este método de 80-120%.

En cuanto a la precisión, se determinó a partir del coeficiente de variación obtenido en las tres preparativas, y como criterio de aceptación se consideró un 5,0% (RSD). En las siguientes tablas pueden verse los resultados obtenidos.

***Tabla 34**: Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de la tilosina en muestras de lodos activados*

Matriz muestra: Lodo activado	Recuperación TIL (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	89,4
Nivel 5 ppm Preparativa 2	92,4
Nivel 5 ppm Preparativa 3	94,5
Media	92,1
RSD	2,8

***Tabla 35**: Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de la tilosina en muestras de purines*

Matriz muestra: Purines	Recuperación TIL (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	93,5
Nivel 5 ppm Preparativa 2	88,6
Nivel 5 ppm Preparativa 3	89,5
Media	90,5
RSD	2,9

Los resultados obtenidos cumplían los criterios previamente fijados, si bien las recuperaciones obtenidas eran ligeramente bajas (en torno al 90%). Por este motivo se decidió aplicar un factor de corrección a los análisis realizados, de manera que las

concentraciones calculadas mediante el análisis cromatográfico debían ser corregidas con el factor 1,1.

4.5.2.4. Límite de detección y cuantificación

En este caso, el LOD para la TIL se estableció en 0,1 ppm y el LOQ en 0,2 ppm.

4.5.2.5. Estabilidad de las disoluciones

Se evaluó la estabilidad de las soluciones patrón y muestra refrigeradas en nevera (4-10°C) durante un periodo de 72 horas para las muestras y de 7 días para los patrones. Como criterio de aceptación se estableció que el área de los picos de los antibióticos no variara en más de 5,0% con respecto al valor inicial. Para este ensayo se utilizaron las muestras de lodos activados y purines dopadas del ensayo de exactitud y uno de los patrones (5 ppm) del ensayo de linealidad (tabla 36).

***Tabla 36**: Estabilidad de las disoluciones (patrón de tilosina y muestras reales de lodos activados y purines dopadas con tilosina)*

Patrón (5 ppm)	Área (AU) TIL
Tiempo 0	160768
7 días en nevera	135678
Diferencia (%)	*15,6**
Muestra lodos activados dopada	Área (AU) TIL
Tiempo 0	144691,2
72 horas en nevera	137865
Diferencia (%)	4,7
Muestra purines dopada	Área (AU) TIL
Tiempo 0	139854,4
72 horas en nevera	134456
Diferencia (%)	3,9
Patrón (5 ppm)	Área (AU) TIL
Tiempo 0	156894
4 días en nevera	149876
Diferencia (%)	*4,5*

*Debido a que no se cumplía con el criterio de estabilidad para el patrón a los 7 días, se repitió el ensayo tras 4 días.

Por lo tanto, se concluyó que las muestras podían almacenarse durante 72 horas antes de su análisis si fuera necesario y que los patrones preparados eran válidos durante cuatro días siempre que se almacenaran todas las disoluciones en nevera entre 4-10°C.

4.5.2.6. Robustez

En este caso, al igual que para las tetraciclinas, se planteó un test de robustez muy sencillo. Se estudió el parámetro: composición de la fase móvil.

La fase móvil era: 30% acetonitrilo: 10% 1-propanol: 60% tampón de acetatos (0,01 M, pH=5,0), la modificación que se realizó fue sobre la parte orgánica, se disminuyó el 1-propanol a 5%, aumentando proporcionalmente la parte acuosa (tampón de acetatos).

Para determinar la equivalencia entre ambas fases móviles, se inyectó una de las preparativas de la matriz de purines del ensayo de robustez y se calculó su recuperación. Se consideró como criterio de aceptación que los resultados no difirieran en más de un 3,0% (tabla 37) con respecto al valor obtenido en la exactitud.

Tabla 37: *Robustez del método respecto a una variación en la composición de la fase móvil, expresada en procentajes de recuperación en muestras reales de purines dopadas con la tilosina*

Matriz muestra: Purines	Recuperación TIL (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1 Flujo 1,5%	89,4
Nivel 5 ppm Preparativa 1 1-propanol 5%	91,6
Diferencia	2,5

Por lo tanto, se demostró que el método era robusto el cambio en la proporción de 1-propanol en la fase móvil, teniendo en cuenta que cuando se reducía de 10 a 5%, el tiempo del cromatograma debía aumentarse 10 minutos más. También deberán hacerse ajustes si se produce algún cambio en las matrices de muestra.

4.5.3. Amoxicilina

Al igual que con las tetraciclinas y tilosina, a continuación se incluye un resumen de los parámetros validados y los resultados obtenidos. Las condiciones del método validado fueron:

- ✓ Cromatografía de fase reversa
- ✓ Columna Waters Spherisorb® NH_2 250 x 4,60 mm, 5µm
- ✓ Fase móvil: 65% Acetonitrilo: 35% Tampón fosfato (0,1 M, pH=6,0)
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL

- ✓ Longitud de onda del detector: 240 nm
- ✓ Temperatura de columna e inyector: no controladas (ambiente 20-25°C)
- ✓ Flujo: 1,0 mL/min

4.5.3.1. Selectividad

La selectividad del método se evaluó de la misma forma que en el caso de las tetraciclinas y tilosina.

No se obtuvieron picos interferentes con los analitos de interés, siendo la resolución en todos los casos superior a 1,0. Por lo tanto, se demostró que el método era específico para la determinación de este antibiótico en aguas residuales, lodos activados y purines.

4.5.3.2. Linealidad

La linealidad se estudió en un rango de concentraciones entre 0,2 y 10 mg/L, con 7 niveles. En este caso la linealidad no se extendió hasta 0,1 ppm ya que para este compuesto ese nivel está por debajo del LOQ. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 38 y la figura 38.

Tabla 38: *Linealidad: Datos de concentración frente a resultados de áreas (para establecer la linealidad entre estas magnitudes para la AMX)*

Concentración (mg/L)	Área (AU) **amoxicilina**
0,2	2006,87
0,5	4009,32
0,7	5987,65
1	8965,76
5	43875,98
7	64553,49
10	90004,76

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos que puede verse en las tablas 39-40 y en la figura 39.

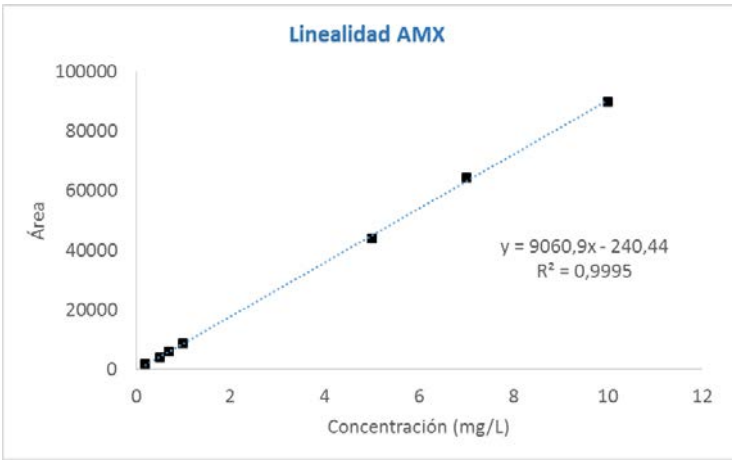


Figura 38: *Linealidad amoxicilina, representación de la señal (área) frente a concentración (mg/L)*

Tabla 39: *Estadística de la regresión, resultados de los principales parámetros estadísticos en el estudio de linealidad de la AMX (concentración vs señal)*

	AMX
r	0,999750616
r^2	0,999501294
r^2 ajustado	0,999401552
Error típico	862,1661758
t intercepción	-0,53009
t variable x	100,104648
Muestras	7

Tabla 40: *Valores de residuos obtenidos (residuos obtenidos en el ajuste estadístico por mínimos cuadrados)*

Muestras	*Residuos AMX*
1	435,1210943
2	-280,710484
3	-114,568203
4	145,2602192
5	-1188,27416
6	1367,358656
7	-364,187126
SUMA	-2,6148E-11

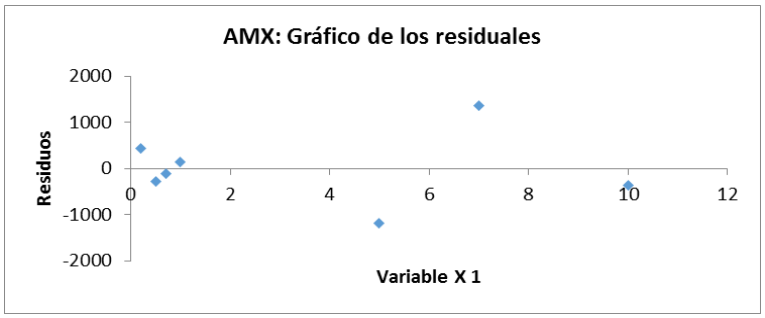


Figura 39: *Gráfico de los residuales frente a la variable x (concentración en mg/L)*

El valor del coeficiente de correlación r era 0,999, lo que indica una buena correlación de los datos. El valor del estadístico t, con intervalo de confianza del 95% y 6 grados de libertad era 1,9432. En los tres casos el resultado de t para la pendiente era mayor que ese valor, lo que significaba que la pendiente era significativamente diferente de cero. Por otro lado, el valor de t intercepción era menor que el correspondiente "t teórico" recogido en las tablas, por lo tanto el error sistemático del método no era significativo. En cuanto a los residuales (ver figura 40), su representación era aleatoria y no reflejaba ninguna tendencia (indicativo de buen ajuste al modelo lineal). Por lo tanto, se concluyó que el método era lineal en el rango de 0,2 a 10 ppm para la amoxicilina.

4.5.3.3. Precisión y exactitud

La precisión y exactitud del método se evaluó de manera análoga al caso de las tetraciclinas y tilosina.

En las siguientes tablas pueden verse los resultados obtenidos.

Tabla 41: *Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de la amoxicilina en muestras de lodos activados*

Matriz muestra: Lodo activado	Recuperación AMX (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	82,2
Nivel 5 ppm Preparativa 2	81,4
Nivel 5 ppm Preparativa 3	79,6
Media	81,1
RSD	1,6

***Tabla 42**: Exactitud y precisión (expresada como porcentajes de recuperación) del método de análisis de la amoxicilina en muestras de lodos activados*

Matriz muestra: Purines	Recuperación AMX (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1	83,6
Nivel 5 ppm Preparativa 2	80,5
Nivel 5 ppm Preparativa 3	79,7
Media	81,3
RSD	2,5

Los resultados obtenidos cumplían los criterios previamente fijados. Se concluyó que el método de determinación de la amoxicilina era exacto.Las recuperaciones obtenidas eran ligeramente bajas, por este motivo se decidió aplicar un factor de corrección a los análisis de muestras que se realizaran, el factor aplicado fue 1,2.

4.5.3.4. Límite de detección y cuantificación

En este caso, también como en los anteriores antibióticos, el LOD para la AMX se estableció en 0,1 ppm y el LOQ en 0,2 ppm.

4.5.3.5. Estabilidad de las disoluciones

Se realizó de manera similar al caso de la tilosina (ver tabla 43).

***Tabla 43**: Estabilidad de las disoluciones (patrón de amoxicilina y muestras reales de lodos activados y purines dopadas con amoxicilina)*

Patrón (5 ppm)	Área (AU) AMX
Tiempo 0	43875,98
7 días en nevera	41954,65
Diferencia (%)	4,4
Muestra lodos activados dopada	Área (AU) AMX
Tiempo 0	46069,779
72 horas en nevera	44563,65
Diferencia (%)	3,3
Muestra purines dopada	Área (AU) AMX
Tiempo 0	47824,8182
72 horas en nevera	48653,98
Diferencia (%)	1,7

Por lo tanto, se concluyó que las muestras podían almacenarse durante 72 horas en nevera antes de su análisis si fuera necesario y que los patrones preparados eran válidos durante siete días siempre que se almacenaran todas las disoluciones en nevera entre 4-10°C.

4.5.3.6. Robustez

En este caso, al igual que para las tetraciclinas y tilosina, se planteó un test de robustez muy sencillo. Se estudió el parámetro: longitud de onda de detección, 250 y 230 nm en vez de 240 nm.

Para determinar la equivalencia entre las longitudes de onda del PDA, se inyectó una de las preparativas de la matriz de purines del ensayo de exactitud y se calculó su recuperación. Se consideró como criterio de aceptación que los resultados no difirieran en más de un 3,0% (tabla 44).

Tabla 44: *Robustez del método respecto a una variación en La longitud de onda de detección, expresada en porcentajes de recuperación en muestras reales de purines dopadas con la amoxicilina*

Matriz muestra: Purines	Recuperación AMX (%)
Nivel 5 ppm Preparativa 1 240 nm	83,6
Nivel 5 ppm Preparativa 1 250 nm	84,2
Diferencia	0,6
Nivel 5 ppm Preparativa 1 230 nm	81,5
Diferencia	2,1

Por lo tanto, se demostró que el método era robusto el cambio en la longitud de onda de detección en ± 10 nm.

4.6. Publicaciones

El trabajo realizado en este capítulo se ha incluido en tres publicaciones:

- ✓ Póster: “Determinación cuantitativa de antibióticos de uso veterinario en purines, aguas residuales y lodos de depuradora mediante HPLC”. (2005).

Montes, N., Méndez, R., Hijosa, M., Martín-Villacorta, J. XI Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona.

- ✓ Póster: "Determinación cuantitativa de antibióticos β-lactámicos en aguas residuales y lodos de depuradora mediante HPLC". (2005). Montes, N., Méndez, R., García-González, J.C., Martín-Villacorta, J. XI Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona.
- ✓ Póster: "Validation of a HPLC method for the simultaneous determination of tetracyclines in pig manure slurry". (2009). Montes, N., Méndez, R., Pino, J., Martín-Villacorta, J. SECYTA, San Sebastián, España.

Capítulo 5

Eliminación de antibióticos en sistemas de lodos activados (influencia del TRH y la carga másica)

5.1. Introducción

Como se indicó en el capítulo 1, uno de los objetivos de este trabajo era estudiar la capacidad que tenía el sistema de tratamiento mediante lodos activados de la EDAR de León y su alfoz, en la eliminación de ciertos antibióticos. Adicionalmente se realizó un seguimiento de las concentraciones que alcanzaban determinados iones metálicos en las distintas etapas unitarias de la citada EDAR (con 6 puntos de muestreo).

En el caso de los iones metálicos, su seguimiento en las distintas etapas del proceso podía hacerse directamente a través de muestreos en las secuenciales operaciones unitarias de la EDAR, sin embargo para el estudio de la capacidad de eliminación de antibióticos, y la influencia que ciertos parámetros de control podían tener en su eliminación, se tuvo que recurrir a la modelización a escala de laboratorio. Para ello se diseñaron dos sistemas piloto que fueron puestos en marcha utilizando un inóculo de lodos activados procedentes de la citada EDAR de León. Una vez estabilizados (periodo de generación de las comunidades bacterianas) y bajo un control diario estricto (parámetros físico-químicos e hidráulicos), se aplicaron los antibióticos en el agua residual. Se estudió su eliminación, así como su potencial efecto en la microfauna asociada y la posible generación de cepas bacterianas resistentes a los citados fármacos.

El trabajo de modelización con plantas piloto a escala de laboratorio se desarrolló en distintos períodos utilizando en todos los casos, como se ha indicado anteriormente, lodo procedente de uno de los reactores biológicos de la EDAR de León como inóculo precursor.

Por lo tanto en este capítulo se recogen los resultados de rendimiento en depuración, la eficacia en la eliminación de los antibióticos estudiados, los efectos que generan estos compuestos en la microfauna, el impacto en las comunidades bacterianas así como la potencial aparición de cepas bacterianas resistentes. Por último se recogen los resultados de las concentraciones de distintos iones metálicos (metales pesados) determinados en distintos procesos unitarios de la línea de tratamiento, todo ello referido a la EDAR de León y su alfoz.

5.2. Modelización de un sistema de lodos activados a escala de laboratorio

En el capítulo 3 se incluye la descripción del diseño de las plantas piloto a escala de laboratorio así como la descripción detallada de cada uno de sus componentes. En este capítulo se amplía esta información, y se incluye la composición unitaria de las aguas residuales sintéticas utilizadas en los diferentes estudios de este trabajo.

En los siguientes epígrafes se describen los dos sistemas piloto diseñados. Los estudios llevados a cabo con estas dos plantas piloto se realizaron en una primera fase con distintos tiempos de retención hidráulicos, manteniendo igual edad celular y carga másica y en una segunda fase con distinta carga másica e igual edad celular y tiempo de retención hidráulico.

5.2.1. Plantas piloto con distinto tiempo de retención hidráulico

Se define el tiempo de retención hidráulico (TRH) como la relación entre el volumen del reactor biológico y el caudal que entra en el mismo (Ec. 5-1).

$$TRH(h) = \frac{V(m^3)}{Q(\frac{m^3}{h})} \qquad \text{(Ec. 5-1)}$$

Para estudiar el efecto potencial que este parámetro podía tener en la eliminación de nutrientes y de los antibióticos seleccionados, se pusieron en marcha dos plantas piloto denominadas “V” y “M” (que hace referencia la material con el que estaban construidas, vidrio y metacrilato). Se trataba de sistemas a escala de laboratorio con un reactor biológico agitado continúo con recirculación y purga desde el reactor.

A los reactores se les suministró aire mediante un compresor de aire con difusor, que permitió obtener una concentración de oxígeno en el licor del reactor de unos 5-8 mg/L en ambos. Por lo tanto se trató de sistemas aerobios.

En ambos se estableció un tiempo de retención hidráulico dentro del intervalo más común en este tipo de instalaciones. Adicionalmente para descartar la influencia de algún otro factor (como puede ser pequeñas diferencias en el diseño de las plantas, ya que una era de vidrio y otra de metacrilato) se permutaron los tiempos de retención en las plantas, es decir la planta “V” se mantuvo con el tiempo de retención de la “M” en una segunda fase y viceversa. Previa a la permutación de las condiciones de ambas plantas, el licor de mezcla de ambos reactores se mezcló y homogeneizó en un recipiente externo y se repartió entre ambos tanques.

El resto de parámetros de control (carga másica, edad celular, recirculación, etc) se mantuvieron en los mismos valores en ambas plantas.

Los tiempos de retención hidráulicos estudiados fueron 24 y 8 horas. En la primera fase del estudio se mantuvo la planta “V” con TRH =24 h y la “M” con TRH =8 h. Cada una de las fases tuvo una duración de 60 días (2 meses). En la tabla 45 se presenta un resumen de las fases del estudio.

Tabla 45: *fases del estudio con sistemas piloto a escala de laboratorio sobre la influencia del* TRH en la eliminación de ciertos contaminantes

	Planta piloto V	Planta piloto M
Fase 1	TRH=24 h Etapa-1: Estabilización del sistema 30 días Etapa -2: Adición de antibióticos al afluente 30 días	TRH =8 h Etapa -1: Estabilización del sistema 30 días Etapa -2: Adición de antibióticos al afluente 30 días
Fase 2	TRH =8 h Etapa -1: Estabilización del sistema 30 días Etapa -2: Adición de antibióticos al afluente 30 días	TRH=24 h Etapa -1: Estabilización del sistema 30 días Etapa -2: Adición de antibióticos al afluente 30 días

Los parámetros de funcionamiento fijados para ambas plantas se recogen en la tabla 46.

Tabla 46: *parámetros de las plantas piloto (estudio sobre la influencia del TRH en la eliminación de ciertos contaminantes)*

Parámetro*	**Planta Piloto V**	**Planta Piloto M**
Volumen reactor	4 L	4 L
Volumen decantador	2 L	2 L
Caudal de entrada	0,17 L/h (4L/d)	0,5 L/h (12L/d)
Caudal de purga	0,017 L/h (0,4 L/d)	0,017 L/h (0,4 L/d)
Edad celular (θx)	15 d	15 d
TRH	**24 h**	**8 h**
Recirculación	130% (0,21 L/h)	130% (0,65 L/h)
Carga másica	0,25 Kg DBO /Kg SSV· d	0,25 Kg DBO /Kg SSV· d

*En la fase 2, se cambiaron los TRH, la planta V funcionó con 8 h y la M con 24 h (previa homogeneización del licor de mezcla de ambas en un recipiente externo)

Como ambas plantas contaban con un reactor de tamaño similar, lo que definía el distinto TRH era el caudal de entrada.

La edad celular se regulaba con el caudal de purga del reactor, es decir se calculó previamente el caudal de purga adecuado para mantener una edad celular de 15 días. Las purgas de lodo del reactor se realizaban cada dos días de forma manual.

En la figura 40 puede verse una imagen de las plantas piloto.

a) b)

Figura 40: Plantas piloto a escala de laboratorio con distinto TRH,
a) Planta "V" y b) Planta "M"

5.2.2. Plantas piloto con distinta carga másica

La carga másica expresa la relación entre cantidad de "alimento" que entra al reactor biológico respecto a la población de microorganismos presentes. Se suele expresar en kilogramos de DBO por kilogramos de microorganismos presentes en el tanque y día.

Al igual que en el caso anterior, se pusieron en marcha las plantas "V" y "M" inoculando lodo activado procedente de uno de los reactores biológicos de la EDAR de León. En este caso, a los reactores también se les suministró aire mediante un compresor con difusor, que permitió obtener una concentración de oxígeno en el licor de unos 5-8 mg/L.

Se siguió un diseño similar al del TRH, se realizaron dos fases (permutando las cargas másicas) con dos subfases: estabilización y generación de las poblaciones bacterianas (30 días) y aplicación de los antibióticos (30 días). La duración fue similar al estudio del TRH (tabla 47).

Los parámetros de control se resumen en la tabla 48. El tiempo de retención hidráulico en este caso se estableció en 12 h para ambos reactores. Al igual que en el estudio anterior, las purgas de lodo del reactor se realizaban cada dos días de forma manual.

Se estudió el efecto en la eliminación de antibióticos y en el rendimiento de depuración, con una carga típica que puede encontrarse en una EDAR, 0,25 Kg DBO /Kg SSV· d y una carga 10 veces inferior (0,025 Kg DBO /Kg SSV· d).

Tabla 47: *fases del estudio con sistemas piloto a escala de laboratorio sobre la influencia de la carga másica e*n la eliminación de ciertos contaminantes

	Planta piloto V	Planta piloto M
Fase 1	Carga másica=0,25 kg DBO/ Kg SSV ·d Etapa-1: Estabilización del sistema 30 días Etapa-2: Adición de antibióticos al afluente 30 días	Carga másica=0,025 kg DBO/ Kg SSV ·d Etapa-1: Estabilización del sistema 30 días Etapa-2: Adición de antibióticos al afluente 30 días
Fase 2	Carga másica=0,025 kg DBO/ Kg SSV ·d Etapa-1: Estabilización del sistema 30 días Etapa-2: Adición de antibióticos al afluente 30 días	Carga másica=0,25 kg DBO/ Kg SSV ·d Etapa-1: Estabilización del sistema 30 días Etapa-2: Adición de antibióticos al afluente 30 días

Tabla 48: *parámetros de las plantas piloto (estudio de la influencia de la carga másica)*

Parámetro*	**Planta Piloto V**	**Planta Piloto M**
Volumen reactor	4 L	4 L
Volumen decantador	2 L	2 L
Caudal de entrada	0,33 L/h (8L/d)	0,33 L/h (8L/d)
Caudal de purga	0,017 L/h (0,4 L/d)	0,017 L/h (0,4 L/d)
Edad celular (θx)	15 d	15 d
TRH	12 h	12 h
Recirculación	130% (0,43 L/h)	130% (0,43 L/h)
SSV (reactor)	2000 mg/L	2000 mg/L
Carga másica	**0,25 Kg DBO /Kg SSV· d**	**0,025 Kg DBO /Kg SSV· d**

*En la fase 2, se permutaron las cargas másicas (previa homogeneización del licor de mezcla de ambas)

5.2.3. Agua residual sintética (alimentación de las plantas piloto)

En el capítulo 3 se citan de manera general los componentes del agua residual sintética. En este apartado se incluye la composición detallada de cada uno de los tipos de agua residual sintética utilizada en los estudios.

5.2.3.1. Agua residual sintética, plantas piloto con distinto TRH

En este caso, para mantener constante la carga másica, el contenido en DBO del agua residual sintética debía adaptarse a los distintos caudales de entrada de ambas plantas, ya que lo que determinaba el diferente tiempo de retención hidráulico era el caudal de alimentación del reactor.

a) Para la planta piloto con TRH de 8 horas y caudal de 12 L/d. La composición del agua residual sintética (afluente) puede verse en la tabla 49. Este agua residual presentaba unos valores de DBO5 de unos 150-250 mg/L.

Tabla 49: *Composición del agua residual sintética, planta piloto con TRH=24h y caudal de entrada 12 L/d*

Componente	Concentración
Extracto de carne	80 mg/L
Etanol	0,1 mL/L
Triptona	8 mg/L
Acetato sódico	8 mg/L
Propionato sódico	8 mg/L
Almidón	8 mg/L
NH_4Cl	125 mg/L
$NaHCO_3$	420 mg/L
Disolución concentrada de microelementos	2 mL/L
Tampón fosfato (pH=7,2)	3mL/L

b) Para la planta piloto con TRH de 24 horas y caudal de 4L/d. La composición del agua residual sintética (afluente) puede verse en la tabla 50. Este agua residual presentaba unos valores de DBO5 de unos 500-700 mg/L.

Tabla 50: *Composición del agua residual sintética, planta piloto con TRH=8h y caudal de entrada 4 L/d*

Componente	Concentración
Extracto de carne	275 mg/L
Etanol	0,3 mL/L
Triptona	28 mg/L
Acetato sódico	28 mg/L
Propionato sódico	28 mg/L
Almidón	28 mg/L
NH_4Cl	388 mg/L
$NaHCO_3$	1050 mg/L
Disolución concentrada de microelementos	7 mL/L
Tampón fosfato (pH=7,2)	10 mL/L

5.2.3.2. Agua residual sintética, plantas piloto con distinta carga másica

En este caso, teniendo en cuenta que el caudal de entrada debía mantenerse igual en ambas plantas para tener el mismo TRH y que la cantidad de sólidos suspendidos volátiles se mantenía en valores similares en ambas, para conseguir una carga másica diferente tuvo que ajustarse el valor de DBO del agua de entrada:

a) Para la planta piloto con TRH de 12 horas y carga másica de 0,25 Kg DBO /Kg SSV· d, caudal = 8L/d. La composición del agua residual sintética (afluente) puede verse en la tabla 51. Este agua residual presentaba unos valores de DBO_5 de unos 250-300 mg/L.

Tabla 51: *Composición del agua residual sintética, estudio con* carga másica 0,25 Kg DBO /Kg SSV· d

Componente	Concentración
Extracto de carne	138 mg/L
Etanol	0,2 mL/L
Triptona	14 mg/L
Acetato sódico	14 mg/L
Propionato sódico	14 mg/L
Almidón	14 mg/L
NH_4Cl	194 mg/L
$NaHCO_3$	520 mg/L
Disolución concentrada de microelementos	4 mL/L
Tampón fosfato (pH=7,2)	5mL/L

b) Para la planta piloto con TRH de 12 horas y carga másica de 0,025 Kg DBO /Kg SSV· d, caudal = 8L/d. La composición del agua residual sintética (afluente) puede verse en la tabla 52. Este agua residual presentaba unos valores de DBO_5 de unos 20-50 mg/L.

Tabla 52: *Composición del agua residual sintética, estudio con* carga másica 0,025 Kg DBO /Kg SSV· d

Componente	Concentración
Extracto de carne	14 mg/L
Etanol	0,1 mL/L
Triptona	2 mg/L
Acetato sódico	2 mg/L
Propionato sódico	2 mg/L
Almidón	2 mg/L
NH_4Cl	20 mg/L
$NaHCO_3$	50 mg/L
Disolución concentrada de microelementos	0,5 mL/L
Tampón fosfato (pH=7,2)	0,5 mL/L

La composición de la disolución concentrada de microelementos y la disolución reguladora de fosfatos (utilizada para evitar fluctuaciones del pH del agua de alimentación) empleadas en todas las preparaciones de aguas residuales sintéticas, se recoge en las tablas 53 y 54.

Tabla 53: *Composición de la disolución de microelementos utilizada en la preparación de los distintos tipos de agua residual*

Disolución de microelementos (en agua)	Concentración
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	132 mg/L
$ZnCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mg/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	16 mg/L
$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	3900 mg/L
$FeCl_2 \cdot 2H_2O$	800 mg/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	940 mg/L

Tabla 54: *Composición de la disolución reguladora de fosfatos utilizada en la preparación de los distintos tipos de agua residual*

Tampón de fosfatos	Concentración
KH_2PO_4	5 g/L
Na_2HPO_4	10 g/L

5.2.4. Aplicación de los antibióticos a las plantas piloto

Como paso previo a la adición de los antibióticos al afluente de las plantas piloto, se estudió la posible inhibición de la actividad bacteriana en sistemas biológicos de lodos activados provocada por la presencia de distintos niveles de antibióticos. Para ello, se realizaron determinaciones de la actividad respiratoria de las poblaciones bacterianas (ensayos de respirometría). La metodología utilizada se describe detalladamente en el capítulo 3.

Los resultados de los ensayos de respirometría se incluyen en el apartado de resultados 5.3.1. En base a ellos, se establecieron las concentraciones de antibióticos adecuadas para los estudios propuestos (concentraciones que no provocaran una inhibición total de la actividad bacteriana).

Una vez evaluada la potencial inhibición de la actividad bacteriana y tras el periodo de estabilización de las plantas piloto, se procedió a aplicar los antibióticos objeto de estudio (AMX, TIL, OXT, CLT y DXC), se aplicaron los cinco simultáneamente en el agua residual de entrada de las plantas (afluente). Para no añadir más factores que pudieran tener influencia en el estudio, la carga de los antibióticos se mantuvo constante en todos los casos. Es decir, la carga se fijó en 40 mg/d de cada uno de los antibióticos. La concentración se ajustó para que en función del diferente caudal de entrada se mantuviera la misma carga diaria. En la tabla 55 se recogen las concentraciones y las cargas diarias.

Tabla 55: *Concentraciones de los antibióticos aplicados en el agua residual sintética de alimentación de las plantas piloto en los estudios sobre la influencia del TRH y la carga másica*

Ensayo	Concentración Ab en agua residual sintética	Carga diaria (mg/d)
Planta con caudal 4L/d	10 mg/L	40 mg
Plantas con caudal 8 L/d	5 mg/L	40 mg
Planta con caudal 12 L/d	3,5 mg/L	40 mg

En este estudio no se planteó estudiar los distintos mecanismos de eliminación, se pretendió determinar el nivel de eliminación de antibióticos y la influencia que ciertos parámetros de control, de los sistemas de tratamiento, tienen sobre esta eliminación, utilizando para ello sistemas piloto.

Es decir, la reducción en la concentración de cada antibiótico en los reactores piloto estudiados fue la suma de la posible adsorción de los mismos a los flóculos, volatilización

(en este caso este mecanismo no se producía a la vista de la estructura y propiedades de los fármacos) y de la biodegradación por parte de los microorganismos presentes.

Otro mecanismo que pudiera repercutir en las concentraciones de los antibióticos era la degradación físico-química previa en el propio agua residual. La influencia de este mecanismo se estudió para cada uno de los antibióticos. Para ello, agua residual sintética previamente esterilizada y sin esterilizar, se dopó con los antibióticos a concentración conocida de 10 mg/L, y se mantuvo a una temperatura constante de 25°C durante 72 horas (ese tiempo cubría el máximo que podía estar el tanque de alimentación en el sistema piloto), analizándose de nuevo mediante HPLC (métodos validados descritos en capítulo 4) para determinar la concentración de los antibióticos después de ese tiempo.

Los resultados demostraron que no se producía una disminución significativa de la concentración de antibióticos, ni en el agua residual esterilizada ni sin esterilizar, excepto para la amoxicilina. En la tabla 56 se muestran los resultados.

Tabla 56: *Concentraciones de los antibióticos en el agua residual sintética en el estudio de la degradación físico-química de los antibióticos en el agua residual sintética*

Antibiótico	Concentración inicial Ab (mg/L)	Concentración tras 72h agua residual esterilizada (mg/L)	Concentración tras 72h agua residual sin esterilizar (mg/L)
Amoxicilina	10,4	2,3	2,5
Tilosina	10,6	10,3	9,9
Oxitetraciclina	10,8	9,8	10,9
Clortetraciclina	9,9	10,0	10,6
Doxiciclina	10,0	10,4	9,8

En el caso de la amoxicilina se detectó una disminución significativa (casi del 80%) en su concentración cuando se aplicaba al agua residual sintética. Por lo tanto, en el caso de este antibiótico se produce una degradación previa del compuesto antes de ser sometido al tratamiento biológico debido a la composición del agua residual

La amoxicilina se ve afectada por factores no biológicos como son la presencia de amonio, el pH del agua residual y el fosfato (Kakimoto et al, 2007). Estos autores llegaron a la conclusión de que la degradación de este antibiótico en aguas residuales dependía de la concentración de amonio, fosfato y del ion hidroxilo.

En el caso concreto de las plantas piloto, para determinar que factor estaba generando la disminución en la concentración de amoxicilina en el agua residual sintética, se diseñó una batería de pruebas experimentales. Por un lado, se preparó agua residual

con distintas concentraciones de fosfatos y microelementos (al doble y a la mitad de la concentración nominal respectivamente) y los resultados mostraron que la degradación de la amoxicilina obtenida fue similar. Por otro lado, se añadió una cantidad conocida de amoxicilina a una matriz que contenía diferentes componentes y se dejaba en contacto durante 24 horas a 25°C. El contenido de amoxicilina se determinaba al inicio y transcurridas las 24 horas mediante análisis cromatográfico. En la tabla 57 se describen las pruebas realizadas y en la figura 41 los resultados obtenidos.

Tabla 57: Pruebas realizadas para determinar el factor influyente en la concentración de amoxicilina en el agua residual

Prueba	Descripción
A	Disolución NH_4Cl (equivalente a. 30 mg N-NH_4^+)/L + 20 mg/L amoxicilina
B	Disolución $NaNO_3$ (equivalente a 30 mg N-NO_3^-/L) + 20 mg/L amoxicilina
C	20 mg/L de amoxicilina en agua mili-Q a pH ligeramente básico
D	Disolución Na_3PO_4 (5mg/L) + 20 mg/L amoxicilina
E	Disolución de $NaHCO_3$ 500 mg/L + 20 mg/L amoxicilina
F	20 mg/L de Amoxicilina en agua residual sintética
G	20 mg/L de Amoxicilina en agua residual sintética con pH ajustado a 4,0

Nota: todas las soluciones fueron esterilizadas antes de añadir la amoxicilina para eliminar una potencial contribución de la degradación biológica.

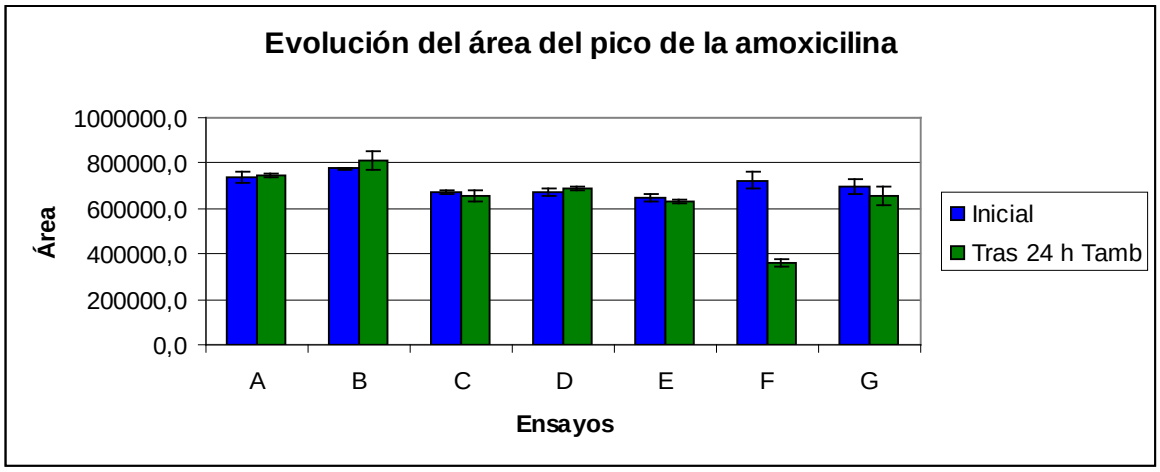


Figura 41: Área del pico de amoxicilina en las distintas pruebas experimentales (A-G) obtenida a tiempo 0 y tras 24 horas a 25°C.

Se observó que la disminución en la concentración de amoxicilina se producía en el caso del agua residual sintética. En el caso de las disoluciones con amonio, fosfato, nitrato y bicarbonato, ya que estos compuestos no tenían efecto sobre la amoxicilina de forma individual.

Por lo tanto, no se detectó una influencia clara del fosfato o del amonio sobre la amoxicilina como se indicaba en la bibliografía. Se pensó en la posibilidad de que alguno de los metales presentes en la disolución de microelementos pudiera estar influyendo en la degradación de este antibiótico. Se planteó la hipótesis de una oxidación, ya que en algunos estudios encontrados, a distintas disoluciones de amoxicilina se les añadía 2-metil-2propanol para prevenirla (Andreozzi et al, 2005). Pero esta idea se descartó ya que este efecto debería haberse observado en las distintas pruebas, no sólo en la realizada en el agua residual.

Tras una búsqueda bibliográfica se encontraron diversos estudios sobre la degradación de la amoxicilina y la acción catalítica que ejercen ciertos metales como el Zn (II), Cd (II) y Co (II), (Gutiérrez-Navarro et al, 1998 y 2003). Por lo tanto, esta degradación catalizada por ciertos elementos presentes en el agua residual sintética (disolución de microelementos) parecía ser la causa más probable de la reducción en la concentración de amoxicilina.

En los estudios sobre la eliminación de amoxicilina en los sistemas de lodos activados no se tuvo en cuenta esta eliminación previa de amoxicilina en el afluente de entrada, para no falsear los resultados y atribuir esta eliminación físico-química a una acción “biológica” en los reactores. Por lo tanto, la toma de muestra del agua residual bruta (no tratada) se tomaba al mismo tiempo que la del correspondiente al efluente tratado.

Una vez realizados los estudios previos para determinar la estabilidad de los antibióticos en el agua residual de alimentación de las plantas piloto, se aplicaron a las plantas piloto, utilizando disoluciones concentradas de los mismos (disoluciones stock). El disolvente utilizado para cada uno de ellos se seleccionó en función de la solubilidad que presentaban los antibióticos en distintos disolventes. Las disoluciones stock se prepararon con una concentración de 500 ppm (0,5 g/L), una para cada antibiótico

La oxitetraciclina se disolvió en una disolución acuosa básica (pH aproximado 9,0); la clortetraciclina y doxiciclina en agua a pH ligeramente básico (7,5-8,0); la amoxicilina en una mezcla de metanol / agua (70:30 v: v) y la tilosina en una mezcla de acetonitrilo / agua (60:40 v: v). A partir de estas soluciones concentradas (disoluciones madre o stock) se añadió el volumen correspondiente para obtener las concentraciones de antibióticos en el agua residual según lo indicado en la tabla 53.

5.3. Resultados

5.3.1. Ensayos de respirometría en el lodo activado

Se determinó la disminución en los ratios de respiración (consumo de O_2 a temperatura constante de 25°C), al añadir los antibióticos en distintas concentraciones en un volumen conocido de lodos activados procedentes de un reactor biológico de la EDAR de León y su alfoz. Los resultados obtenidos mostraron que no se producía ningún efecto significativo sobre la actividad poblaciones bacterianas (poblaciones dominantes: heterótrofas aerobias), incluso a concentraciones de 1000 mg/L de tilosina y amoxicilina. A concentraciones superiores a 100 mg/L para las tetraciclinas se producía una disminución de la respiración celular exógena a unos niveles significativos, especialmente en el caso de la clortetraciclina y doxiclina, llegando incluso al 60% de inhibición de la actividad. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 58 y en la figura 42.

Tabla 58: Porcentajes de inhibición de la respiración celular exógena (%) en lodos activados procedentes de uno de los reactores de la EDAR de León tras la adición de distintas concentraciones de los antibióticos

Concentración (mg/L)	AMX	TIL	CLT	DXC	OXT
0,1	-1,5	2,1	0,6	-2,3	-0,3
1	-0,3	2,5	2,5	-1,7	-1
10	1,9	2,5	-1,6	-1,2	4,9
100	3,5	3,6	7,9	9,1	17
500	-1,9	-6,2	23,1	46,9	16,8
1000	3,7	2,1	60,0	60,9	22,2

Por lo tanto, con estos ensayos de respirometría se demostró que a los niveles a los que se proponía aplicar los antibióticos a los reactores biológicos, no era previsible que se produjera una inhibición de la respiración celular exógena que pudiera afectar a la actividad bacteriana, y que por lo tanto repercutiera en la eficacia en la eliminación de los contaminantes objeto de estudio.

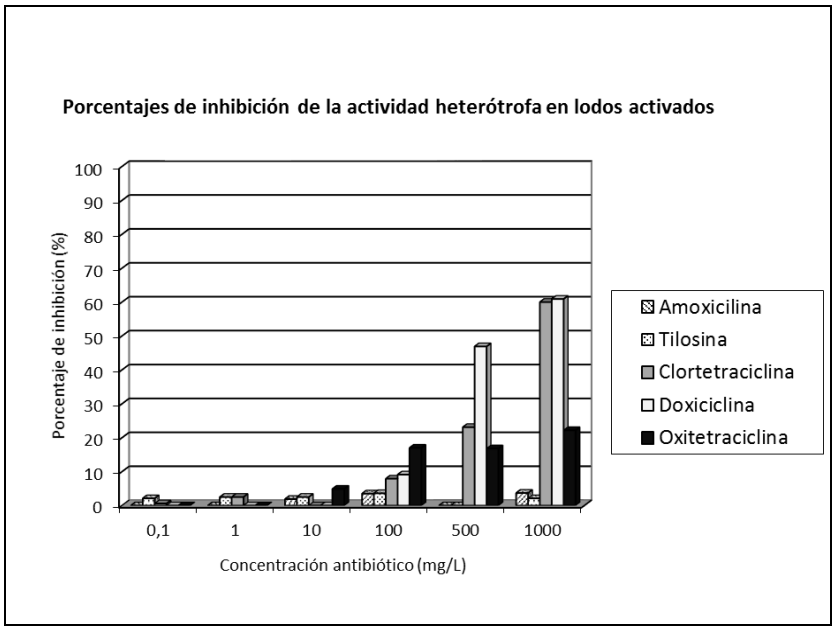


Figura 42: Ratios de inhibición de la actividad heterótrofa aerobia (%) según las concentraciones de los distintos antibióticos aplicados a los lodos activados procedentes de la EDAR de León

5.3.2. Parámetros físico-químicos

A continuación se presentan los resultados de los principales parámetros fisicoquímicos que se utilizaban para el control del funcionamiento de las plantas piloto (y que son empleados para este fin en las EDARs a escala real de manera rutinaria). Estos parámetros eran: DBO_5, DQO, SSV y pH. Estos parámetros fueron determinados en el afluente de entrada (agua residual sintética), en el reactor y en el efluente de salida (agua residual tratada) utilizando los métodos descritos en el capítulo 3.

Todos estos parámetros fueron monitorizados en las distintas fases y etapas del estudio. Para presentar facilitar la revisión e interpretación de los resultados, se codificaron las fases y etapas según los códigos de estudio indicados en la tabla 59.

Tabla 59: Codificación de las fases del estudio sobre la influencia del TRH y carga másica en la eliminación de ciertos antibióticos*

Planta piloto	TRH 24 h	TRH 8 h	Carga másica 0,25 Kg DBO /Kg SSV· d	Carga másica 0,025 Kg DBO /Kg SSV· d
V	**Experimento A**	**Experimento C**	**Experimento E**	**Experimento G**
M	**Experimento B**	**Experimento D**	**Experimento F**	**Experimento H**

*Incluidas ambas subfases (estabilización y aplicación de los antibióticos) en cada estudio, por lo tanto cada estudio tuvo una duración de 60 días

A continuación en la tabla 60 se resumen los valores medios y la desviación estándar de los resultados obtenidos en cada estudio en los parámetros físico-químicos.

Tabla 60: Valores medios y la desviación estándar (σ) de los resultados obtenidos en los parámetros físico-químicos en los distintos experimentos realizados en las plantas piloto a escala de laboratorio (A-H)

Estudio	DBO_5 afluente (mg/L) / σ	DBO_5 efluente (mg/L)/ σ	DQO afluente (mg/L)/ σ	DQO efluente (mg/L)/ σ	SSV efluente (mg/L)/ σ	SSV reactor (mg/L)/ σ	pH afluente/ σ	pH efluente/ σ	H reactor/ σ
A	**561**	**20**	**712**	**46**	**22**	**2595**	**7,66**	**7,73**	**7,72**
	63,83	19,84	81,76	36,68	13,14	366,41	0,27	0,16	0,30
B	**582**	**25**	**695**	**48**	**33**	**2592**	**7,71**	**7,75**	**7,80**
	84,69	17,78	118,33	25,83	10,51	579,16	0,14	0,34	0,22
C	**221**	**20**	**338**	**20**	**25**	**2721**	**7,68**	**7,79**	**7,60**
	39,39	15,20	57,81	23,23	24,46	525,95	0,36	0,47	0,32
D	**249**	**18**	**349**	**20**	**30**	**3453**	**7,86**	**7,35**	**7,65**
	52,61	10,95	55,31	16,06	13,84	820,84	0,25	0,51	0,41
E	**314**	**18**	**414**	**32**	**25**	**2407**	**7,71**	**7,40**	**7,74**
	47,17	13,02	111,05	16,57	8,72	680,91	0,18	0,27	0,22
F	**365**	**18**	**444**	**32**	**33**	**2915**	**7,71**	**8,15**	**7,18**
	48,09	25,79	51,47	20,29	15,89	367,85	0,07	0,41	0,18
G	**64**	**12**	**151**	**27**	**32**	**2840**	**7,58**	**8,05**	**6,94**
	18,55	10,68	46,32	50,37	40,25	492,29	0,22	0,32	0,28
H	**65**	**15**	**142**	**26**	**26**	**3190**	**7,63**	**8,10**	**7,96**
	16,50	10,09	26,80	29,41	29,75	560,76	0,18	0,28	0,14

*Datos promedio exceptuando los 2 primeros días de funcionamiento (etapa de puesta en marcha)

Así mismo, se recogen de manera gráfica los resultados de la monitorización de los parámetros físico-químicos más relevantes en los distintos experimentos. Debido a la extensión de todos los resultados de la monitorización, no se ha considerado adecuado incluir tablas con todos los datos, sino un resumen gráfico.

i)DBO_5

En la figura 43 se muestra la evolución de los valores de la demanda biológica de oxígeno en el afluente y efluente tratado de los distintos experimentos realizados en las dos plantas piloto. Los análisis fueron realizados conforme al método descrito en el capítulo 3.

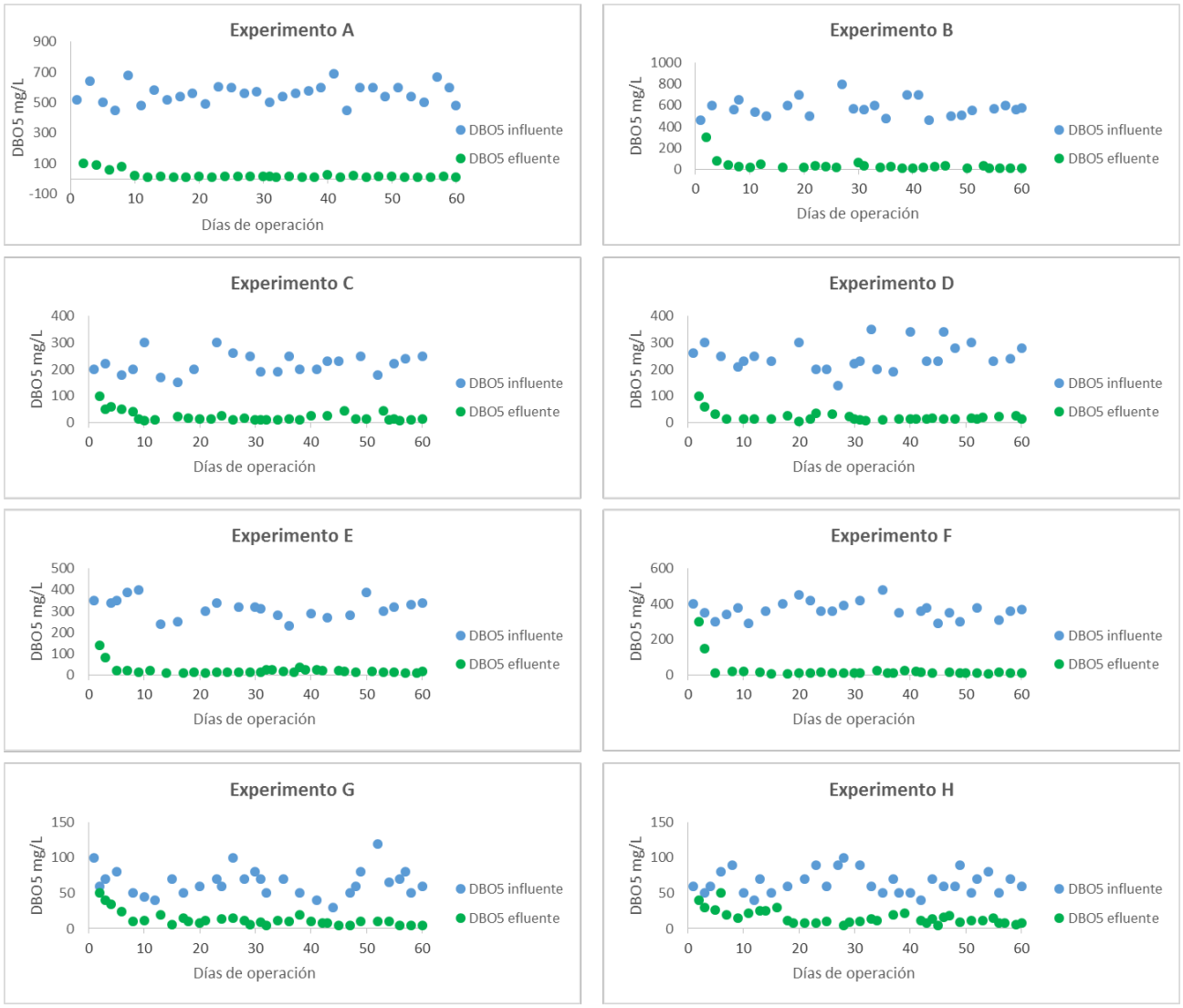


Figura 43: *Evolución de los resultados de DBO_5 obtenidos en el agua residual de entrada y en el efluente tratado en los distintos experimentos (A-H), durante el tiempo de operación de las plantas piloto*

ii) DQO

En la figura 44 se muestra la evolución de los valores de la demanda química de oxígeno en el afluente (también denominado influente) y efluente tratado de los distintos experimentos realizados en las dos plantas piloto. Los análisis fueron realizados conforme al método descrito en el capítulo 3.

iii) Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

El valor de los sólidos suspendidos volátiles es un buen indicador de la cantidad de microorganismos presentes en el proceso, por lo que se determinó en el reactor y en el efluente de salida para estimar la cantidad de microorganismos presentes en el tanque biológico y los que se eliminaban con el agua tratada.

En la figura 45 se muestra la evolución de los valores de los sólidos suspendidos volátiles a lo largo del sistema. Los análisis fueron realizados conforme al método descrito en el capítulo 3.

iv) pH

Se controló el pH periódicamente en el afluente de entrada, reactor y efluente tratado para controlar que no hubiera fluctuaciones de este parámetro que pudieran afectar a la actividad biológica.

En la figura 46 se muestra la evolución de los valores de pH obtenidos. Los análisis fueron realizados directamente con un equipo de medida de pH (equipo descrito en el capítulo 3).

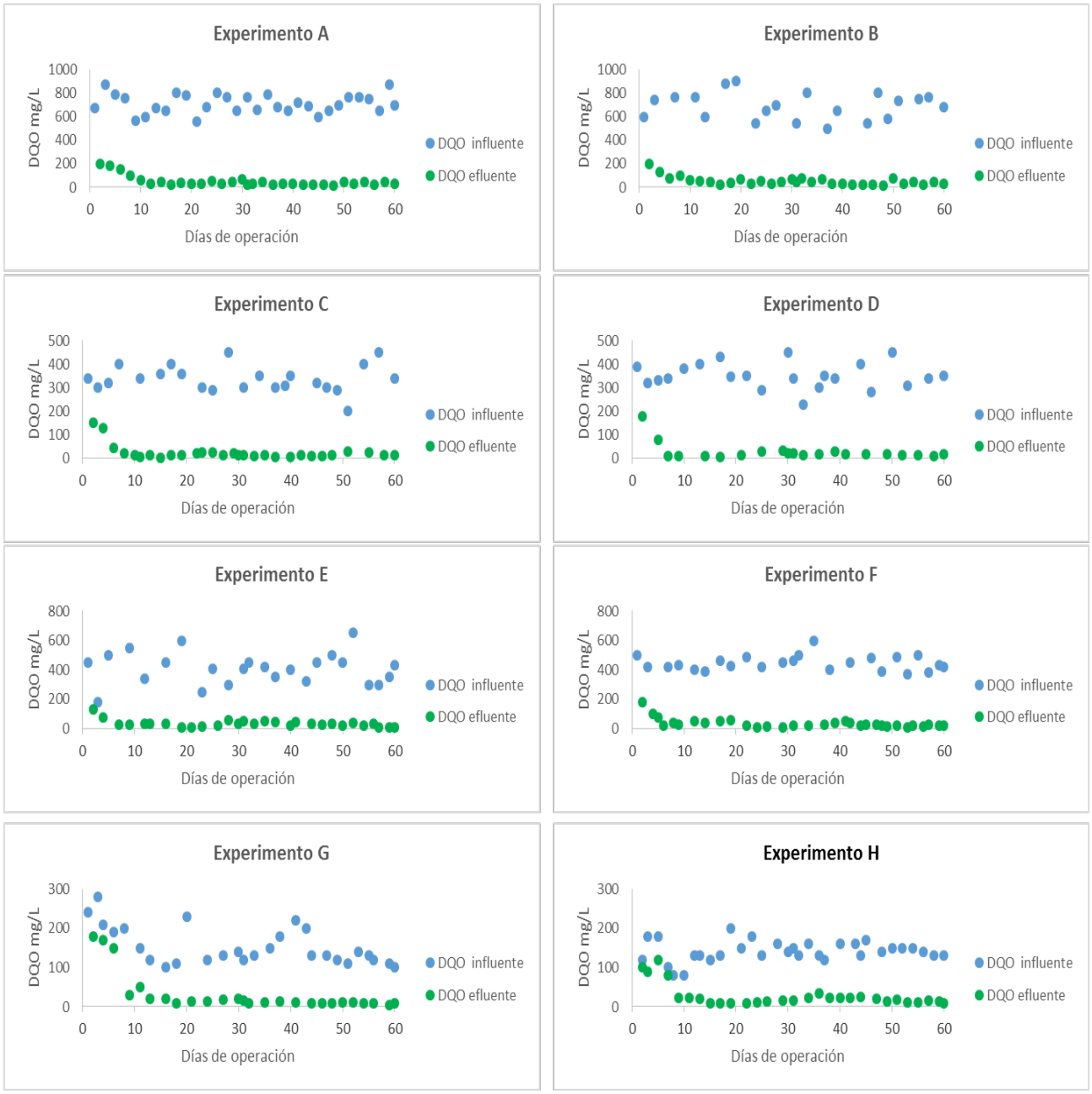


Figura 44: *Evolución de los resultados de DQO en el agua residual de entrada y en el efluente tratado en los distintos experimentos (A-H), durante el tiempo de operación de las plantas piloto*

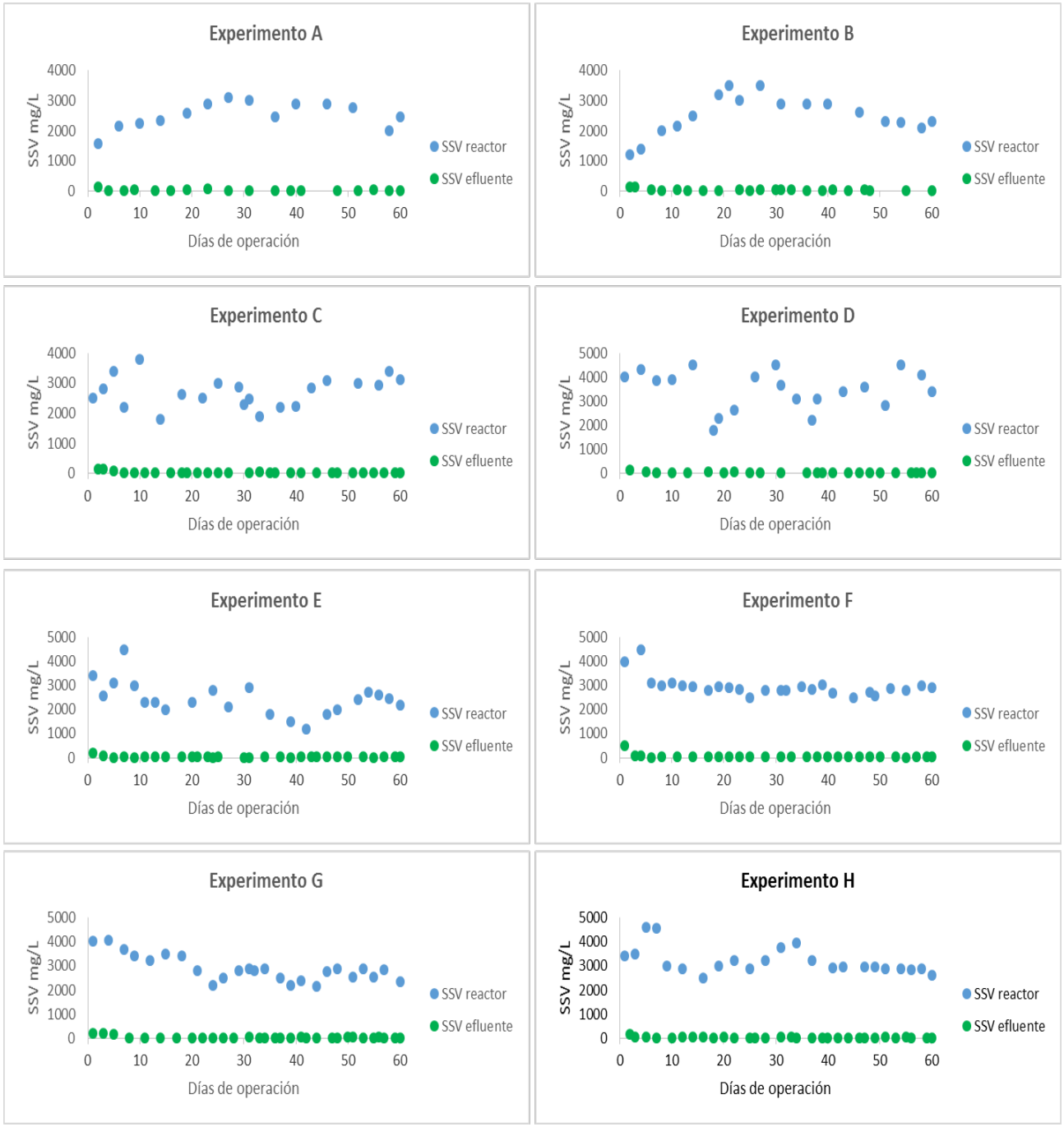


Figura 45: *Evolución de los resultados del parámetro SSV en el lodos del reactor y en el efluente tratado en los distintos experimentos (A-H), durante el tiempo de operación de las plantas piloto*

Figura 46: *Evolución de los resultados de pH en el agua residual de entrada, en el reactor y en el efluente tratado de los distintos experimentos (A-H), durante el tiempo de operación de las plantas piloto*

5.3.3. Rendimiento en la eliminación de materia orgánica

Generalmente se determina la "biodegradabilidad" de un afluente y efluente por la relación que existe entre el valor de la DQO y DBO_5, si esta relación (DQO/DBO_5) es inferior a 2,5 se considera que tiene una "alta biodegradabilidad" y por lo tanto es adecuado utilizar sistemas biológicos para el tratamiento. En el caso concreto de las plantas piloto, tanto el afluente como el efluente presentaban relaciones de DQO/DBO5 inferiores a 2,5 por lo tanto eran altamente biodegradables.

A continuación en la tabla 61 y en las figuras 47 y 48 se recogen los valores medios de eliminación de materia orgánica (expresadad como DBO_5 y DQO) en los distintos ensayos.

Tabla 61: Porcentajes medios y coeficientes de variación (%) en los resultados de eliminación de materia orgánica de las plantas piloto en los distintos experimentos realizados

Estudio	Eliminación DBO_5	Eliminación DQO
A	**96,4%** CV=2,5%	**93,5%** CV=3,5%
B	**95,7%** CV=3,8%	**93,1%** CV=5,2%
C	**91,0%** CV=5,7%	**94,1%** CV=1,1%
D	**92,8%** CV=1,0%	**94,3%** CV=3,6%
E	**94,3%** CV=6,4%	**92,3%** CV=3,5%
F	**95,1%** CV=11,9%	**92,8%** CV=2,5%
G	**81,3%** CV=6,8%	**82,1%** CV=6,2%
H	**76,9%** CV=8,5%	**81,7%** CV=5,9%

Coeficiente de variación (desviación estándar dividida por la media y multiplicada por 100)

Como puede observarse, los rendimientos de los sistemas piloto en la eliminación de materia orgánica fueron superiores al 90% excepto en el caso de los ensayos con muy baja carga másica (0,025 Kg DBO /Kg SSV· d), en los que el rendimiento estuvo entre el 77-82%.

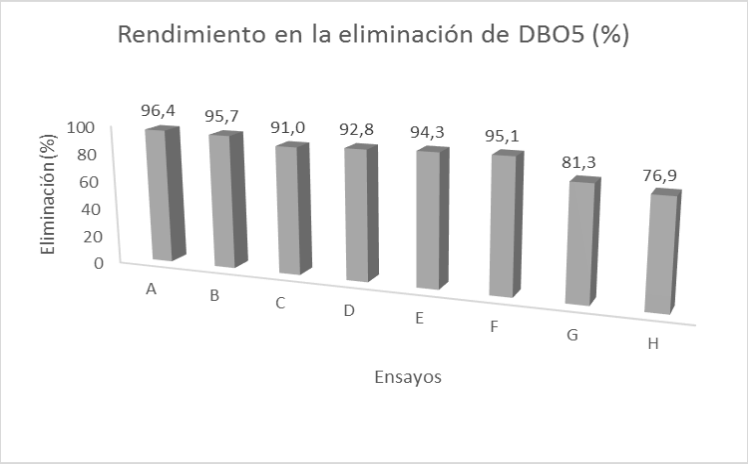


Figura 47: *Gráfico del rendimiento (expresado en % de reducción) en la eliminación de DBO_5 de las plantas piloto en los distintos experimentos realizados (A-H)*

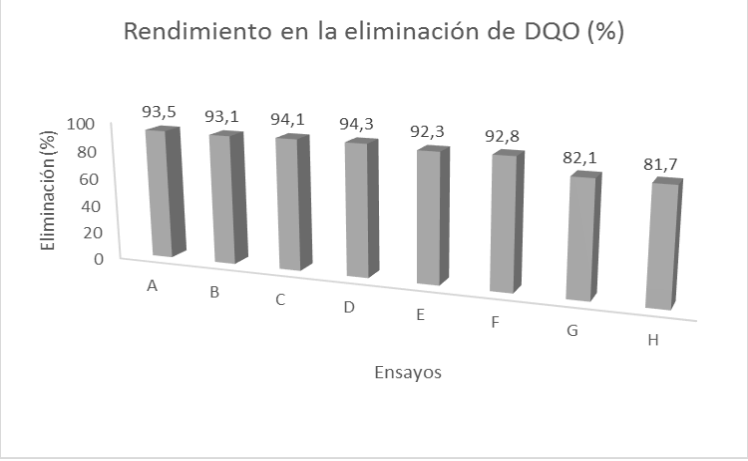


Figura 48: *Rendimiento (expresado en % de reducción) en la eliminación de DQO de las plantas piloto en los distintos experimentos realizados (A-H)*

Cuando la concentración de sustrato es cero, las bacterias respiran endógenamente y no hay crecimiento. Cuando la concentración de sustrato aumenta, hay suficiente carbono para que se dé el crecimiento bacteriano, la relación se muestra en la figura 49 (Spencer, 2005). Por lo tanto, en los dos ensayos con una carga másica 10 veces inferior al resto, el crecimiento bacteriano se vio reducido, si bien es verdad que este hecho no se reflejó en los valores de SSV determinados en el reactor.

Los rendimientos normales de eliminación de materia orgánica en un sistema de lodos activados es superior al 90% (Sustarsic, 2009), por lo tanto en todos los casos se ha obtenido unos rendimientos adecuados, exceptuando los dos ensayos con carga másica 10 veces inferior.

Los rendimientos en la eliminación de materia orgánica no se vieron afectados en ningún caso por la aplicación de los antibióticos (aplicados entre los días 30 y 60 de cada ensayo).

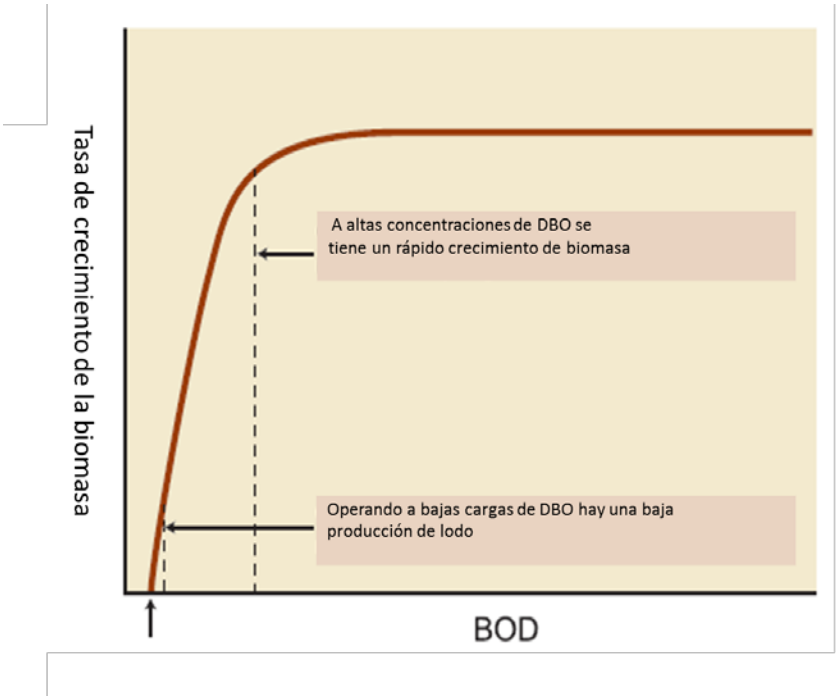


Figura 49: *Relación entre la cantidad de sustrato y el crecimiento bacteriano (adaptado de Spencer, 2005).*

5.3.4. Rendimiento en la eliminación de antibióticos

Como se indicó anteriormente, se aplicaron simultáneamente los 5 antibióticos estudiados con la misma carga en todos los ensayos. Para mantener la carga se ajustó la concentración de cada uno de ellos en el agua residual sintética al caudal de entrada a la planta piloto.

Los porcentajes medios de eliminación obtenidos en los 8 ensayos se presentan en la tabla 62.

Las tasas de eliminación (porcentajes) se determinaron teniendo en cuenta la aproximación de una cinética de eliminación de primer orden.

$$Tasa\ \text{de Eliminación} = \frac{(C_i \cdot Q_i) - (C_e \cdot Q_e)}{C_i \cdot Q_i} \times 100 \qquad \text{(Ec. 5-2)}$$

Donde Ci es la concentración de cada antibiótico en el afluente (mg/L), Qi es el caudal de entrada a la planta piloto (L/d); Ce es la concentración de antibiótico en el efluente tratado (mg/L) y Qe es el caudal del efluente de salida de la planta piloto (L/d).

Tabla 62: Resultados medios y coeficientes de variación en los rendimientos de eliminación (expresados como porcentajes de reducción en las concentraciones) de los antibióticos determinados en los distintos experimentos realizados (A – H)

Estudio	Eliminación (%) OXT	Eliminación (%) CLT	Eliminación (%) DXC	Eliminación (%) AMX	Eliminación (%) TIL
A Planta V TRH= 24h	**92%** CV= 1,3%	**98%** CV= 1,1%	**99%** CV=1,3%	**83%** CV= 2,8%	**59%** CV= 6,2%
B Planta M TRH= 24h	**89%** CV= 3,5%	**95%** CV=2,9%	**100%** CV= 0,2%	**79%** CV= 4,4%	**55%** CV= 4,0%
C Planta M TRH= 8h	**55%** CV=6,5%	**87%** CV=5,1%	**92%** CV=3,8%	**78%** CV=2,2%	**40%** CV= 11,3%
D Planta V TRH= 8h	**51%** CV=4,8%	**92%** CV=3,2%	**85%** CV=7,4%	**80%** CV=1,9%	**35%** CV=13,6%
E Planta V Carga 0,25	**60%** CV= 7,7%	**90%** CV=3,9%	**86%** CV=2,9%	**78%** CV=3,1%	**40%** CV=10,5%
F Planta M Carga 0,25	**67%** CV= 7,9%	**84%** CV=5,8%	**83%** CV= 3,2%	**82%** CV= 3,8%	**46%** CV=11,8%
G Planta V Carga 0,025	**80%** CV= 13,2%	**90%** CV=0,9%	**98%** CV= 3,3%	**89%** CV= 3,9%	**39%** CV=12,4%
H Planta M Carga 0,025	**92%** CV= 9,5%	**92%** CV=2,2%	**91%** CV= 7,1%	**85%** CV=5,2%	**46%** CV=9,9%

Porcentajes promedio de eliminación de los antibióticos, exceptuando los dos primeros días de aplicación (resultados medios de 28 días).

La eliminación de compuestos mediante adsorción en sólidos suspendidos es un mecanismo importante para compuestos hidrofóbicos y compuestos con grupos funcionales con carga positiva.

La degradación de los compuestos farmacéuticos puede ser descrita por una ecuación de pseudo primer orden:

$$\frac{dC_i}{dt} = k_{biol} \cdot SS \cdot C_i \qquad \text{(Ec. 5-3)}$$ Donde:

Ci: concentración del compuesto i en el reactor (µg/L)

K_{biol}: Constante cinética de degradación de pseudo primer orden (L/g SS ·d)

SS: concentración de sólidos suspendidos (g SS /L)

Los contaminantes pueden dividirse en varias clases según su persistencia en los sistemas de tratamiento (Joss et al, 2006):

-No eliminados (k_{biol} < 0,1 kg/SS·d)

- Parcialmente eliminados 0,1< k_{biol}<10)

- Transformados en más del 90% (k_{biol}>10)

En la tabla 63 se resumen los porcentajes de eliminación promedios en función de los factores estudiados: tiempo de retención hidráulico y carga másica (resultados globales según el parámetro obtenidos de los experimentos individuales).

Tabla 63: Porcentajes medios de eliminación de los antibióticos obtenidos en las plantas piloto a escala de laboratorio en los estudios con diferente TRH y carga másica (resultados globales a partir de los resultados obtenidos en los experimentos individuales)

Parámetro	Eliminación (%) OXT	Eliminación (%) CLT	Eliminación (%) DXC	Eliminación (%) AMX	Eliminación (%) TIL
TRH= 24 h	91% CV= 2,3%	97% CV= 2,2%	100% CV=0,7%	81% CV=3,5%	57% CV=4,9%
TRH= 8 h	53% CV=5,3	90% CV=4,0%	89% CV=5,6%	89% CV= 1,8%	38% CV=9,4%
Carga másica 0,25 kgDBO/kg SSV·d	64% CV= 7,8%	87% CV=4,9%	85% CV=2,5%	80% CV=3,5%	43% CV=9,8%
Carga másica 0,025 kgDBO/kg SSV·d	86% CV= 10,0%	91% CV=1,6%	95% CV= 5,2%	87% CV=3,3%	43% CV=11,6%

Como puede observarse en la tabla anterior, la doxiciclina y clortetraciclina eran los antibióticos que sufrían una mayor eliminación en los sistemas piloto de tratamiento, seguidos por la amoxicilina, oxitetraciclina y por último la tilosina.

La eliminación de oxitetraciclina se veía significativamente influenciada por el tiempo de retención hidráulico y la carga másica, la eliminación era mayor con mayores tiempos de residencia en el reactor y una carga másica menor. En el resto de antibióticos esta influencia era menor.

En líneas generales parecía que el factor que más influye en la eliminación de estos antibióticos es el tiempo de retención hidráulico. Tiempos mayores de residencia en el reactor favorecen la eliminación de estos compuestos.

5.3.5. Evolución de la microfauna asociada al proceso

Como ya se indicó en capítulos anteriores (2 y 3) de este trabajo, el sistema de depuración mediante lodos activos es un ecosistema artificial donde los organismos vivos (biocenosis) forman comunidades complejas interrelacionadas entre sí y con el medio físico que les rodea. En el conjunto de la microfauna presente en estos sistemas se encuentran:

- ✓ Los protozoos que son los microorganismos más abundantes, están constituidos por los grupos: flagelados, ciliados y amebas.
- ✓ Los metazoos les siguen en abundancia y están formados por los grupos: nematodos y rotíferos.

En el control de las plantas piloto un aspecto importante fue el seguimiento de las comunidades de microfauna asociada en cada uno de los ensayos, viendo las poblaciones dominantes en cada caso y determinando la posible influencia del tiempo de retención hidráulico, la carga másica y la presencia de antibióticos sobre las poblaciones dominantes. Además estos organismos resultan ser excelentes indicadores del funcionamiento de los sistemas, por ejemplo son indicadores de la edad del lodo, valor de la BBO, etc.

Para el seguimiento de estas comunidades se utilizó un microscopio óptico (técnica descrita en el capítulo 3). En la figura 50 se recoge un ejemplo de fotografías obtenidas en el microscopio óptico de varios microorganismos encontrados en los lodos activados de las plantas piloto.

i) Efecto del TRH en la microfauna

En los experimentos realizados en los sistemas con menor tiempo de retención hidráulico, los rotíferos se vieron favorecidos frente a los protozoos. Esto es debidoa a que estos organismos presentan mayor capacidad de depredación y mejor movilidad, lo que favorece su supervivencia en un ambiente donde hay una gran cantidad de bacterias que son “lavadas” del sistema (Fernández, 2010).

ii) Efecto de la carga másica en la microfauna

Se observó que cuando se tenían cargas másicas muy bajas (0,025 kgDBO / Kg SSV ·d) se producía un descenso significativo de la riqueza y la abundancia de metazoos rotíferos y protozoos ciliados.

iii) Efecto de los antibióticos en la microfauna

Aunque en el trabajo tenía más relevancia el efecto de estos compuestos en las poblaciones bacterianas que en las comunidades de microfauna, se realizó también un seguimiento de estos organismos ya existe un escaso número de estudios sobre el efecto de este tipo de compuestos en la microfauna asociada a sistemas de lodos activados.

El efecto sobre estos organismos puede ser directo debido a toxicidad o inhibición, o indirecto mediante la modificación de la diversidad bacteriana que es la base de su desarrollo.

Se observó experimentalmente que estos contaminantes no afectaban por igual a todas las especies, por ejemplo *Zoothamnium* sp. *(*protozoo ciliado, suctor, subclase *Peritricha)* aparecía como especie dominante en presencia de los antibióticos.

Al final de todos los estudios realizados se veía como la microfauna prácticamente había desaparecido de los reactores. Una posible explicación de estos resultados era la aparición de procesos de adsorción de estos tóxicos sobre los flóculos de fangos activados y su acumulación en el sistema debido al elevado tiempo de retención celular, lo cual provocaría un descenso tanto de la riqueza como abundancia de esta microfauna. Las únicas especies observadas al final del ensayo fueron *Lecane sp*. (rotífero), *Litonotus* sp. y *Leptopharynx* sp. (protozoos ciliados), (Fernández, 2010).

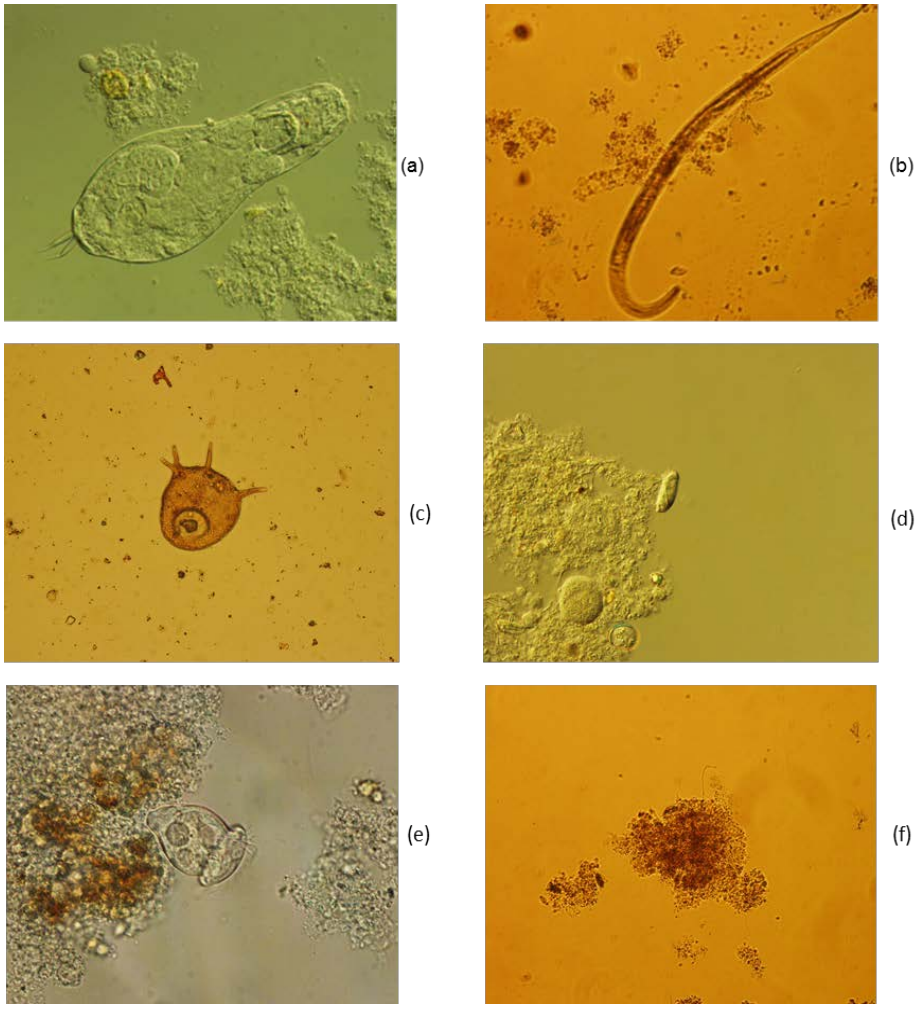


Figura 50: *Fotografías obtenidas en el microscopio óptico de muestras de lodos activados de las plantas piloto en los distintos estudios realizados: rotífero (a), nematodo (b), ameba (c), género Aspidisca (protozoo ciliado) sobre el flóculo (d), protozoo ciliado – suctor (e) y flóculo (f).*

5.3.6. Resistencia bacteriana

Como se indicó en el capítulo 3, se realizaron cultivos en placa a partir de muestras procedentes de los efluentes de los sistemas de depuración a escala de laboratorio para determinar si aparecían cepas bacterianas resistentes a los antibióticos estudiados. Los cultivos realizados pretendían conseguir el crecimiento de microorganismos heterótrofos totales y se llevaron a cabo siguiendo el método descrito en el citado capítulo.

Para este estudio se utilizaron los efluentes de las plantas piloto correspondientes al experimento C, es decir, la plantas V con TRH 8 h, edad celular de 15 días y carga másica de unos 0,25 kg DBO/ Kg SSV ·d. Se realizaron cultivos en placa a partir de inóculos de efluentes y a partir de efluentes dopados con 5 y 50 mg/L de cada uno de los antibióticos.

Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 64. Como puede observarse en dichos resultados, en presencia de amoxicilina y tilosina se producía una mayor

proliferación bacteriana que en el caso de las tetraciclinas. Este hecho puede asociarse a una posible mayor resistencia bacteriana a estos dos antibióticos.

Tabla 64: Resultados obtenidos en el contaje de bacterias heterótrofas totales (expresado como unidades formadoras de colonias y utilizando una dilución 3) en los cultivos en placa a partir de inóculos de efluentes tratados procedentes de las plantas piloto utilizadas en el experimento C

	Réplica 1 (UFC)	Réplica 2 (UFC)	Réplica 3 (UFC)	Media (UFC)	σ
Blanco Sin antibiótico	213	257	229	233	22,3
OXT (5mg/L)	28	31	25	28	3,0
OXT (50mg/L)	0	0	0	0	0,0
CLT (5mg/L)	23	23	39	28	9,2
CLT (50 mg/L)	0	0	0	0	0,0
DXC (5mg/L)	7	1	0	3	3,8
DXC (50 mg/L)	0	0	0	0	0,0
AMX (5mg/L)	153	166	176	165	11,5
AMX (50 mg/L)	48	57	44	50	6,7
TIL (5mg/L)	75	194	136	135	59,5
TIL (50 mg/L)	94	73	52	73	21,0

En la figura 51 se recoge una imagen de algunas de las placas de cultivo obtenidas.

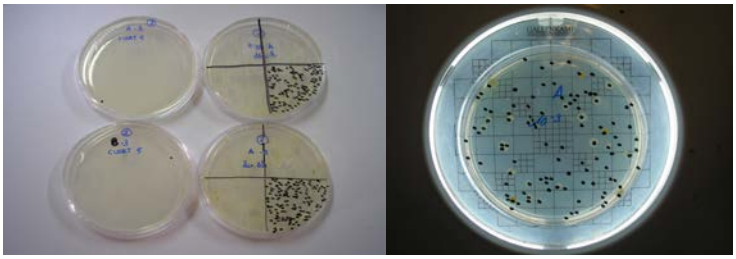


Figura 51: *Cultivos en placa a partir de inóculos del agua tratada (efluente) de las plantas piloto a escala de laboratorio utilizadas en el experimento C*

5.4. Iones metálicos

Inicialmente se planteó en este trabajo un estudio sobre la eliminación de ciertos contaminantes orgánicos e iones metálicos en la EDAR de León y su alfoz. En el estudio de la eliminación de los antibióticos fueron surgiendo nuevas líneas que y ensayos experimentales que fueron restando entidad en el trabajo al seguimiento de los iones metálicos.

El seguimiento de los iones metálicos en la línea de tratamiento de la EDAR de León se realizó durante el año 2007 con tres muestreos en distintos puntos de la misma:

- ✓ Afluente (agua residual de entrada a la EDAR)
- ✓ Fangos primarios (lodos procedentes del decantador primario antes del tratamiento biológico del agua residual)
- ✓ Reactor biológico (reactor de lodos activados)
- ✓ Homogeneizador de fangos
- ✓ Digestor anaerobio de fangos
- ✓ Efluente (agua tratada que es vertida al cauce receptor)

El análisis se realizó mediante un equipo ICP-AES según el método recogido en el capítulo 3. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 65.

Tabla 65: *Resultados de concentraciones (promedios) de los distintos iones metálicos identificados en las muestras obtenidas en diferentes procesos unitarios de la EDAR de León y su alfoz*

Muestras (EDAR)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Cr (mg/L)	Ni (mg/L)	Cd (mg/L)	Hg (mg/L)	*Pb* (mg/L)	B (mg/L)	Co (mg/L)	As (mg/L)
Afluente EDAR general	3,41	0,14	<0,13	0,33	<0,1	<0,63	<0,04	<0,63	<0,25	<0,20	<0,13	<0,38
Efluente EDAR general	0,14	0,05	<0,13	<0,06	<0,1	<0,63	<0,04	<0,63	<0,25	<0,20	<0,13	<0,38
Reactor biológico B	30,9	0,37	<1,00	2,11	<1,00	<5,00	<0,30	<5,00	<2,00	<1,50	<1,00	<3,00
Fangos primarios	605	4,46	9,84	37,9	3,82	<5,00	<0,30	<5,00	6,20	<1,50	<1,00	<3,00
Lodos tras homogeneizador	210	1,87	3,43	12,6	1,11	<5,00	<0,30	<5,00	<2,00	<1,50	<1,00	<3,00
Lodos tras digestión anaerobia	222	2,02	3,55	13,3	5,76	<5,00	<0,30	<5,00	2,03	<1,50	<1,00	<3,00

Como puede observarse en la tabla anterior, el efluente de agua tratada presentaba niveles muy bajos de estos elementos, por lo tanto el tratamiento mediante lodos activados resultó muy eficaz en la eliminación de metales pesados en las aguas residuales, especialmente en la eliminación de Fe, con tasas de eliminación del 96%. Pero, a la vista de los resultados los metales pesados tendían a acumularse en los lodos, fundamentalmente en los procedentes del decantador primario antes del tratamiento biológico. Estos metales no parecían eliminarse eficazmente en la digestión de los fangos.

Los metales más abundantes encontrados en los lodos de este estudio fueron el Fe, Zn, Cu, Mn, Cr y en menor medida Ni. Según una publicación (Tytla et al, 2015), los más abundantes son el Zn y Cu. Por lo tanto, a excepción del Fe los resultados encontrados coinciden con los descritos por estos autores.

Los metales pesados pueden encontrarse en distintos estados físicos y químicos, en ellos presentan distinta solubilidad que depende de parámetros como el pH, potencial redox, presencia de donadores o aceptores de electrones, presencia de agentes complejantes orgánicos o inorgánicos (Final report Heavy metals in waste, European Comission, 2002). Según un estudio realizado, las formas oxidables son las dominantes para los metales pesados, aunque la especiación de los metales es diferente según el origen de los lodos debido probablemente a la distinta composición de las aguas residuales (Tytla et al, 2015).

Las alternativas para la gestión de lodos procedentes del tratamiento de aguas residuales urbanas son:

- ✓ Eliminación: por ejemplo mediante incineración
- ✓ Vertido: Almacenamiento en vertederos de residuos urbanos
- ✓ Recuperación: utilización para la producción de energía o la aplicación a los suelos como abonos

Por lo tanto una de las alternativas que a priori parece más adecuada es su aplicación como abonos. Pero existen una serie de potenciales impactos negativos en este caso:

- ✓ Contaminación con patógenos
- ✓ Contaminación por metales pesados
- ✓ Emisión de olores

Numerosos estudios han abordado este tema, resaltando el potencial carácter tóxico de los lodos para los seres vivos (Chen et al, 2011; Ran et al, 2013; Huang et al, 2014; Nikovskaya et al, 2014; Tytla et al, 2015).

5.5. Discusión

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados no se diseñan con el propósito de eliminar antibióticos. Hasta la fecha existe un conocimiento limitado sobre los microoganismos capaces de degradar los antibióticos en sistemas convencionales de lodos activados y sus características en presencia de otros compuestos farmacéuticos (Lin et al, 2015).

Según una publicación sobre un estudio realizado en Alemania en varias EDARs municipales sobre 14 antibióticos y un metabolito cubriendo las siguientes clases: cefalosporinas, diaminopirimidinas, fluoroquinolonas, lincosamida, macrólidos, tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas, la correlación entre el tiempo de retención hidráulico, edad celular del lodo y eliminación de nitrógeno con la eliminación del antibiótico sólo se pudo establecer para la clindamicina y ciprofloxacina. Así mismo el balance de masa estimado demostró que los macrólidos, clindamicina/clindamicina-sulfóxido y trimetroprima eran principalmente liberados en el efluente tratado, mientras que las penicilinas, cefalosporinas así como el sulfametoxalzol eran parcialmente degradados en los sistemas de tratamiento estudiados. Levofloxacino y ciprofloxacino eran los únicos antibióticos estudiados con una concentración significativa presente en los lodos primarios excedentes o en los lodos digeridos. Sin embargo, el estudio concluye que no está claro si las inconsistencias encontradas eran debidas a que el número de muestreos no fue el suficiente, o si es que eran razonables, por ello aconseja continuar con esta línea para determinar la dinámica temporal de los antibióticos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Marx et al, 2015).

Según los resultados obtenidos en el estudio realizado en este trabajo, los antibióticos que se eliminan en mayor medida en los sistemas de lodos activados son las tetraciclinas (especialmente la clortetraciclina) y la amoxicilina (penicilina), siendo eliminado en un nivel significativamente menor la tilosina (macrólido). Este resultado está en la línea de lo expuesto en el trabajo de Marx (Marx et al, 2015).

La baja eliminación de la tilosina en estos sistemas contrasta con la encontrada en una publicación sobre la biodegradación de este macrólido en los residuos sólidos mediante la bacteria *Citrobacter amalonaticus. E*n condiciones controladas de temperatura y pH (30°C / pH 6.0) se alcanzaba una degradación del 100% de tilosina. Se determinó que se seguía una cinética degradación de primer orden. Esta bacteria se proponía como un potencial "biorremediador" de los ambientes contaminados con tilosina (Ma et al, 2015).

Tras los ensayos experimentales realizados, se ha demostrado, que el factor que presenta una mayor influencia en la eliminación de los antibióticos es el tiempo de retención hidráulico. Este parámetro tiene impacto en la eficacia de la biodegradación principalmente debido a su influencia en la diversidad de las poblaciones microbianas y en la multitud de vías de degradación. Según las conclusiones del Proyecto Poseidón, (2005), se recomienda un tiempo de retención del lodo mayor o igual a 10 días para la eliminación de ciertos contaminantes.

También se ha puesto de manifiesto en este trabajo que la carga másica que tenga un reactor biológico puede impactar en las tasas de eliminación de los antibióticos, en general parece que la eliminación es mayor cuando se tienen cargas másicas menores, aunque se requerían más estudios adicionales para poder afirmarlo con certeza.

El nivel de eliminación se determinó en base a las concentraciones de cada antibiótico encontradas en el afluente y en el efluente, pero habría que tener en cuenta también las potenciales transformaciones en otros compuestos que pueden darse. Estas transformaciones pueden ser indicativas de un tratamiento de eliminación inefectivo (Haddad et al, 2015).

En el caso de la amoxicilina, se producía una disminución en su concentración antes de entrar en el sistema de tratamiento. Se evaluaron varias hipótesis como la presencia de fosfato, amonio, el pH de agua residual y ninguna pareció ser concluyente. La hipótesis más probable fue una degradación catalizada por ciertos microelementos presentes en el agua residual como el Zn (II).

La resistencia que puede generarse a ciertos antibióticos se está convirtiendo en un problema a nivel mundial. La liberación de bacterias y genes resistentes a antibióticos en el medio ambiente es un problema de salud pública. Según estudios realizados se ha detectado la presencia de distintas bacterias resistentes incluyendo *Enterobacter cloacae, Klebsiella peneumoniae, Escherichia coli, Pseudomonas, Enterococcus, Staphylococcus y Bacilus* sp en fuentes de suministro de agua a estaciones potabilizadoras. Sin embargo el tratamiento del agua para consumo elimina esas bacterias. Genes resistentes a las sulfonamidas y las tetraciclinas se han detectado en el agua de entrada a una planta y también en el agua tratada, lo que indica que los filtros no son eficaces para en la eliminación de estos genes (Bergeron, et al, 2015).

En este estudio no se ha realizado una identificación bacteriana, ni tampoco una búsqueda de genes resistentes. Se realizó una aproximación para conocer el grado de resistencia que podían tener ciertas bacterias aerobias a los antibióticos objeto de estudio. Así la tilosina y amoxicilina eran los antibióticos, de los cinco estudiados, que inhibían en menor medida el crecimiento bacteriano en placa, lo que hacía sospechar que

podrían existir cepas bacterianas resistentes a los mismos. Pero esta hipótesis debería ser confirmada con estudios microbiológicos más específicos.

Así mismo, en este trabajo se observó una disminución de la diversidad de los microorganismos y microfauna en los reactores biológicos cuando se les adicionaban los antibióticos lo que coincide con los resultados publicados de diversas investigaciones previas (Moro et al. 1986; Kraigher et al. 2008)

Si bien no son muchos los estudios sobre la influencia de antibióticos en la evolución de la microfauna en sistemas de lodos activados, algunos autores como Aesch y Foissner (1992) o Bécares (1994), observaron como distintas concentraciones de antibióticos afectaban a la microfauna. Otros autores encontraron la relación entre la presencia de sustancias tóxicas en las aguas residuales y la evolución de alguna de estas especies. Moro et al. (1986) observó que individuos del género *Epistylis* podría ser utilizados como indicadores de tóxicos presentes en el agua. Madoni (1991) encontró que se podía observar un número significativamente alto de *Opercularia* sp. en el fango cuando era alimentado con agua residual que contenía sustancias tóxicas. A diferencia de estos autores, en este trabajo se encontró que en presencia de los antibióticos (AMX, TIL; CLT; DXC y CTC) *Zoothamnium* sp era la especie dominante.

Los sistemas piloto de tratamiento de aguas residuales mediante la tecnología de los lodos o fangos activados, presentaron una alta eficacia en la eliminación de materia orgánica, sólidos en suspensión y nitrógeno. Estos rendimientos de eliminación (parámetros legislados) fueron en todos los casos superiores a los exigidos en la legislación. Estas tasas de eliminación no se vieron afectadas por cambios en los parámetros de control (tiempo de retención hidráulico y carga másica). No se observó ninguna disminución del rendimiento depurador cuando se incorporaron los antibióticos a los mismos. Por lo tanto, el sistema de tratamiento de la EDAR de León y su alfoz mediante fangos activados era robusto, estable y con unos niveles de depuración muy elevados.

En cuanto a los iones metálicos, a la vista de los resultados obtenidos, el sistema de lodos activados de la EDAR de León era muy eficaz en la eliminación de metales pesados del agua residual, pero se observó una tendencia a la acumulación de los mismos (especialmente Hierro, Zinc, Cobre y Plomo) en los lodos. Según la bibliografía consultada, en la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios sobre el tratamiento de estos lodos para la reducción de los metales, algunas de las líneas que se están investigando son:

- Utilización de microorganismos como por ejemplo Thiobacillus con hongos acidófilos (Wang, 2010).

- Sistema de digestión mediante microondas que permite la disolución de los metales pesados en el lodo, con tasas de recuperación de Cu, Pb, Cr y Ni en las muestras de 96-104% (Su et al, 2014).
- Sistemas que utilizan vegetales (fitorremediación) como *Geranium sp* que absorben los metales pesados. (Ran, 2013).
- Inmovilización mediante pirolisis (Yang et al, 2014).
- Aplicación de bio-surfactantes que pueden ser reutilizados y suponen un tratamiento de bajo coste (Gao et al, 2013).
- Tratamiento con carbono activado, en una publiación se observó experimentalmente que la adsorción del Cu (II) y Pb(II) en el carbono activado se ajustaba a los modelos de Freundlich y Langmuir, en el caso del Cr (VI) se ajustaba al modelo de Langmuir mientras que el Cd (II) no se ajustaba a ninguno de los modelos (Bao et al, 2013).
- Tratamiento electro-cinético del lodo, obteniéndose unas eliminaciones de 30,3% para Cu, 43,5% para Ni y 33,8% para el Zn, con un gradiente de 5V/ cm. Este tratamiento tiene el inconveniente del tiempo que requiere. (Lei et al, 2012).
- Compostaje que tiene el inconveniente de los altos tiempos de tratamiento (Salmiati et al, 2012).

Estos lodos contienen vitaminas, aminoácidos, materia orgánica y metales pesados (micro y macroelementos) por lo tanto el uso más "racional" sería como fertilizantes pero con una reducción previa del contenido en metales pesados (Nikovskaya et al, 2014). Además pueden utilizarse como "enmiendas" para el suelo. Según una investigación realizada, con mezclas de los lodos con cal (lodos secos) se produce una reducción en las concentraciones de metales pesados. La proporción que mejor resultado generó fue 1 parte de lodo por cada 4 partes de lodo seco con cal, (Salmiati et al, 2012).

5.6. Publicaciones

Hasta la fecha el trabajo realizado en este capítulo se ha incluido en una publicación:

- ✓ Póster: "*The effect of antibiotics, organic loading and retention times on microfauna in activated sludge*" (2009). Fernández-Miranda, N., Montes, N., Hijosa, M., Martín-Villacorta, J., Bécares. E. Congreso ASPD 5, "Microbial population dynamics in biological wastewater treatment". Dinamarca.

Capítulo 6

Influencia de las comunidades bacterianas dominantes en la eliminación de antibióticos

6.1. Introducción

El carbono orgánico y el nitrógeno son los contaminantes más importantes en las aguas residuales urbanas. La eliminación del carbono se realiza eficientemente mediante procesos aeróbicos y anaeróbicos. Sin embargo la eliminación de nitrógeno es un proceso lento con una baja eficiencia. La eliminación biológica de nitrógeno es una reacción que se compone de dos pasos: una oxidación biológica aerobia, en la cual el amonio es oxidado a nitrato en el proceso de nitrificación, y una reducción del nitrato a nitrógeno en el proceso de desnitrificación, (Gómez et al, 1996). Las bacterias que producen la nitrificación son autótrofas aerobias, mientras que las responsables de la desnitrificación son autótrofas o heterótrofas, siendo la mayor parte heterótrofas facultativas. En la desnitrificación se produce la oxidación de compuestos orgánicos utilizando como aceptor de electrones el nitrito o nitrato.

En los sistemas de tratamiento mediante lodos activados la eliminación de los compuestos de nitrógeno se realiza mediante sistemas de nitrificación-desnitrificación. En la nitrificación el amonio procedente de la hidrólisis de la materia orgánica es oxidado aeróbicamente y transformado en nitrito y nitrato siendo los responsables de este proceso bacterias autótrofas aerobias. Esos aniones son reducidos en un paso posterior a nitrógeno gas en ausencia de oxígeno por bacterias desnitrificantes heterótrofas, usando la materia orgánica como donador de electrones (Campos et al, 2001).

Como se indicó en el capítulo 1, en este trabajo se pretendía estudiar la eficacia en la eliminación de determinados antibióticos en el sistema de lodos activados de la EDAR de León y su alfoz. En el capítulo anterior se recoge el estudio sobre la influencia que ciertos parámetros (TRH y carga másica) tienen en la eliminación de estos contaminantes emergentes. En este capítulo se presenta un estudio comparativo de la eliminación de estos compuestos según las diferentes comunidades bacterianas dominantes en el sistema: nitrificantes, desnitrificantes y heterótrofas aerobias.

Al igual que en el caso del estudio sobre los parámetros tiempo de retención hidráulico y carga másica, la evaluación de las tasas de eliminación de las distintas comunidades bacterianas no podía hacerse directamente en la EDAR ya que no se podían aislar las citadas poblaciones bacterianas, por lo que también hubo que modelizar sistemas de tratamiento a escala piloto. Para ello se diseñaron tres sistemas piloto, cada uno con unas comunidades bacterianas dominantes: nitrificantes, desnitrificantes y heterótrofas aerobias. La modelización a escala de laboratorio se realizó en las instalaciones del Departamento de Ingeniería Química (Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Las tres plantas piloto se mantuvieron en funcionamiento durante seis meses y cada reactor fue alimentado específicamente para desarrollar un tipo concreto de comunidades bacterianas dominantes:

i) Amonio y una fuente de bicarbonato para los microorganismo aerobios autótrofos (nitrificación)

ii) Nitrato y materia orgánica para las poblaciones anaerobias heterótrofas (desnitrificación)

iii) Amonio y materia orgánica (actividad heterótrofa aerobia).

El primer mes supuso el periodo de aclimatación y estabilización en el que las diferentes comunidades bacterianas fueron generadas a partir del inóculo de lodo activado. En los siguientes cinco meses se aplicaron los antibióticos objeto de estudio.

En este capítulo se recogen los resultados del rendimiento de eliminación de materia orgánica y nitrógeno de las plantas piloto, su eficacia en la eliminación de los antibióticos estudiados, y se discuten los potenciales efectos de estos compuestos en las diferentes poblaciones bacterianas.

6.2. Plantas piloto a escala de laboratorio

Para estudiar la eliminación de los antibióticos en función de las comunidades bacterianas dominantes y el potencial efecto de estos compuestos en los distintos tipos de microorganismo, se pusieron en marcha tres plantas piloto denominadas “N” “D” y “H” (basados en los utilizados por Suárez, 2004). Se trataba de sistemas a escala de laboratorio formados por un reactor biológico agitado continúo con recirculación y purga desde el reactor.

El diseño fue similar al de los sistemas piloto descritos en el capítulo 5, los componentes fueron:

a) Reactor: tanque dotado de una vía de salida para la purga de lodos y comunicado con el decantador. Capacidad de dos litros. En el caso de la planta piloto D, se mantuvo cerrado para evitar la entrada de oxígeno y agitado mediante un sistema mecánico, en vez de llevar aireación como en las otras dos plantas.

b) Decantador: depósito de cuerpo cilíndrico y extremo cónico comunicado con el reactor, de capacidad inferior a la de éste (aprox. 1 litro). Comunicado con el exterior para la salida del efluente depurado.

c) Sistema de recirculación: estructura tubular que permitió conectar el reactor y el decantador. Permitía mantener una recirculación constante de lodo desde el decantador al reactor. En los sistemas aerobios (plantas N y H) el caudal de recirculación se impulsaba mediante un aireador, mientras que en el caso del sistema anaerobio (planta D) la recirculación se realizó mediante una bomba peristáltica.

En los tres sistemas se definió un tiempo de retención hidráulico de 1 día, y se mantuvo estable durante todo el estudio regulando el caudal de entrada.

En la tabla 66 se presenta un resumen del estudio.

Tabla 66: Diseño de los experimentos en las plantas piloto para el estudio de *la influencia de las poblaciones bacterianas dominantes en la eliminación de antibióticos*

Planta piloto N	**Planta piloto D**	**Planta piloto H**
TRH=24 h **Nitrificación (comunidades bacterianas autótrofas aerobias)** Estabilización del sistema 30 días 150 días: Adición de antibióticos al afluente	TRH=24 h **Desnitrificación (bacterias heterótrofas anaerobias)** Estabilización del sistema 30 días 150 días: Adición de antibióticos al afluente	TRH=24 h **Proceso heterótrofo aerobio (bacterias heterótrofas aerobias)** Estabilización del sistema 30 días 150 días: Adición de antibióticos al afluente

Los parámetros de diseño y funcionamiento de cada uno de los sistemas piloto a escala de laboratorio se recogen en la tabla 67.

Tabla 67: *Parámetros de diseño de las plantas piloto utilizadas en este estudio*

Parámetro*	**Planta Piloto N**	**Planta Piloto D**	**Planta Piloto H**
Volumen reactor	2 L	2 L	2 L
Volumen decantador	1 L	1 L	1 L
Caudal de entrada	2 L/d	2 L/d	2 L/d
Edad celular (θx)	10 d	10 d	10 d
TRH	24 h	24 h	24 h
Tasa Recirculación (Qr/Qe)	40	15	40

En la figura 52 se muestra una imagen de los tres sistemas piloto.

(a) (b) (c)

Figura 52: *plantas piloto a escala de laboratorio: a) Planta D (heterótrofa anaerobia) b) Planta N (autótrofa aerobia) c) Planta H (heterótrofa aerobia)*

6.2.1 Reactor planta piloto D

El reactor anaerobio consistió en un tanque estanco para garantizar la ausencia de oxígeno, de 2 litros de capacidad. El lodo activado en su interior era agitado mediante un agitador de varilla (Heidolph®). La recirculación entre el sedimentador y el reactor se mantenía mediante una bomba peristáltica para evitar la entrada de aire al reactor. La purga de lodos para mantener la edad celular del lodo se realizaba desde el decantador cada dos días.

Para conseguir unas poblaciones dominantes de bacterias heterótrofas anaerobias y que tuviese lugar la reacción de desnitrificación, esta planta fue alimentada con un agua residual que contenía una fuente de carbono y de nitrato.

En presencia de nitrato la reacción de desnitrificación puede ser producida por bacterias heterótrofas como *Pseudomonas stutzeri* (oxidación de materia orgánica) o por bacterias autótrofas desnitrificantes como *Paracoccus denitrificans* (oxidación de H_2). Cabe señalar que regulando la composición del agua residual de entrada no se conseguía que todas las bacterias fueran heterótrofas anaerobias, pero sí que fueran las dominantes en el sistema. La reacción de desnitrificación producida por las bacterias heterótrofas nitrificantes es la siguiente (adaptado de Suárez, 2004):

$$8NO_3^- + 5CH_3COONa \rightarrow 10CO_2 + 4\ N_2\uparrow + H_2O + 5NaOH + 8OH^-$$

6.2.2 Reactor planta piloto N

Se trataba de un tanque abierto, la agitación y aireación se conseguían mediante un difusor de aire. En este caso la recirculación no se realizaba con bomba peristáltica sino que se utilizó el mismo mecanismo que en los sistemas piloto descritos en el capítulo 5, aplicando aire mediante una bomba.

Ajustando la composición del agua residual de entrada se favoreció el crecimiento de bacterias autótrofas aerobias, para ello el agua residual sintética contenía una fuente de amonio y de bicarbonato sódico, sin añadir ninguna fuente de materia orgánica. El proceso de nitrificación consta de dos reacciones:

$$2\ NH_4^+ + 3O_2 \rightarrow 2NO_2^- + 4H^+ + 2H_2O \quad \text{(bacterias } \textit{Nitrosomonas}\text{)}$$

$$2\ NO_2^- + 2\ O_2 \rightarrow 2NO_3^- \quad \text{(bacterias } \textit{Nitrobacter}\text{)}$$

Siendo la reacción global:

$$NH_4^+ + 2O_2 \rightarrow 2NO_3^- + 2H^+ + H_2O$$

6.2.3 Reactor planta piloto H

Para comparar las tasas de eliminación de antibióticos con las que podían ser alcanzadas en los reactores con poblaciones bacterianas desnitrificantes y nitrificantes, se puso en marcha otra planta piloto similar a las utilizadas en el capítulo 5, en la que las poblaciones bacterianas dominantes eran heterótrofas aerobias.

Como ya se indicó, esta planta se diseñó de manera análoga a la planta N pero se alimentó con una fuente de materia orgánica y amonio.

6.2.4. Agua residual sintética

En el capítulo 3 se citan de manera general los componentes del agua residual sintética. En las tablas 68 y 69 se recoge la composición ajustada que se utilizó en cada uno de los sistemas piloto.

Tabla 68: *Composición del agua residual sintética utilizada en la alimentación de las tres plantas piloto a escala de laboratorio para favorecer el crecimiento de cierto tipo de bacterias para los estudios*

Componente (mg/L) añadido al agua	**Planta D**	**Planta N**	**Planta H**
Extracto de carne	150	-	150
Etanol	0,15	-	0,15
Triptona	20	-	20
Acetato sódico	20	-	20
Propionato sódico	10	-	10
Almidón	10	-	10
NH_4Cl	-	115	115
$NaNO_3$	183	-	-
$NaHCO_3$	170	500	500
Dis. Microelementos (mL)	2	2	2
Na_2HPO_4	-	25	25
KH_2PO_4	35	12	12

Tabla 69: *Composición de la disolución de microelementos utilizada en la preparación de las distintas aguas residuales*

Disolución de microelementos (en agua)	**Concentración**
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	132 mg/L
$ZnCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mg/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	16 mg/L
$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	3900 mg/L
$FeCl_2 \cdot 2H_2O$	800 mg/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	940 mg/L

6.2.5. Aplicación de los antibióticos a las plantas piloto

Al igual que en los experimentos realizados en el capítulo 5, antes de la aplicación de los antibióticos a las plantas piloto, se estudió la posible inhibición de la actividad bacteriana debido a la presencia de los antibióticos. Para ello, se siguió el procedimiento descrito en el capítulo 3. La tabla 70 recoge información sobre la metodología aplicada en la determinación de la actividad bacteriana según el tipo de comunidad bacteriana.

Tabla 70: *Ensayos de medida de la actividad bacteriana, procedimientos según el tipo de poblaciones bacterianas*

Actividad	**Equipo**	**Determinación de actividad**	**Substrato utilizado**
Heterótrofa aerobia	Respirómetro	Consumo O_2	CH_3COONa (300 mg DQO/L)
Nitrificante	Erlenmeyer 100 ml	Consumo de NH4 Producción NO_2 y NO_3,	$NH_4Cl + NaHCO_3$ (30 mg N/L + 500 mg/L)
Desnitrificante	Botellas cerradas de 100 ml	Producción de N_2	$NaNO_3 + CH_3COONa$ (30 mg N/L; C/N:4,5)

El ratio de inhibición de la actividad se determinó según la ecuación (Ec. 6-1):

$$I(\%) = \frac{A_B - A_M}{A_B} \cdot 100$$

A_B: Actividad Blanco (kg S/kg SSV.d)

A_M: Actividad en presencia de los Antibióticos (kg S/kg SSV.d)

Por lo tanto, se evaluó en función de cada sistema de tratamiento piloto:

- Lodo procedente de la planta H: Disminución en los ratios de respiración (consumo de O_2)
- Lodo procedente de la planta N: Consumo de NH_4^+
- Lodo procedente de la planta D: Producción de N_2

Los resultados obtenidos pueden verse en el apartado de resultados, en el punto 6.3.1.

Tras el estudio sobre el efecto de los antibióticos en la actividad bacteriana de los lodos activos, se procedió a la aplicación de los antibióticos en las plantas piloto adicionándolos al agua residual sintética (tras el periodo de estabilización de los sistemas). La aplicación de los cinco antibióticos se realizó de manera simultánea.

Como se indicó en el capítulo 5, se determinaron tasas de eliminación globales sin especificar la contribución individual de los distintos mecanismos de eliminación que podían tener lugar en esos sistemas.

6.3. Resultados

6.3.1. Inhibición de la actividad bacteriana

En la tabla 71 se resumen los porcentajes de inhibición obtenidos debido a presencia simultánea de los cinco antibióticos (OXT, CLT, DXC, AMX y TIL) en una concentración de 5 mg/L.

Tabla 71: Porcentajes de inhibición de la actividad bacteriana (%) obtenidos en lodos activados procedentes de las tres plantas piloto con diferentes comunidades bacterianas dominantes debidos a la presencia de los cinco antibióticos

	Actividad Nitrificante	**Actividad Desnitrificante**	**Actividad heterótrofa aerobia**
Sin antibióticos	0,02 kg N-$NH4^+$/kg SSV d	0,24 kg N/kg SSV d	0,53 kg DQO/kg SSV d
5 mg/L de cada antibiótico	0,02 kg N-$NH4^+$/kg SSV d	0,13 kg N/kg SSV d	0,52 kg DQO/kg SSV d
% Inhibición	<2%	46%	2%

Estos ensayos de inhibición de la actividad bacteriana demostraron que el proceso de desnitrificación era el que se veía más afectado por la presencia de los antibióticos, mientras que los otros parecían verse alterados por estos compuestos.

6.3.2. Parámetros físico-químicos

A continuación se presentan los resultados del seguimiento de los principales parámetros fisicoquímicos durante el funcionamiento de los tres sistemas. Estos parámetros se utilizaban como indicadores del correcto funcionamiento. En este caso en función de las comunidades bacterianas dominantes (que condicionaban los procesos mayoritarios) se controlaron distintos parámetros, que se indican a continuación:

- ✓ Planta desnitrificante D: pH, O_2, DQO, SSV, SST y NO_3^-
- ✓ Planta nitrificante N: pH, O_2, NO_3^-, $NH4^+$, SST y SSV
- ✓ Planta heterótrofa aerobia H: pH, O_2, DQO, SSV, SST, $NH4^+$ y NO_3^-

Los métodos utilizados están descritos en el capítulo 3.

i) Planta piloto D

Los valores medios de los parámetros controlados durante los 6 meses de funcionamiento, están recogidos en la tabla 72.

Tabla 72: Valores medios y desviación estándar de los resultados de los parámetros físico-químicos de la planta piloto D durante los 6 meses de funcionamiento

	DQO afluente (mg/L) / σ	DQO efluente (mg/L) / σ	NO_3^- afluente (mg N/L) / σ	NO_3^- efluente (mg N/L) / σ	SSV efluente (mg/L) / σ	SSV reactor mg/L) / σ	pH afluente/ σ	pH efluente/ σ
Planta D	**350,4** 105,08	**53,7** 31,03	**27,4** 9,89	**5,0** 8,38	**39** 29,53	**3111** 1061,22	**5,3** 1,36	**7,4** 0,42

En la figura 53 se presentan los gráficos de evolución de los resultados de las determinaciones de los parámetros controlados a lo largo del tiempo de funcionamiento del sistema.

ii) Planta piloto N

Los valores medios de los resultados de los parámetros controlados durante los 6 meses de funcionamiento, están resumidos en la tabla 73.

Tabla 73: Valores medios y desviación estándar de los resultados de los parámetros físico-químicos en la planta N durante el tiempo de funionamiento

	NH_4^+ afluente (mg N/L) σ	NH_4^+ efluente (mg N/L) σ	NO_3^- afluente (mg N/L) σ	NO_3^- efluente (mg N/L) σ	SSV efluente (mg/L) σ	SSV reactor mg/L) σ	pH afluente σ	pH efluente σ
Planta N	**26,3** 7,35	**1,7** 1,74	**2,6** 4,14	**31,8** 7,34	**30,4** 33,15	**1642** 1083,21	**8,0** 0,20	**7,6** 0,55

En la figura 54 se presentan los gráficos de evolución de los parámetros controlados en esta planta.

iii) Planta piloto H

Los valores medios de los parámetros determinados están recogidos en la tabla 74.

Tabla 74: Valores medios de los parámetros físico-químicos

	DQO afluente (mg/L) σ	DQO efluente (mg/L) σ	NH_4^+ afluente (mg N/L) σ	NH_4^+ efluente (mg N/L) σ	SSV efluente (mg/L) σ	SSV reactor (mg/L) σ	pH afluente σ	pH efluente σ
Planta	**364**	**39,7**	**31,4**	**4,0**	**3179**	**18**	**7,7**	**7,2**
H	76,6	22,2	6,1	4,8	906,5	15,6	0,2	1,1

En las figura 55 se presenta la evolución temporal de esos parámetros.

Como puede observarse en las figuras siguientes (54, 55 y 56) el funcionamiento de los tres sistemas fue estable, sin oscilaciones bruscas en ninguno de los parámetros determinados, ni ninguna alteración en el funcionamiento.

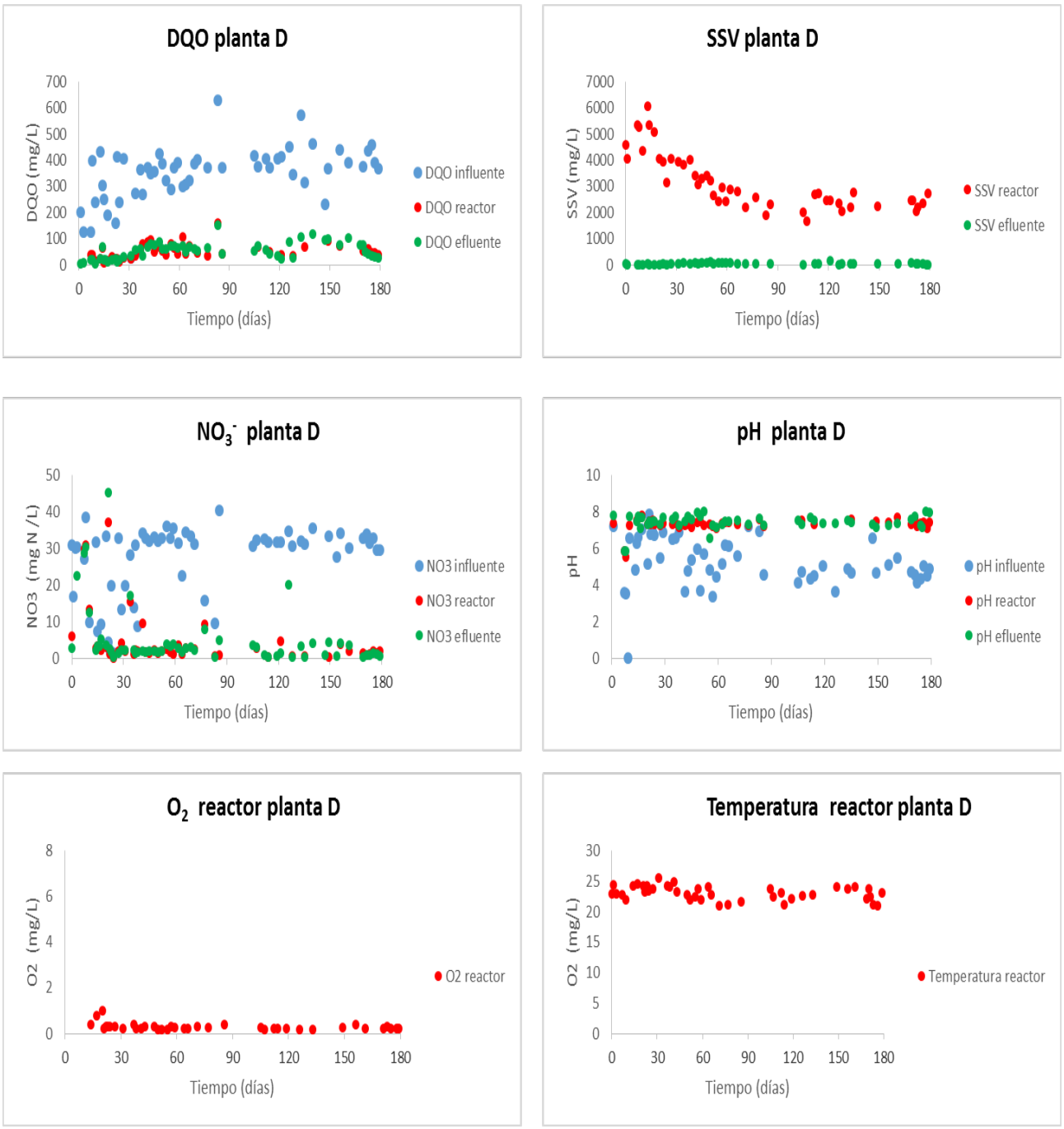


Figura 53: *Evolución de los resultados obtenidos en la monitorización de los principales parámetros físico-químicos en la planta piloto D (anaerobia heterótrofa, proceso de desnitrificación)*

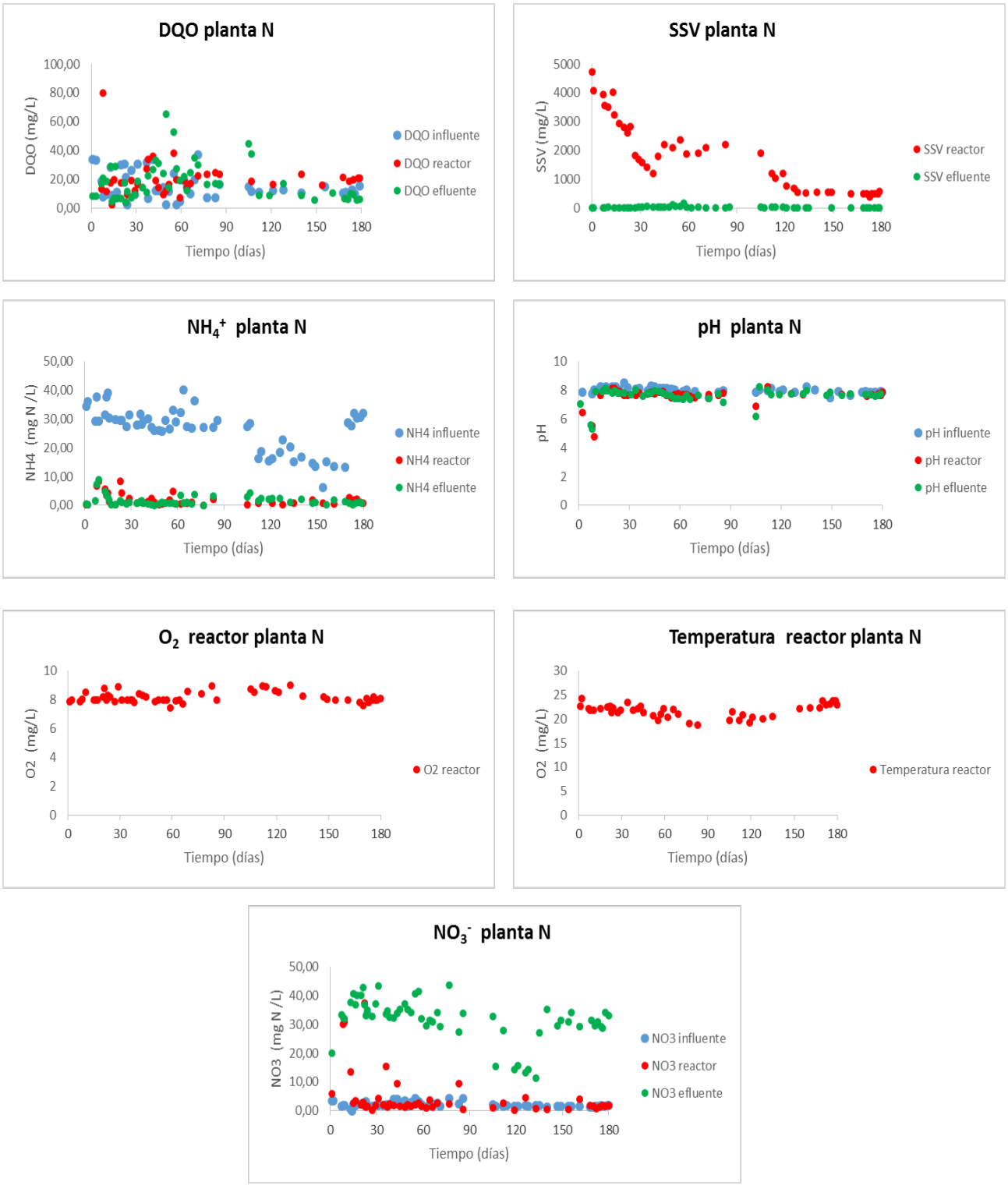


Figura 54: *Evolución de los resultados obtenidos en la monitorización de los principales parámetros físico-químicos en la planta piloto N (aerobia autótrofa, proceso de nitrificación)*

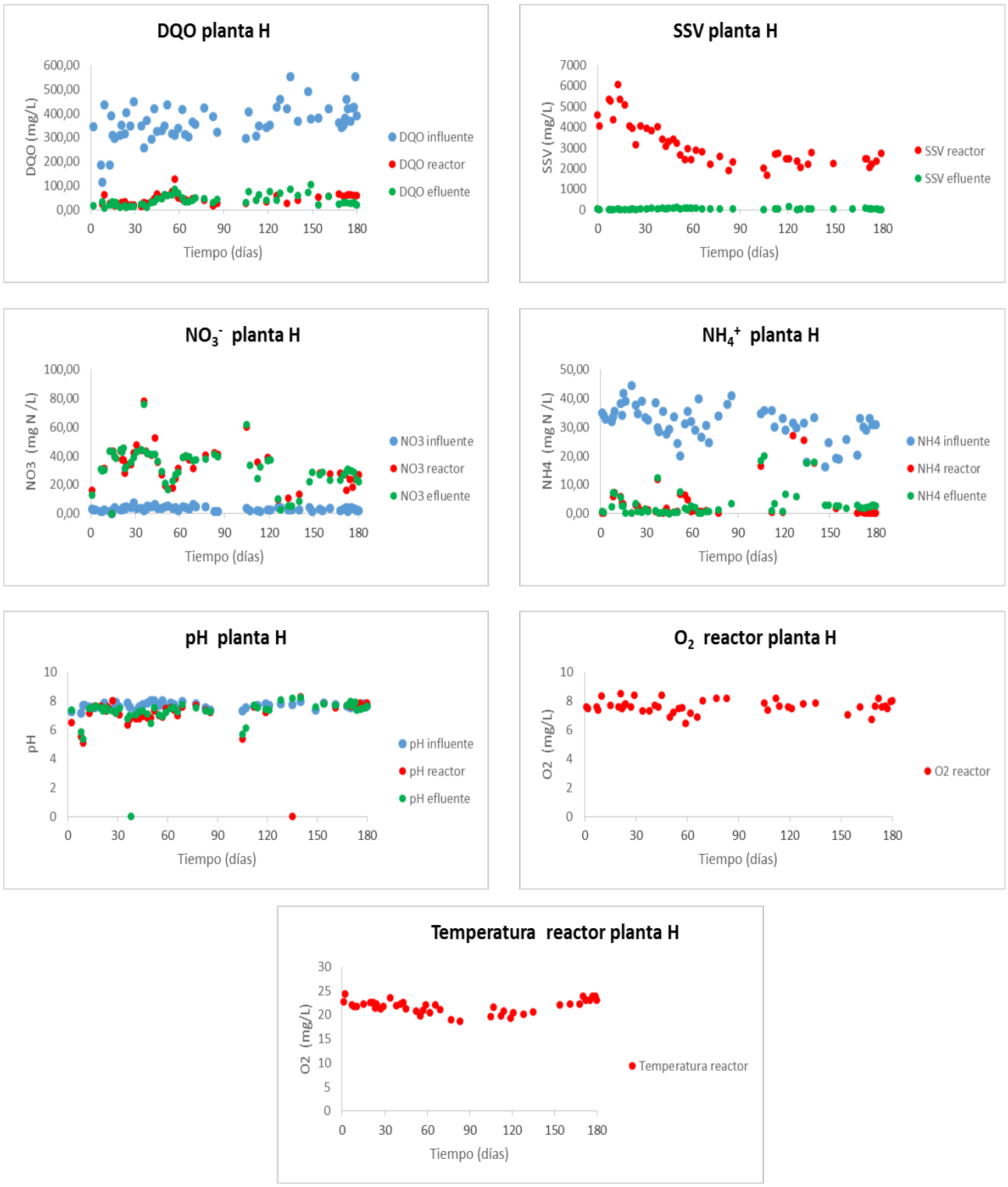


Figura 55: *Evolución de los resultados obtenidos en la monitorización de los principales parámetros físico-químicos en la planta piloto H (aerobia heterótrofa)*

6.3.3. Rendimiento depurador de las plantas piloto

A continuación en las tablas 75 y 76 se presentan los rendimientos medios de depuración en términos de eliminación de materia orgánica y nitrógeno de los tres sistemas de escala laboratorio.

Tabla 75: Porcentajes medios de eliminación de materia orgánica, plantas H y D

Planta	Eliminación (%) DQO
N	N/A
H	**89,1%** CV= 5,3%
D	**84,7%** CV=7,3%

Tabla 76: Porcentajes medios de eliminación de Nitrógeno

Planta	Eliminación (%) NH_4^+	Eliminación (%) NO_3^-
N	**93,5%** CV= 4,8%	N/A
H	**87,3%** CV= 8,2%	N/A
D	N/A	**81,8%** CV= 7,4%

N/A: no aplica debido a la actividad bacteriana dominante

Los rendimientos correspondientes a la eliminación de materia orgánica y nitrógeno en forma de nitrato o de amonio no se vieron afectados por la adición de los antibióticos a los sistemas.

El rendimiento en la depuración fue en todos los casos superior al 80%, lo que indicó un correcto funcionamiento de los sistemas de tratamiento.

6.3.4. Rendimiento en la eliminación de antibióticos

Como se indicó anteriormente, se aplicaron simultáneamente los 5 antibióticos a las tres plantas piloto mediante la incorporación de los mismos en el agua residual sintética. La concentración de cada uno de ellos fue 5 mg/L en todos los casos.

Al igual que se observaba en el estudio realizado en el capítulo 5, la amoxicilina sufrió una reducción en su concentración en el agua residual sintética antes de entrar al reactor biológico. Sin embargo en este caso, esta degradación no ocurría en el caso del agua residual de alimentación de la planta D. Este agua presentaba un pH menor (pH en

torno a 4) que la correspondiente a las plantas N y H (pH aprox. 7) y además no contenía ninguna fuente de amonio. Según estas evidencias, se planteó la posible hipótesis de que a pHs bajos los metales tuvieran un efecto catalizador menor en la degradación de este antibiótico. En el capítulo 5 se vio experimentalmente que el ion amonio no tenía ninguna influencia por sí solo en la degradación de este compuesto.

Los porcentajes medios de eliminación de los antibióticos obtenidos en los tres sistemas se presentan en la tabla 77.

Tabla 77: Porcentajes medios de eliminación de antibióticos en los tres sistemas de tratamiento a escala piloto con distintas comunidades bacterianas dominantes

Planta/Actividad dominante	Eliminación (%) OXT	Eliminación (%) CLT	Eliminación (%) DXC	Eliminación (%) AMX	Eliminación (%) TIL
D Desnitrificación	**60%** CV= 4,8%	**74%** CV=3,8%	**70%** CV=2,5%	**96%** CV= 1,5%	**13%** CV= 12,5%
N Nitrificación	**27%** CV=11,0%	**44%** CV= 9,4%	**32%** CV= 9,8%	**57%** CV= 4,8%	**14%** CV= 13,4%
H Heterótrofa aerobia	**55%** CV= 8,7%	**72%** CV= 8,1%	**65%** CV= 4,3%	**84%** CV= 2,3%	**59%** CV= 8,6%

Porcentajes promedio de eliminación de los antibióticos, exceptuando los dos primeros días de aplicación (considerados de estabilización)

Al igual que en el estudio descrito en el capítulo 5, las tasas de eliminación (porcentajes) se determinaron teniendo en cuenta la aproximación de una cinética de eliminación de primer orden (Ec. 5-2).

A la vista de los resultados presentados en la tabla anterior, el proceso más eficaz en la eliminación de antibióticos fue el proceso heterótrofo anaerobio (desnitrificación) excepto para la tilosina que se eliminaba más eficazmente en el sistema cuyas poblaciones bacterianas dominantes eran heterótrofas aerobias.

6.4. Discusión

Los porcentajes de eliminación obtenidos para los cinco antibióticos en los tres sistemas de tratamiento se encontraron entre el rango un 13% para la tilosina en el sistema heterótrofo anaerobio y un 96% para la amoxicilina el mismo sistema.

A la vista de los resultados experimentales obtenidos, puede decirse que el proceso de nitrificación no era eficaz en la eliminación de antibióticos, sobre todo si se le compara

con los otros dos sistemas estudiados. Sin embargo, las otras dos plantas sí presentaron tasas de eliminación elevadas, excepto en el caso de la tilosina. Según investigaciones encontradas en bibliografía (Dorival-García et al, 2013), el proceso anaerobio no resulta efectivo en la eliminación de 6 quinolonas (antibióticos), con porcentajes de eliminación cercanos a cero, mientras que se alcanzan degradaciones entre 36-60% en los procesos nitrificación y de 17-29% en procesos aerobios heterótrofos. Estos resultados recogidos en la publicación son similares a los obtenidos para el sistema de nitrificación en este trabajo, con tasas de eliminación de los antibióticos de entre 14% y 57%.

En el caso del sistema aerobio heterótrofo, los porcentajes de eliminación para los 5 antibióticos objeto de estudio, son muy superiores a los descritos en la publicación para las quinolonas, obteniéndose tasas de eliminación de entre 59% y 84%.

Los porcentajes de eliminación obtenidos experimentalmente muestran que el reactor anaerobio heterótrofo presenta niveles similares de eliminación de antibióticos (incluso ligeramente superiores) a los obtenidos en el reactor aerobio heterótrofo, excepto para la tilosina. Este antibiótico resultó ser resistente a su eliminación en todos los sistemas, con rendimientos de entre el 13-59%.

En este trabajo se determinó la eliminación total de los antibióticos sin pormenorizar en los mecanismos que tienen lugar. Se han encontrado varios estudios en los que han determinado que la eliminación de antibióticos se debe fundamentalmente a los procesos de adsorción al lodo (Schmidt et al, 2012; Dorival-García et al, 2013). Por lo tanto cabe pensar que en este caso la eliminación también se debe fundamentalmente a la adsorción en los lodos, aunque esta hipótesis debería ser confirmada con más pruebas experimentales.

La eficacia en la eliminación de los antibióticos en el proceso donde las poblaciones mayoritarias fueron heterótrofas aerobias (planta H) fue menor en este estudio para el caso de las tetraciclinas y ligeramente mayor para la amoxicilina y tilosina, que la obtenida en el estudio descrito en el capítulo 5, en el que los sistemas también contaban con poblaciones bacterianas mayoritariamente heterótrofas aerobias.

Los sistemas de tratamiento piloto, fueron muy eficaces en la eliminación de materia orgánica y nitrógeno (según el tipo de planta), con tasas de eliminación en todos los casos superiores al 80% lo que indicó un buen funcionamiento. Estos rendimientos no se vieron afectados por la aplicación de los antibióticos a las plantas piloto, pese a que según los ensayos previos realizados externamente a las plantas, los antibióticos afectaban significativamente a las bacterias heterótrofas anaerobias, disminuyendo su actividad hasta en un 40%. Sin embargo, según una publicación encontrada (Schmidt et al, 2012), los microorganismos nitrificantes son más sensibles a los antibióticos que las

bacterias heterótrofas. Esta afirmación entra en contradicción con lo obtenido en este trabajo, donde se ha visto que los microorganismos más sensibles eran los heterótrofos anaerobios y no los nitrificantes.

En cuanto a la capacidad de depuración de los sistemas piloto, las tasas de eliminación de nitrógeno fueron del mismo orden que las reportadas en diferentes estudios sobre unidades de fangos activados, con procesos de nitrificación-desnitrificación (Schlegel, 2003). Según los datos bibliográficos, los nuevos procesos para la eliminación de nitrógeno que se están diseñando en los últimos años se basan en procesos de oxidación directa de amonio a nitrito sin generar nitrato. Este proceso presenta varias ventajas frente a los tradicionales de nitrificación-desnitrificación (Rodríguez-Sánchez, 2014).

6.5. Publicaciones

Hasta la fecha el trabajo realizado en este capítulo se ha incluido en una publicación:

- ✓ Póster: "*Influence of antibiotics on the biological processes responsible for wastewater treatment*". (2007). Montes, N., Suárez, S., Martín-Villacorta, J., Omil, F. Congreso "Emerging contaminants in wastewaters monitoring tools and treatment technologies". Belgrado, Serbia.

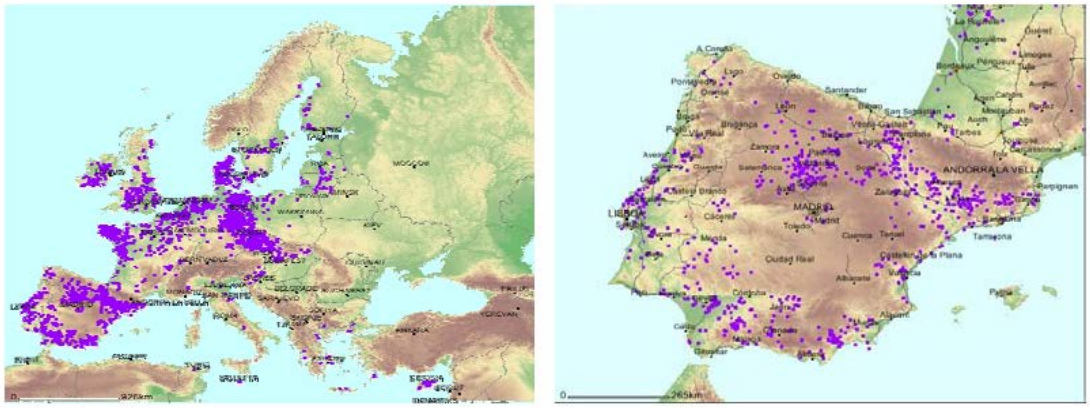
Capítulo 7

Eliminación de antibióticos en sistemas de tratamiento de purines

7.1. Introducción

La producción de ganado porcino contribuye sustancialmente a la economía de numerosos países como puede ser España, sobre todo en cuanto a empleo y a exportación de productos se refiere (Melse et al., 2005). El número de explotaciones intensivas ha crecido considerablemente en los últimos años (Macauley et al., 2006) y con ellas la cantidad de residuos generados en las mismas, lo que conlleva un problema añadido, el tratamiento del purín, un tema complicado en la mayoría de las granjas debido a los costes que genera.

España es el segundo productor de ganado porcino de la Unión europea por detrás de Alemania, con un 16% de la producción total de la UE (Lence, 2005). La distribución de las granjas porcinas en la Unión Europea y en España se recoge en la Figura 56.



a) b)

***Figura 56**: Distribución de las granjas productoras de ganado porcino en: a) UE y b) España. Adaptado de Dosta, 2007*

El uso de antibióticos en ganadería responde a la necesidad de luchar contra una amplia variedad de enfermedades e infecciones. En líneas generales, un uso adecuado de estos tratamientos promueve la salud y el bienestar de los animales y garantiza el suministro de alimentos seguros a los consumidores. Una cantidad significativa de antibióticos se emplea también como suplemento alimenticio para promover el crecimiento de animales domésticos (Halling-Sørensen et al. 1998; Hirsch et al., 1999; Phillips et al., 2004; Kumar et al., 2005).

En las explotaciones intensivas se utilizan altas cantidades de antibióticos. En el año 2003 se emplearon en la Unión Europea entre 8500 y 11200 toneladas de antibióticos veterinarios (Macauley et al, 2006) y según la OMS, España es el tercer país que más antibióticos utiliza en la Unión Europea (World Health Organization, 2002), después del

Reino Unido y Grecia. Los antibióticos veterinarios más recetados en el mundo son las tetraciclinas y las sulfonamidas (Hamscher, 2006).

El grupo de las tetraciclinas ha constituido la clase más importante de antibióticos de uso veterinario (en ganadería) en las últimas cuatro décadas, se trata de los antibióticos más ampliamente utilizados en producción animal (Webb et al., 1975; De Linguoro et al., 2003; Kumar et al., 2004, 2005). Debido a su amplio espectro de actuación, se emplean comúnmente para el tratamiento de infecciones originadas por bacterias gram positivas y gram negativas, micoplasmas y determinados virus (Reemtsma el al., 2006). La clortetraciclina y oxitetraciclina se encuentran en el ranking de los 10 antibióticos empleados como promotores del crecimiento en EEUU (Meyer et al., 2000). El consumo estimado de tetraciclinas en Estados Unidos y Europa es de 5500 toneladas por año (Chopra et al., 2001), (Belkheiri et al., 2011). Las concentraciones terapéuticas de aplicación diaria son de 25 mg/kg para la oxitetraciclina y de 12,5 mg/kg para la doxiciclina.

Cuando a un animal se le suministra un antibiótico, una parte de esta sustancia es excretada en las heces o la orina, bien en la misma forma química en la que entró en el cuerpo o bien como metabolitos procedentes de su degradación (Ingerslev et al., 2001; Loke et al., 2002; Sarmah et al., 2006). La absorción de los antibióticos en los tejidos animales es incompleta y como resultado, cantidades significativas de estos fármacos son excretadas en la orina y en las heces (Bao et al., 2009). Se ha reportado que entre el 70-90% de varios antibióticos pueden ser excretados en la forma original en el estiércol (Phillips et al., 2004; Kumar et al., 2005).

En el caso concreto de las tetraciclinas, son muy poco absorbidas por los tejidos animales y en gran medida son excretadas en una forma inalterada (Chambers, 2001; Chee-Sandford et al., 2001). La clortetraciclina y doxiciclina son excretadas en su forma original en un porcentaje superior al 70%, mientras que la oxitetraciclina en más de un 80% (Hirsch, 1999). Teniendo en cuenta que para el tratamiento de una afección respiratoria un cerdo recibe 50 mg de tetraciclina por kilogramo y día durante una semana de tratamiento, la cantidad de tetraciclina excretada dependerá del número de cabezas de ganado y del peso de éstas (Prado et al., 20009; Belkheiri et al., 2011). En este sentido, para una explotación pequeña de cerdos con 70 animales con un peso medio de cada uno de ellos de 100 Kg, entre 245 y 280 g de tetraciclina por día, podrían ser excretados en la forma original del antibiótico.

Dado el elevado uso de las tetraciclinas en ganadería, el purín o el agua residual procedente de las explotaciones intensivas, (CAFOs “Concentrated animal feeding operations”) estarán cargados de estos antibióticos (Campagnolo et al., 2002; Ben et al.,

2008; Tong et al., 2009; Tyvolá et al., 2010; Pan et al., 2011). Por lo tanto, estas explotaciones constituyen fuentes de tetraciclinas para los ecosistemas, pudiendo generar efectos adversos como la resistencia bacteriana o la disrupción de ciclos clave (Kümmerer, 2004b), afectando al equilibrio del ecosistema (Constanzo et al., 2005).

En el pasado, las explotaciones ganaderas solían ser de menor tamaño y las regulaciones ambientales menos estrictas que las actuales. Por lo tanto, era muy habitual que los residuos generados en estas granjas fueran aplicados a los campos tras un tratamiento de compostaje previo o no. Estos residuos servían de fertilizantes de los campos (Prado et al., 2007). Esta práctica supone una serie de peligros ambientales como la transmisión de los antibióticos contenidos en esos residuos animales, así como la potencial resistencia bacteriana que puede generarse (Tolls, 2001; Sarmah et al., 2006; Hu et al., 2010; Qiao et al., 2012).

Puesto que durante décadas el purín de las granjas se ha aplicado a los campos como abono (Hamscher, 2006), los antibióticos pueden llegar a los suelos (Blackwell et al, 2004), incluso, los antibióticos pueden pasar de los suelos a las aguas superficiales y subterráneas. Este hecho puede ser el desencadenante de una contaminación ambiental cuyo principal riesgo es la generación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos que ponen en peligro la salud humana y animal (Malintan et al., 2006). Aunque muchos de los antibióticos empleados en ganadería no se emplean en humanos, se sospecha que pueden generar resistencia cruzada contra otros antibióticos. Por otra parte, las consecuencias negativas del mal uso de estos fármacos, podrían repercutir en el hombre llegando a provocar reacciones alérgicas y la anteriormente citada aparición de resistencia bacteriana y de resistencia cruzada a otros antibióticos con estructuras y mecanismos de acción similares (Berrada et al., 2007).

En general, un uso apropiado y sostenido de los antibióticos, protege la salud animal y evita la transferencia de bacterias resistentes a los mismos en humanos y animales (Kemper, 2008).

Dependiendo de las regulaciones de cada zona en cuanto a la aplicación de los purines como abono, es frecuente que los purines sean almacenados en tanques (durante 1 a 6 meses) antes de su aplicación. Estos tanques o fosas empleadas para el almacenamiento de purines, se convierten en reservorios de antibióticos y de bacterias resistentes a los mismos. Es necesario un control de estos sistemas para prevenir la difusión de estas bacterias así como de sus genes resistentes en otros ambientes (Macauley et al, 2006).

Debido al mayor conocimiento que se tiene sobre la entrada de fármacos en el medio ambiente a través de los purines, existe una preocupación creciente en relación a

los riesgos potenciales asociados a esta práctica. Por esa razón, se está potenciando el desarrollo de métodos de análisis sensibles que permitan la cuantificación de antibióticos en purines y el seguimiento de la evolución de su concentración a lo largo de las operaciones unitarias de los sistemas de tratamiento. El objetivo es determinar la eficacia de estos sistemas de tratamiento en la eliminación de fármacos y si el purín, una vez tratado, puede aplicarse como fertilizante en los campos sin ningún riesgo para la salud y el medio ambiente.

El tratamiento aerobio de purines ha sido estudiado durante más de 20 años empleando diferentes sistemas (Burton, 1992). Éstas y otras investigaciones (Westerman et al., 2000) indicaron ventajas del tratamiento aerobio, incluyendo la eliminación de olores, eliminación de nitrógeno y mejora del manejo del purín durante el almacenamiento y el vertido.

En esta línea, el tratamiento biológico aerobio con una eliminación de nitrógeno mediante procesos de nitrificación-desnitrificación (70-75% del nitrógeno total), se ha considerado como una alternativa para el tratamiento de estos residuos ganaderos (Burton, 1992; Béline et al., 2002). Sin embargo, este tipo de tratamientos no están pre-diseñados para le eliminación de compuestos farmacéuticos como los antibióticos. En cuanto a los tratamientos mediante el sistema de lodos activados, algunos autores han estudiado la capacidad de estos tratamientos en la eliminación de fármacos en aguas residuales.

Específicamente en el caso de la tetraciclinas, hay unos escasos trabajos que determinan su eliminación en sistemas de lodos activados aplicados en aguas residuales (Kim et al., 2005; Gao et al., 2012). Sin embargo, según las búsquedas bibliográficas realizadas, la eliminación de tetraciclinas en sistemas de lodos activados aplicados a purines, no ha sido estudiada hasta este momento.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue el seguimiento de los cinco antibióticos objeto de estudio en capítulos anteriores: oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, tilosina y amoxicilina, a lo largo de los diferentes procesos de tratamiento en dos plantas a escala real de depuración de purines, con el fin de determinar su eficacia en la eliminación de estos compuestos. Si bien en un primer momento se planteó el seguimiento de los cinco antibióticos, tras comprobar que no se detectaban concentraciones de tilosina y amoxicilina en todas las muestras recogidas (apartado 7.3.3.), finalmente el trabajo se centró en las tres tetraciclinas.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las concentraciones de antibióticos encontradas en purines en otros estudios. Los resultados obtenidos confirmaban los primeros resultados encontrados al analizar las muestras procedentes de las plantas de

tratamiento de purines, las tetraciclinas se encuentran en gran medida en estos residuos mientras que la tilosina aparece en concentraciones traza (por debajo de la sensibilidad que permitía el método analítico) y la amoxicilina no aparece en ninguno de los estudios consultados. En la tabla 78 se recoge un resumen con estas referencias consultadas.

***Tabla 78*:** Concentraciones máximas de varios antibióticos detectadas en muestras de purín procedentes de granjas porcinas (Adaptado de Hamscher et al., 2006)

Antibióticos	Número de muestras	Concentración máxima (mg/kg)	Referencias
Tetraciclinas			
Clortetraciclina	7	2,7	(Höper et al., 2002)
Doxiciclina	3	0,04	(Aga et al., 2003)
Oxitetraciclina	1	19	(de Liguero et al., 2003)
Tetraciclina	181	66	(Berger et al., 1986)
Sulfonamidas			
Sulfadiacina	6	1,1	(Höper et al., 2002)
Sulfadimetoxina	8	0,003	(Campagnolo et al., 2002)
Sulfametacina	-	40	(Berger et al., 1986)
N-acetil-sulfametacina	6	2,6	(Haller et al., 2002)
Sulfatiazol	6	12,4	(Haller et al., 2002)
Macrólidos			
Tilosina	7	<0,02	(Höper et al., 2002)
Otros			
Lincomicina	8	0,24	(Campagnolo et al., 2002)
Trimetoprim	6	<0,1	(Campagnolo et al., 2002; Haller et al., 2002)

El estudio se llevó a cabo en colaboración con el Área de Ecología de la Universidad de León y formó parte del proyecto LE-02/2005: *"Riesgos sanitarios en la reutilización de aguas residuales en agricultura. Comparación de las tecnologías existentes e implicaciones en el diseño y explotación de los procesos"*, cuyo investigador principal era el Dr. Eloy Bécares Mantecón.

7.2. Plantas de tratamiento de purines

Este estudio se llevó a cabo en dos plantas reales de tratamiento de purines mediante fangos activados pertenecientes al grupo GUASCOR, situadas en las localidades de Hornillos de Eresma (Valladolid) y Turégano (Segovia). Ambas plantas disponían del

mismo sistema de tratamiento y se abastecían de purín de varias granjas (unas 50 granjas cada una de ellas). Estaban concebidas como plantas de cogeneración, es decir, utilizaban gas natural para la producción de electricidad y el tratamiento del purín.

Estas plantas procesaban aproximadamente 250-300 m^3/día de purines,utilizando un tratamiento completo de fangos activados convencional. El purín bruto procedente de las granjas se almacenaba en un tanque de homogeneización-oxigenación de 1500 m3 de capacidad y con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de dos a cuatro días, desde donde era conducido a la planta de tratamiento con un caudal de 27 m^3/h durante unas cinco horas al día.

Este purín era posteriormente sometido a una separación de sus partes sólidas y líquidas en un proceso que constaba de tres etapas: (a) tamices rotatorios de 0,5 mm de diámetro de poro, (b) decantación primaria (en un tanque de 154 m^3) y (c) floculación mediante adición de cloruro férrico 40% como coagulante combinado con pequeñas cantidades de un polímero catiónico de poliacrilamida de alto peso molecular (Hyfloc FIC-100) como floculante.

El líquido así separado era transferido a una unidad de fangos activados consistente en un tanque de nitrificación-desnitrificación (proceso aerobio/anóxico) de 3500 m^3 de volumen separado en dos líneas (cada una de las cuales tenía un tercio de su volumen en condiciones anóxicas y el resto en condiciones aerobias) y con un tiempo de retención hidráulico de siete días.

El purín que salía de esta unidad era conducido a un decantador secundario. El purín purificado era sometido a un proceso de evaporación en un digestor-deshidratador empleando la energía calorífica generada por motores de gas que producían electricidad y calor a partir de gas natural.

En estas plantas no se generaban efluentes líquidos. Las fracciones sólidas recogidas en las diferentes fases del tratamiento se sometían a un procedimiento de secado por medio de calor en un tambor rotatorio a altas temperaturas (desde 200°C en la parte inicial del tambor hasta 60°C en la parte final) que se obtenían aprovechando el exceso de calor de los motores de gas.

El producto final era un fango seco. Cabe citar que el coste del tratamiento para el ganadero era de unos 3€/m^3 de purín. El precio de venta del fertilizante seco era de 0,02 €/kg.

En la figura 57 puede verse el esquema de una de las plantas de tratamiento (Adaptado de Bécares et al., 2007 y Reinoso et al., 2008).

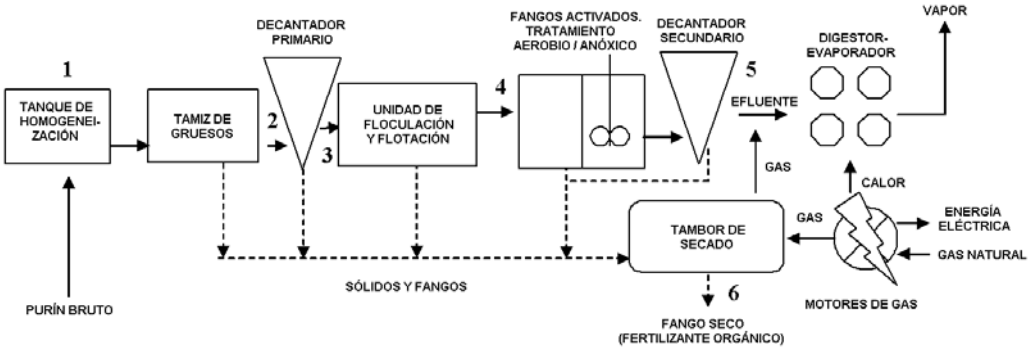


Figura 57: *Esquema de la planta de tratamiento. Los números indican los puntos de muestreo y corresponden a: (1) tanque de homogeneización; (2) salida del tamiz; (3) salida del decantador primario; (4) salida de la unidad de tratamiento físico-químico de coagulación-floculación; (5) salida del decantador secundario y (6) fertilizante seco. (Adaptado de Bécares et al., 2007 y Reinoso et al., 2208)*

7.2.1. Purín

El purín procedente de granjas porcinas es una matriz compleja y heterogénea en la que la concentración de iones, materia sólida en suspensión, nitrógeno y fósforo varía de manera significativa entre unas granjas y otras.

Contiene iones metálicos como potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cinc (Zn^{2+}), hierro (Fe^{3+}) y sodio (Na^+), además de otros iones como amonio (NH_4^+), acetato (CH_3COO^-) y bicarbonato (HCO_3^-). Asimismo, contiene ácidos grasos y fenoles procedentes de la degradación bacteriana de las proteínas en el intestino de los cerdos.

El purín también contiene ácidos biliares y ésteres procedentes de la bilis, aminoácidos variados, proteínas y fibra no degradada. En función de cómo haya sido recogido, también puede contener paja.

Todos estos componentes hacen que sea una matriz “analíticamente complicada”, pudiendo generar interferencias analíticas. Además pueden influir en la distribución del antibiótico estudiado entre las fases sólida y acuosa del purín (Loke et al., 2002).

7.2.2. Toma de muestras

El estudio se llevó a cabo durante 14 meses, con muestreos mensuales en el tanque de homogeneización (1); salida del tamiz (2); salida del decantador primario (3); salida de la unidad de tratamiento físico-químico de coagulación-floculación (4); salida del decantador secundario (5). Los puntos de muestreo están indicados en la anterior figura 57.

En todos los casos, para la toma de muestras se emplearon recipientes estériles que se transportaban refrigerados (en neveras portátiles) hasta el laboratorio donde eran mantenidos en congelador hasta su análisis (nunca más de 5 días almacenados antes de análisis), con el fin de evitar potenciales degradaciones de los posibles residuos de antibióticos.

7.3. Resultados

7.3.1. Rendimientos de depuración de las plantas de tratamiento

La caracterización físico-química se realizó dentro del Proyecto LE-02/2005 (Bécares et al., 2007) de acuerdo a los métodos recogidos en el capítulo 3 basados en el libro "Standard Methods" (APHA, 1999). Esta caracterización consistió en el análisis de sólidos suspendidos totales (SST), demanda química de oxígeno (DQO), Nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y Amonio (NH_4^+).

En la tabla 79 se presenta un resumen de los valores medios de parámetros físico-químicos del purín bruto frente al purín homogeneizado (plantas H y T). Como puede observarse, la carga orgánica y la materia nitrogenada del purín homogeneizado, presentan valores muy inferiores al purín bruto. Esto es debido a que en las balsas de homogeneización el purín se diluía.

Tabla 79: *Valores medios (en g/L) de parámetros físico-químicos de purines. Adaptado del Informe Final del Proyecto LE-02/2005 (Bécares et al., 2007)*

	SST	SSV	DQO total	NH_4^+	NTK
Purín bruto	28,4	24,1	44,8	1,5	4,4
Purín H (homogeneizador)	10,1	8,6	17,1	0,8	1,5
Purín T (homogeneizador)	6,7	6,0	15,2	1,0	1,3

En la figura 58 puede verse una representación de las concentraciones medias de los parámetros analizados en los distintos puntos de muestreo en las dos plantas.

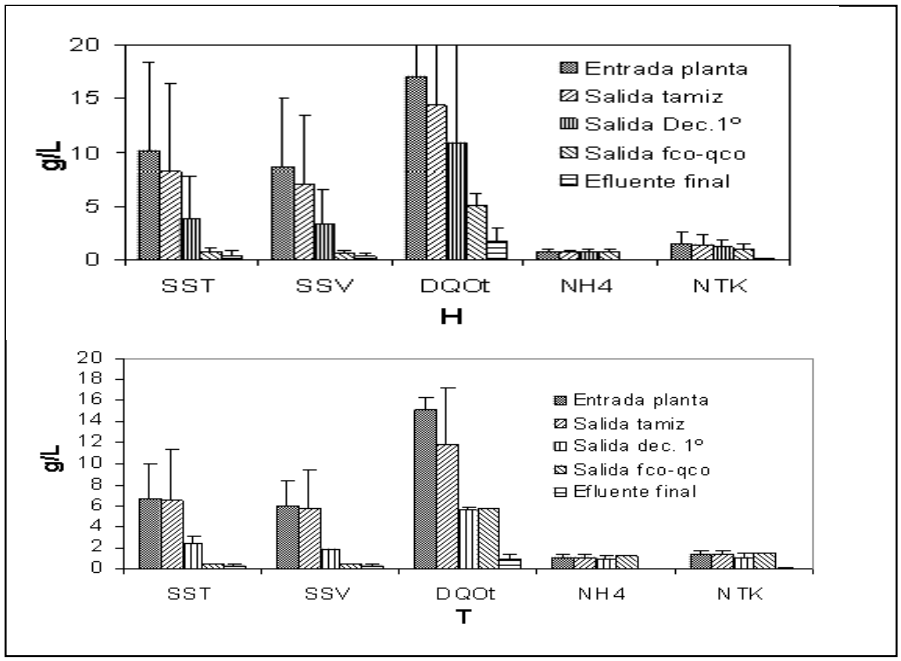


Figura 58: *Valores medios y desviación estándar de parámetros físico-químicos en distintos puntos de tratamiento de las plantas H y T. Adaptado del Informe Final del Proyecto LE-02/2005 (Bécares et al., 2007)*

La determinación de los parámetros físico-químicos convencionales permitió conocer el rendimiento de depuración (en cuanto a eliminación de materia orgánica y nitrógeno), lo que se utilizó como indicador del rendimiento de funcionamiento de ambas plantas.

A partir de los parámetros físico-químicos determinados, se calculó el rendimiento en la depuración (recogidos en la tabla 80).

Se observó que la carga orgánica (fracción soluble) del purín se iba reduciendo a lo largo de los procesos de tratamiento, sin embargo, el nitrógeno se eliminaba fundamentalmente en el reactor biológico con los procesos de nitrificación (zona aerobia) y desnitrificación (zona anóxica). En el caso de los sólidos en suspensión, se eliminaban fundamentalmente en la unidad de floculación.

El rendimiento en la depuración de las plantas H y T, fue elevado para todos los parámetros analizados, por lo tanto ambas plantas presentaban un sistema de tratamiento mediante fangos activados bien controlado y con un funcionamiento correcto en cuanto a eliminación de materia orgánica, sólidos en suspensión y nitrógeno se refiere. Por lo tanto, estos sistemas eran adecuados para el tratamiento de purines, desde el punto de vista de eliminación de contaminantes “convencionales”.

Tabla 80: *Rendimientos medios (%) de los distintas puntos de muestreo de las plantas H y T. Adaptado del Informe Final del Proyecto LE-02/2005 (Bécares et al., 2007)*

	H (%)					T (%)				
	SST	**SSV**	**DQO**	**NH_4^+**	**NTK**	**SST**	**SSV**	**DQO**	**NH_4^+**	**NTK**
Tamiz	19	18	10	3	7	3	6	23	-1	-4
Decantador primario	50	47	25	0	15	64	67	53	6	20
Floculador	58	64	32	4	16	83	79	-2	-30	-32
Reactor de fangos activados	41	49	65	98	93	34	34	83	98	96
Total (%) Eliminación	**94**	**94**	**83**	**98**	**96**	**96**	**96**	**94**	**98**	**96**

Los valores de rendimiento del tratamiento demostraron que el promedio global de eliminación fue superior al 93%, excepto para la DQO en la planta H. Esos valores de rendimiento obtenidos, son similares a los encontrados en la bibliografía sobre sistemas de tratamiento de purines (Viancelli et al., 2013; Riaño et al., 2014).

7.3.2. Eliminación de tilosina y amoxicilina

Como se indicó anteriormente, no se detectaron estos antibióticos en ninguna de las muestras de purines. Para bajar los límites de detección, se trató de concentrar las muestras, pero se siguió sin encontrar la presencia de estos compuestos.

Esta ausencia está en línea con lo observado en otros trabajos encontrados en bibliografía, las concentraciones máximas de tilosina encontradas en purines eran inferiores a 0,02 ppm (Höper et al., 2002).

7.3.3. Eliminación de las tetraciclinas a lo largo del tratamiento

Se han determinado en heces de animales tratados con tetraciclinas por vía oral, elevadas concentraciones de los compuestos inalterados. También se han encontrado concentraciones elevadas de estos antibióticos en heces de animales adultos, por ejemplo, en el caso de la oxitetraciclina 871,7 mg/Kg en heces y 19,0 mg/Kg (se diluye al mezclar el purín bruto con las camas) en el estiércol o abono (De Liguoro, 2003). Este compuesto se elimina en las heces y orina, siendo la vía renal, la principal ruta de excreción de tetraciclinas en mamíferos (Huber, 1991).

La OXT presenta en la matriz de purín de cerdo una vida media inferior a 10 días (De Liguoro, 2003). La degradación de la OXT está condicionada (disminuye) por su adsorción

al purín o abono (Loke et al., 2002). Las concentraciones de OXT encontradas varían en función de la profundidad a la que se muestrea el abono. En capas superficiales, su concentración aumenta al producirse la evaporación de agua contenida, en las capas intermedias y más profundas, las altas temperaturas y actividad microbiana incrementan la degradación de la OXT (De Liguoro, 2003).

En la Tabla 81 se exponen los valores medios (media de todos los meses de muestreo) de las concentraciones de tetraciclinas detectadas en las diferentes muestras.

Tabla 81: *Concentraciones medias de oxitetraciclina en los distintos puntos de muestreo (n: 14 muestreos en cada punto, <LOQ: por debajo del límite de cuantificación del método)*

	OXT (mg/Kg)		**CLT (mg/Kg)**		**DXC (mg/Kg)**	
Puntos de muestreo	**H**	**T**	**H**	**T**	**H**	**T**
1. Tanque de homogeneización	0,7	1,3	0,3	0,3	1,2	<LOQ
2. Salida del tamiz	0,8	1,1	0,2	0,2	1,1	<LOQ
3. Salida del decantador primario	0,9	0,7	0,4	0,3	1,5	<LOQ
4. Salida del coaguladorfloculador	0,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5. Salida del decantador secundario	0,2	0,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

No se detectaron concentraciones por encima del LOQ para la doxiciclina en ninguna de las muestras procedentes de la planta T.

A continuación, en las Figuras 59, 60 y 61 se representa la evolución de la concentración de cada una de las tetraciclinas en las dos plantas y las desviaciones estándar obtenidas en cada punto.

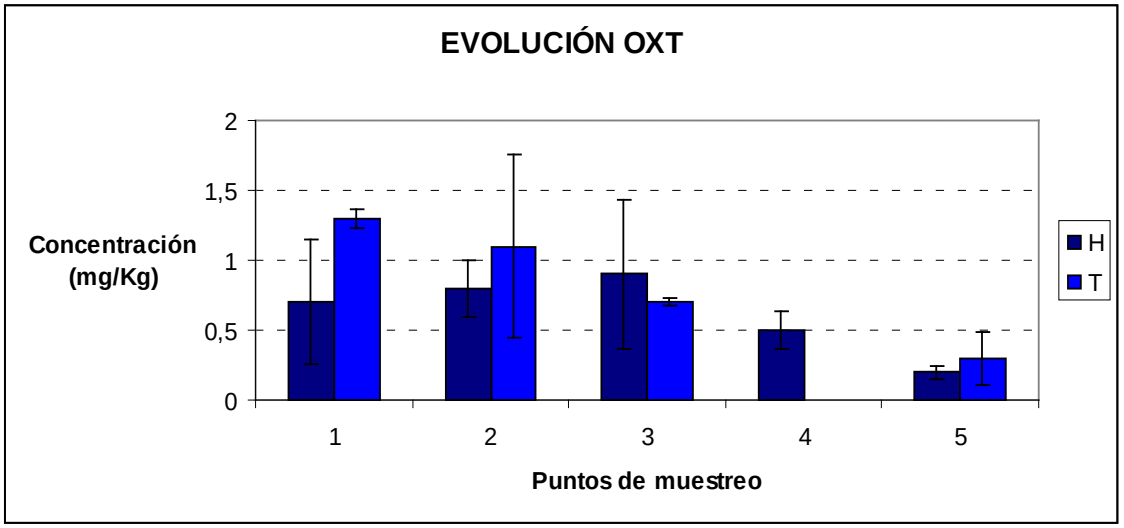


Figura 59: *Concentraciones medias y desviaciones estándar de oxitetraciclina a lo largo de los diferentes procesos de tratamiento en las dos plantas (H y T). Puntos: (1) tanque de homogeneización; (2) salida del tamiz; (3) salida del decantador primario; (4) salida de la unidad de tratamiento físico-químico de coagulación-floculación; (5) salida del decantador secundario*

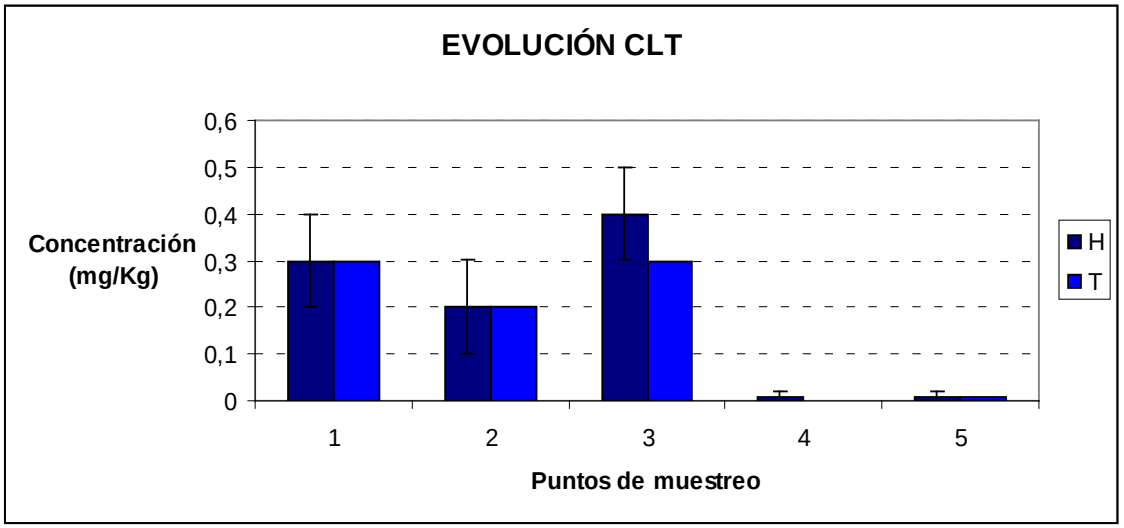


Figura 60: *Concentraciones medias y desviaciones estándar de clortetraciclina a lo largo de los diferentes procesos de tratamiento en las dos plantas (H y T). Puntos: (1) tanque de homogeneización; (2) salida del tamiz; (3) salida del decantador primario; (4) salida de la unidad de tratamiento físico-químico de coagulación-floculación; (5) salida del decantador secundario*

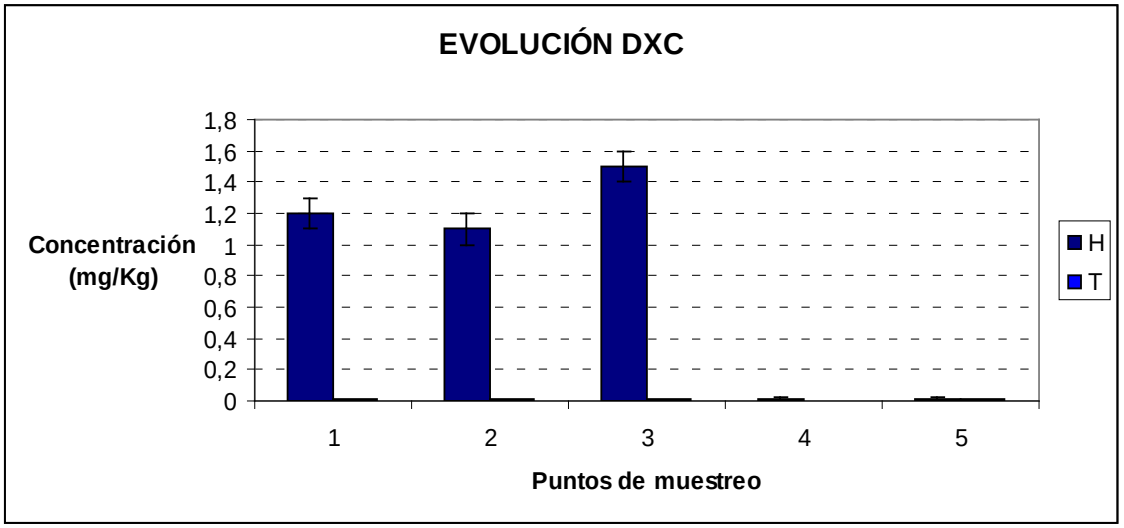


Figura 61: *Concentraciones medias y desviaciones estándar de doxiciclina a lo largo de los diferentes procesos de tratamiento en las dos plantas (H y T). Puntos: (1) tanque de homogeneización; (2) salida del tamiz; (3) salida del decantador primario; (4) salida de la unidad de tratamiento físico-químico de coagulación-floculación; (5) salida del decantador secundario*

Estas figuras muestran las concentraciones medias de las TCs en los diferentes puntos de muestreo de ambas plantas. En algunos casos, las concentraciones medias estaban por debajo del límite de cuantificación (LOQ) del método, este caso se dio sobre todo para la doxiciclina en muestras procedentes de la planta de tratamiento T.

Como puede verse en las anteriores figuras, concentraciones diferentes de las tetraciclinas fueron encontradas en ambas plantas de tratamiento según la época en la que se realizara el muestreo. La dispersión de resultados fue especialmente reseñable en el caso de la oxitetraciclina en la planta H. En todo caso, la dispersión de los resultados estuvo relacionada con los picos de administración de los antibióticos en invierno. En esta estación, debido a las bajas temperaturas, la administración de antibióticos es mayor con el fin de prevenir enfermedades en los animales (Pan et al., 2011).

La mayor parte de valores determinados en este trabajo para los tres antibióticos, es menor de los reportados para estos compuestos en purines según la bibliografía consultada (Martínez-Carballo et al., 2007; Schwaiger et al., 2009; Zhao et al., 2010; Pan et al., 2011; Wu et al., 2011; Quiao et al., 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos, las tetraciclinas estudiadas, muestran una tendencia similar en ambas plantas de tratamiento. Excepto para la OXT en la planta T, parece que estos antibióticos tienden a concentrarse a la salida del decantador primario (punto de muestreo 3). Este incremento en la concentración, puede explicarse por un

confinamiento parcial de estos antibióticos en las partículas del purín que después son liberados en el decantador primario.

Cabe destacar la eliminación de las tres tetraciclinas en la unidad de coagulación-floculación. Los procesos en esta unidad eran diseñados para promover la eliminación de sólidos suspendidos y coloides que no se depositaban. La mayor parte de coloides tienen una cubierta de materia orgánica (Stumm et al., 1996), los contaminantes lipídicos suelen estar asociados a ellos y por lo tanto son eliminados en esta unidad. En esta línea en una publicación (Carballa et al., 2005), se encontró que la floculación-coagulación conseguía la eliminación de varios compuestos farmacéuticos y de cuidado personal (denominados PPCPs "pharmaceutical and personal care products") de las aguas residuales, además se determinaba que la eliminación era proporcional a su K_d (coeficiente de distribución sólido-agua L/Kg).

La estructura de las tetraciclinas que incluye los grupos funcionales dimetilamina y β-dicetona fenólica, juega un importante papel en su tendencia a unirse a los sólidos suspendidos y su fuerte adsorción (Teixidó et al., 2012). Esto explica la disminución de su concentración tras el paso del purín por la unidad de coagulación-floculación (punto de muestreo 4). Estos resultados están en la línea de los obtenidos en otros estudios encontrados en la bibliografía (Choi et al., 2008), los cuales demostraron que la coagulación producía una eliminación de entre 43-94% de las tetraciclinas en el agua residual, pero en las aguas de río, esta eliminación era menor 44-67% debido a las interferencias orgánicas.

Finalmente, como puede verse en las figuras citadas anteriormente, las tetraciclinas son también parcialmente eliminadas por el sistema de fangos activados, así las menores concentraciones de los tres antibióticos fueron encontradas a la salida del decantador secundario (punto de muestreo 5), excepto para la OXT en la planta T.

Debido a su tendencia a la adsorción, se ha demostrado que aunque algún proceso de biodegradación puede ocurrir, las tetraciclinas son principalmente eliminadas por adsorción al lodo (Li et al., 2010).

7.3.4. Rendimiento en la eliminación de tetraciclinas

A partir de los resultados de las concentraciones de las tres tetraciclinas determinadas en cada uno de los puntos de muestreo, se calcularon los rendimientos globales de eliminación. Los porcentajes obtenidos se muestran en la Tabla 82.

Tabla 82: *Rendimientos globales de eliminación de tetraciclinas en las plantas de tratamiento*

Rendimientos de eliminación (%)		
Ab	Planta H (%)	Planta T (%)
Oxitetraciclina	**71%** CV= 4,8%	**76%** CV= 3,5%
Clortetraciclina	**75%** CV= 3,2%	**80%** CV=5,4%
Doxiciclina	**95%** CV= 0.9%	**ND**

Como puede verse en la tabla anterior, los rendimientos en la eliminación fueron en todos los casos, superiores al 70% (excepto en el caso de la doxiciclina en la planta T que no se pudo calcular puesto que no fue detectada).

Los rendimientos de eliminación para la oxitetraciclina y clortetraciclina fueron comparables en ambas plantas de tratamiento, si bien el rendimiento de la planta T fue ligeramente superior. En cuanto a la doxiciclina en la planta H, el rendimiento de eliminación fue superior al obtenido para las otras dos tetraciclinas.

7.4. Discusión

En la tabla 83 se recogen los porcentajes de eliminación de tetraciclinas en agua residuales y purines encontrados en la bibliografía, para poder realizar una comparación con los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 83: Porcentajes de eliminación de tetraciclinas en aguas residuales y purines según distintas publicaciones encontradas en la bibliografía

Tetracycline	Treatment	Waste	Scale	Maximum Elimination (%)	Reference
OTC	Anaerobic digestion	Beef manure	Laboratory scale	59%	Arikan et al., 2006.
CTC	Anaerobic digestion	Beef manure	Laboratory scale	75%	Arikan, 2008.
OTC/ CTC	Composting	Beef manure	Full scale (farm composting)	>90%/ >99%	Arikan et al., 2009.
CTC	Composting	Broiler, layer-hen and hog manure	Laboratory scale	>90% (except for hog manure, 27%)	Bao et al., 2009.
OTC/ CTC/ DC	i) Anaerobic digestion ii) Anoxic/anaerobic	Swine wastewater	Full scale (farm WWTPs)	i)97%/ 100%/ 98% ii)100%/ 90%/ 74%	Chen et al., 2012
OTC/ CTC/ DC	Activated sludge	Sewage	Full scale (STP)	39%/ >99%/ 50%	Gao et al., 2012
OTC	Photodegradation	Spiked WWTP effluent	Laboratory scale	81-97%	García Rodríguez et al., 2013
OTC/CTC	Ozonation	Aqueous solution	Laboratory scale	100%/100%	Gómez-Pacheco et al., 2011.
OTC/CTC	Photodegradation	Aqueous solution	Laboratory scale	100%/100%	Gómez-Pacheco et al., 2012.
CTC	i) O_3 ii) O_3/H_2O_2 iii) $O_3/UV/H_2O_2$ iv) O_3/UV	Piggery wastewater	Laboratory scale	i) 30% ii) 65% iii) 100% iv) 100%	Lee et al., 2011.
OTC	SBR/Activated sludge	OTC production wastewater	Full scale (WWTP for the treatment of OTC production wastewater)	48.5%	Li et al., 2008
OTC/ CTC	Activated sludge	Sewage	Full scale (STP)	44%/ 82-85%	Li and Zhang, 2011
OTC[I]	Activated sludge	ML from an OTC manufacture factory	Bench scale	35.2-64.5%	Liu et al., 2013
OTC/CTC	Photodegradation	Aqueous solution	Laboratory scale	100%/100%	López-Peñalver et al., 2010
CTC/OTC	AORP	Spiked surface water, ground water and sewage	Laboratory scale	>90%	López-Peñalver et al., 2013

Tabla 83: Continuación

OTC	Electrochemical	Livestock wastewater	Laboratory scale	>99%	Miyata et al., 2011
OTC/ CTC	Fermentation	Recycled organic manure	Laboratory scale	85%/ 92%	Motoyama et al., 2011
OTC	Photodegradation	Spiked swine manure	Laboratory scale	65%	Ratasuk et al., 2012
TC/CTC	Anaerobic digestion	Spiked swine manure	Laboratory scale	92%/98%	Tong et al., 2012
OTC	i) Extraction ($Mg(NO_3)_2$)/ Fenton ii)Extraction($Mg(NO_3)_2$)/Ozonation	Spiked cow manure	Laboratory scale	i) 95% ii) 96%	Uslu and Balcıoğlu, 2012
CTC	Anaerobic digestion	Swine manure	Laboratory scale	7% (AD 22°C), 80% (AD 38°C), 98% (AD 55°C)	Varel et al., 2012
OTC/ CTC	Composting	Swine manure	Pilot scale	92%/ 74%	Wu et al., 2011

^{T} = the sum of OTC, EOTC, α-OTC, and β-OTC; C_0 = initial concentration; WWTP = wastewater treatment plant; STP = sewage treatment plant; SBR = Sequence batch reactor; AORP = Advanced oxidation (Gamma radiation)/reduction process; ML= mother liquor; AD = anaerobic digestion

Como puede verse en la tabla anterior, los máximos porcentajes de eliminación de tetraciclinas en aguas residuales y purines (100%), se obtenían en procesos avanzados de oxidación y fotodegradación. La mayor parte de trabajos publicados, se han centrado en tratamientos anaerobios, en los que se conseguían rendimientos de eliminación para las tetraciclinas de entre 55% y el 99%.

En el caso de los sistemas de lodos activados, no se han encontrado resultados de eliminación de tetraciclinas para el caso de tratamiento de purines, sólo para aguas residuales. Los resultados obtenidos en estos estudios (en aguas residuales), muestran una eliminación de tetraciclinas con rendimientos de entre 35-85%, aunque según otro trabajo encontrado (Gao et al., 2012), eliminaciones de clortetraciclina superiores al 99%, pueden encontrase en sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados (planta de East Lansing, Michigan, USA).

Comparando los resultados obtenidos en este estudio para los dos sistemas de tratamiento de purines mediante fangos activados, con eficacias de entre 71-95%, con los recogidos en la bibliografía para plantas de tratamiento de aguas residuales mediante esta tecnología, pueden considerarse muy satisfactorios, especialmente considerando que la matriz de purines es mucho más compleja que el agua residual.

En cualquier caso, cabe señalar que de acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor parte de las tetraciclinas eliminadas de los purines, se concentran en los lodos que son purgados de la unidad de floculación-coagulación y del decantador secundario. Por lo tanto, esta acumulación debe tenerse en cuenta, ya que esos lodos son secados y pueden ser utilizados como fertilizantes de campos.

Cabe destacar también, que las concentraciones de tetraciclinas encontradas en los purines analizados en este trabajo, son menores que las determinadas en otros países y que se encuentran recogidas en la bibliografía.

En conclusión, estas plantas de tratamiento de purines mediante fangos activados, funcionaban correctamente con eliminaciones globales en cuanto a los parámetros convencionales: DQO, SSV, NH_4^+ y NTK de en torno a 93%. También eran sistemas eficaces en la eliminación de tetraciclinas, con rendimientos que oscilaban entre el 70 y 95%, si bien hay que tener en cuenta la potencial acumulación de estos antibióticos en los lodos, sobre todo si se plantea su uso como fertilizantes de los campos de cultivo.

En la eliminación de las tetraciclinas, el tratamiento físico-químico no tiene un efecto relevante, mientras que el mayor descenso en las concentraciones de estos antibióticos ocurre en la unidad de floculación-coagulación.

7.6. Publicaciones

El trabajo realizado en este capítulo se ha incluido en dos publicaciones:

- ✓ Ponencia (comunicación oral): "Presencia de tetraciclinas en purines y estudio de su eliminación en procesos de fangos activados". Montes, N., Hijosa, M., Bécares, E., Méndez, R., Martín-Villacorta, J. (2008). Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos (REDISA'2008), Castellón, España.

- ✓ Artículo publicado:
  Montes, N., Otero, M., Coimbra, R.N., Méndez, R., Martín-Villacorta, J. (2015). *Removal of tetracyclines from swine manure at full-scale activated sludge treatment plants*. Environmental Technology. 36: 1966-1973.

Capítulo 8

Conclusiones

8.1. Conclusiones

Tras este estudio se han llegado a las siguientes conclusiones:

- ✓ Los métodos analíticos optimizados mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta, fueron reproducibles, exactos y permitieron el seguimiento de las concentraciones de los cinco antibióticos objeto de estudio, en distintos procesos unitarios de sistemas de tratamiento de aguas residuales y purines mediante lodos activados. Estos métodos fueron validados, cumpliendo unos criterios de aceptación basados en la Guía Internacional de Validación de métodos analíticos.

- ✓ Los sistemas piloto de tratamiento de aguas residuales a escala de laboratorio, que se pusieron en marcha para realizar la modelización del sistema real de la EDAR de León y su alfoz, presentaron un funcionamiento estable, con elevadas tasas de eliminación de materia orgánica (entre 92-96% de reducción de DBO_5 y 93-94% de DQO), excepto en el caso de los sistemas con baja carga másica donde estas eliminaciones fueron menores (un promedio de reducción de DBO_5 de 79% y 82% de DQO). Según los resultados experimentales obtenidos, el TRH no tuvo influencia en la eliminación de materia orgánica (las tasas obtenidas fueron similares con 8 h y 24 h), sin embargo la eliminación de materia orgánica fue menor en el caso de los sistemas con baja carga másica.

- ✓ La eliminación de los cinco antibióticos estudiados (oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, tilosina y amoxicilina) en los sistemas piloto de lodos activados, osciló entre el 100% de eliminación para la doxiciclina en el sistema con TRH de 24 horas, y el 38% para la tilosina en la planta con TRH de 8h. En líneas generales, las tres tetraciclinas y la amoxicilina fueron eliminadas más eficazmente que la tilosina. El promedio global de eliminación en todos los ensayos realizados con didtion TRH y carga másica, fue de 74% para la oxitetetraciclina, 91% para la clortetraciclina, 92% para la doxiciclina, 84% para la amoxicilina y 45% para la tilosina.

- ✓ En cuanto a la influencia del tiempo de retención hidráulico, los porcentajes de eliminación de los antibióticos fueron menores al descender el tiempo de 24 a 8 horas, excepto para la amoxicilina. La eliminación disminuía hasta un 38% para la oxitetraciclina, un 19% para la tilosina, un 11% para la doxiciclina y un 7% para la clortetraciclina. Sin embargo, en la amoxicilina la eliminación se veía incrementada ligeramente, (un 8%) en el sistema con el TRH más bajo.

✓ La carga másica influía en diferente grado. En el caso de la oxitetraciclina, las tasas de eliminación eran hasta 20% superiores cuando la carga másica era 10 veces inferior. En las otras dos tetraciclinas y en la amoxicilina, la influencia fue muy leve, con un incremento de entre el 4 y el 10% en la eliminación, cuando la carga era menor. En el caso de la tilosina, este parámetro no parecía tener ningún efecto en la eliminación de la misma.

✓ Según los resultados experimentales obtenidos, la eliminación de la oxitetraciclina era la más sensible a la variación en los parámetros: tiempo de retención hidráulico y carga másica, de los sistemas de tratamiento mediante lodos activados.

✓ La microfauna asociada a los sistemas se vió afectada por la presencia de los cinco antibióticos, las especies de *Zoothamnium* eran las dominantes en presencia de estos compuestos a las concentraciones estudiadas, por lo que parecían ser las especies más resistentes a estos fármacos.

✓ En los ensayos de cultivo en placa realizados a partir de inóculos procedentes de los lodos activados de los sistemas piloto, se obtuvo una mayor proliferación de bacterias en presencia de amoxicilina y tilosina, lo que podía ser indicativo de una mayor resistencia de las bacterias a estos dos antibióticos.

✓ Según los resultados obtenidos en el análisis de muestras recogidas en distintos puntos de la línea de tratamiento de la EDAR de León, los iones metálicos eran eficazmente eliminados. Sin embargo, estos metales pesados tendían a acumularse en el lodo, especialmente en los fangos primarios. Los dos metales detectados en mayor concentración en las muestras de lodos fueron el Hierro y el Zinc.

✓ La eliminación de materia orgánica fue similar en la planta cuyas poblaciones dominantes eran heterótrofas aerobias y en la planta anaerobia (proceso desnitrificante), con una reducción de DQO de un 89% y un 85%, respectivamente. La eliminación de Nitrógeno en forma de amonio fue ligeramente superior en la planta cuyas poblaciones dominantes eran autótrofas aerobias (nitrificante), con un 94% de reducción, frente a un 87% en la heterótrofa aerobia.

✓ Según los resultados experimentales obtenidos en los sistemas piloto con diferentes comunidades bacterianas dominantes, la tilosina era el antibiótico que menos se eliminaba, con porcentajes de reducción que oscilaron entre el 13% en el sistema desnitrificante y el 59% en el heterótrofo aerobio. Al igual que en el estudio

anterior, era el antibiótico más resistente a la eliminación. Para el resto de antibióticos, la eliminación fue significativamente mayor en los sistemas heterótrofos. En el autótrofo, la máxima reducción obtenida fue de un 57%, en el caso de la amoxicilina. El sistema heterótrofo anaerobio, consiguió reducciones de entre el 60% para la oxitetraciclina y el 96% para la amoxicilina. En el heterótrofo aerobio los resultados obtenidos fueron ligeramente inferiores, entre un 55% para la oxitetraciclina y un 84% para la amoxicilina

- ✓ Finalmente, para completar el estudio, se evaluaron dos plantas de tratamiento de purines mediante lodos activados. En ellas se pudo realizar el seguimiento de las concentraciones de las tres tetraciclinas. La eliminación de estos antibióticos en ambas plantas fue similar, con porcentajes promedio de eliminación de entre 71-76% para oxitetraciclina, 75-80% para clortetraciclina y 95% para doxiciclina. La eliminación de estos compuestos ocurría sobre todo en la unidad de floculación-coagulación de ambas plantas de tratamiento

- ✓ Los sistemas de tratamiento de aguas residuales y purines mediante lodos activados pueden ser muy eficaces en la eliminación de los antibióticos: oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, tilosina y amoxicilina, pero para ello en su diseño deben tenerse en cuenta variables y parámetros que pueden influir en esta eliminación. Estos parámetros son: el tiempo de retención hidráulico, la carga másica, el tipo de comunidades bacterianas dominantes en los reactores y el pretratamiento de floculación-coagulación. Para favorecer la eliminación de estos antibióticos los sistemas deberían diseñarse con altos tiempos de retención hidráulico, empleando cargas másicas no elevadas, con comunidades bacterianas mayoritariamente heterótrofas y con un pretratamiento de floculación.

Finalmente, se recomienda para futuras investigaciones, profundizar en el estudio de eliminación de estos cinco antibióticos en los sistemas de lodos activados, evaluando cuáles son los procesos de eliminación que tienen lugar y en qué medida ocurre cada uno de ellos. Para ello también se recomienda continuar trabajando en los métodos analíticos, incluyendo otros detectores como el MS, con el fin de bajar al máximo el límite de cuantificación y aumentar así la sensibilidad.

Referencias bibliográficas

Aescht, E., Foissner, W. (1992). *Biology of a high-rate activated sludge plant of a pharmaceutical company. Arch. Hydrobiol. /Suppl. 90:* 207-251.

Aga, D., Goldfish, R., Kulshrestha, P. (2003). *Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes*. Analyst. 128(6): 658-662.

Alonso, A., Sánchez, P., Martínez, J.L. (2001) *Environmental selection of antibiotic resistance genes.* Environ. Microbiol, 3: 1-9.

Anderson, C.R., Rupp. H.S., Wu, W.H. (2005) *Complexities in tetracycline analysis-chemistry matrix extraction, cleanup and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A.

Andreozzi, R., Canterino, M., Marotta, R., Paxeus, N. (2005). *Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of Amoxicillin.* Journal of Harzardous Materials. 122: 243-250.

Aravinthan, V., Mino, T., Takizawa, S., Satoh, H., Matsuo, T. (2000). *Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification.* 1st World Congress of the International Water Association, 3: 146-153. Paris 3-7 July 2000.

Arikan, O.A., Mulbry, W., Ingram, D., Millner, P. (2009). *Minimally managed composting of beef manure at the pilot scale: Effect of manure pile construction on pile temperature profiles and on the fate of oxytetracycline and chlortetracycline*. Bioresource Technology. 100: 4447–4453.

Bécares, E. (1994). *Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratando aguas residuales de la industria farmacéutica*. *Tesis Doctoral. Universidad de León.*

Bao, H.F., Yang, W., Zhang, L., Feng, L. (2013). *Efficiency and kinetics of heavy metal removal from water by sludge-based activated carbon*. Zhongguo Huanjing Kexue. 33(1): 69-74.

Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y. (2009). *Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures.* Waste Management. 29: 1416-1423.

Baquero, F., Martinez, J.L., Cantón, R. (2008). *Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current opinion in biotechnology*. 19:260-265.

Barceló, D. (2007). *Emerging contaminants in Europe: why we should monitor them?.* 2nd EMCO Workshop on emerging contaminants in wastewaters: monitoring tools and treatment technologies. Belgrado 26-27 Abril.

Bécares Mantecón, E. (2007). *Informe Final del Proyecto LE-02/2005. Riesgos sanitarios en la reutilización de aguas residuales en agricultura. Comparación de las tecnologías existentes e implicaciones en el diseño y explotación de los procesos*. ITACYL.

Belkheiri, D., Fourcade, F., Geneste, F., Floner, D., Aït-Amar, H., Amrane, A. (2011). *Feasibility of an electrochemical pre-treatment prior to a biological treatment for tetracycline removal.* Separation and Purification Technology. 83: 151–156.

Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H., Chen, L. (2008). Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1202: 173–180.

Benito-Peña, E., Partal-Rodera, A.I., León-González, M.E., Moreno-Bondi, M.C. (2005). *Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection*. Analytica Chimica Acta.

Berger, S.A. (1986). *Antimicrobial agents and the medical journal: trends in publishing, 1936-1983*. Reviews of Infectious Diseases. 8(5): 756-759.

Bergeron, S., Boopathy, R., Nathaniel, R., Corbin, A., La Fleur, G. (2015). *Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water*. International Bio deterioration & Biodegradation. 102: 370-374.

Berrada, H., Borrull, F., Font, G., Moltó, J.C., Marcé, R.M. (2007) *Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC*. Journal of Chromatography A, 1157: 281-288.

Birosova, L., Mackulak, T., Bodik, I., Ryba, J., Skubak, J., Grabic, R. (2014). *Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia.* Science of the Total Environment. 490: 440-444.

Blackwell, P., Holten Lützhøft, H.C., Ma, H.P., Halling-Sørensen, B., B.A. Boxal, A., Kay, P. (2004). *Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection.* Talanta 64: 1058–1064.

Blanchflower, J.W., McCracken, R.J., Haggan, A.S., Kennedy, D.G. (1996) Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its

isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 692: 351-360

Burton, C.H. (1992). *A review of the strategies in the aerobic treatment of pig slurry: purpose, theory and method*. Journal of Agricultural Engineering Research, 53: 249-272.

Campagnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Esteban, J.E., *Currier, R.W., Smith, K., Thu, K.M., McGeehin, M. (2002). Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. Science of the Total Environment. 299: 89–95.*

Campos. J.L., Garrido, J.M., Méndez, R., Lema, J.M. (2001) *Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 95: 1-10.

Carballa, M. (2005). *Fate of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Sewage Treatment Plants focusing on the anaerobic digestion of sludge*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M. (2005). *Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment.* Water Research. 39: 4790–4796.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llomapt, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Termes, T. (2004). *Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant.* Water Research, 38: 2918-2926.

Carlson, K., Cha, J., Yang, S. (2005) *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1097: 40–53.

Carson, R.L. (1962). Silent Spring. Houghton Mifflin, Boston.

Carson, M.C., Ngoha, M.A., Hadley, S.W. (1998). *Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography–particle beam mass spectrometry.* Journal of Chromatography B. 712: 113–128.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E. (2006). *Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy*. Environ. Sci. Technology, 40: 357-363.

Chen, Y., Zhang, H., Luo, Y., Song, J. (2012). *Occurrence and dissipation of veterinary antibiotics in two typical swine wastewater treatment systems in east China*. Environmental Monitoring and Assessment. 184: 2205–2217.

Cheng, G., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A. (2007). *Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid.* Chemosphere, 66: 1494-1501.

Choi, K-J., Kim, S-G., Kim, S-H. (2008). *Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration*. Journal of Hazardous Materials. 151: 38-43.

Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: *Mode of action applications Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65: 232–233.

Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., Kroiss, H., Gans, O., Martínez, E. (2005). *Removal of selected pharmacetuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants.* Water Research, 39: 4797-4807.

Comisión Europea. (1996). European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of the Proceedings. Weybridge, U.K. Report EUR 17549: 125.

Chambers, H.F. (2001). *Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents*. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basics of Therapeutics, 8th Ed. Mc Graw-Hill. New York.

Chee-Sandford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. (2001). *Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities*. Appl. Environ. Microbiol, 67: 1494-1502.

Costanzo, S.D., Murby, J., Bates, J. (2005). *Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment*. Marine Pollution Bulletin. 51: 218–223.

Danés, R., Molina, V., Prats, I.L., Álamos, M., Boixadera, J., Torres, E. (1996). *Manual de gestió dels purins i de la seva reutilització agrícola*. Editado por la Generalitat de Cataluña. Barcelona.

Daughton Ch.G., Ternes, Th.A. (1999). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?.* Environ. Health Perspect, 107: 907-938.

De Liguoro, M., Cibin, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C. (2003). *Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil.* Chemosphere, 52: 203–212.

Dégremont. (2007). *Water treatment handbook*. 7ª ed. Vol 1-2. Paris.

Dewisme, E. (1997). *Características de las aguas residuales.* XV curso Aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. CEDEX. Madrid.

Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D. (2003). *Environmental behaviour and analysis of veterinary and human drug son soils, sediments and sludge.* Trends in Analytical Chemistry, 22 (6).

Directiva 91/271/CEE. DOCE L-35, 30-5-1991.

Directiva 2001/83/EC. (2001). Directive of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medical products. Official Journal No. L311/67.

Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., González-López, J., Hontoria, E., Vilchez, J.L. (2013). *Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotic in laboratory-scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions.* Journal of Environmental Management. 120: 75-83.

Dosta, J. (2007). *Operation and Model description of advanced biological nitrogen removal treatments of highly ammonium loaded wastewaters*. PhD Thesis. Universitat de Barcelona. Facultat de Química.

Douša, M., Hosmanová, R. (2004). *Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 37:373-377.

Drewes, J.E., Heberer, Reddersen, K. (2002). *Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse*. Water Science and Technology, 46 (3): 73-80.

Droste, R.L. (1997). *Theory and practice of water and wastewater treatment*. John Wiley and Sons, Canadá.

Drysdale, G.D., Kasan, H.C., Bux, F. (2000). *Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in a NDBEPR activated sludge system. Proceedings of the 1st World Water Congress of the International Water Association (IWA).* Paris, 3-7 Jul. 3: 108-114.

Eckenfelder, W.W. (1989). *Industrial water pollution control*. Mc Graw Hill.2ª Edición. Madrid.

EEC (1993). Council Regulation No 2309/93 of 22 July 1993 laying down Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and stablishing a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Official Journal L214.

EMEA(1997). Environmental risk assessment for immunological veterinary medicinal products. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK. (Rapport nº CVMP/074/95).

EMEA (2001). Discusión paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organisms (no gmo) containing medicinal products for human use. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK. (Rapport nº CVMP/SWP/4447/oordraft corr.).

EMEA (2003). Note for guidance on environmental risk assessment for products of human use. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK. (Rapport nº CVMP/SWP/4447/oordraft.).

EPA (1993). *Manual nitrogen control*. EPA/625/R-93/010.

European Comission (2002). *Final report: Heavy metals in waste*. Project ENV.E.3/ETU/2000/0058.

Fars, S., Oufdou, K., Nejmeddine, A., Hassani, L., Melloul, A., Bousselhaj, K., Amahmid, O., Bouhoum, K., Lakmichi, H., Mezrioui, N. (2005). Antibiotic resistance and survival of fecal coliforms in activated sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21(4): 493-500.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. (2006). *Ecotoxicology of human pharmaceuticals.* Aquatic Toxicology, 76:122-159.

Fernández-Galiano, D., Guinea, A., Serrano, S., Martín, M., Arregui, L., Rodríguez, B., Campos, I., Calvo, P., Suárez, J. (1996). *Guía práctica de identificación de protozoos ciliados en estaciones depuradoras de aguas residuales por lodos activados en la Comunidad Autónoma de Madrid.* Dpto. Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Fernández, N. (2010). Tesina "Efecto del Tiempo de Retención Hidráulico, el Tiempo de Retención Celular, la Carga Másica y los Antibióticos en una planta depuradora de fangos activados". Universidad de León, Director Eloy Bécares.

Fish, B.J., Carr, G.P.R. (1986). *Pharmacopeial procedure for the determination of tylosin factors by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography. 353: 39-50

Furusawa, N. (2002). *Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent*. Talanta. 59: 155-159.

Gabet, V., Miége, C., Bados, P. (2007). Analysis of estrogens in environmental matrices. Trends in Analytical Chemistry, 26 (11): 1113-1131.

Gao, P., Ding, Y., Li, H., Xagoraraki, I. (2012). *Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes.* Chemosphere. 88: 17-24.

Gallizia, I., McClean, S., Banal, I.M. (2003). *Bacterial biodegradation of phenol and 2,4-dichlorophenol.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78: 959-963.

Garcia-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., Salvadó, V. (2013). *The influence of light exposure, water quality and vegetation on the removal of sulfonamides and tetracyclines: A laboratory-scale study*. Chemosphere. 90: 2297-2302.

Gao, L., Kano, N., Imaizumi, H. (2013). *Concentration and chemical speciation of heavy metals in sludge and removal of metals by bio-surfactants application*. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 7(12): 1188-1202.

Garric, J., Ferrari, B. (2005). *Pharmaceuticals in aquatic ecosystems. Levels of exposure and biological effects: a review.* Revue des Sciences de l'Eau, 18 (3).

Githinji, L.J., Musey, M.K., Ankumah R.O. (2010). *Evaluation of the fate of Ciprofloxacin and Amoxicillin in domestic wastewater*. Water Air and Soil Pollution 219(1): 191-201.

Godwin, W.K., Martin D.T., Johnson, R.N., Kho, B.T. (1984). Determination of degradation products and impurities of amoxicillin capsules using ternary gradient elution high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography. 298: 459-412.

Gómez. J., Mendez. R., Lema, J.M. (1996). *The effect of antibiotics on nitrification processes. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 57/58: 869-875.

Gómez, M. (2008). *Parámetros de control de los procesos de regeneración del agua.* Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Barcelona.

Gómez-Pacheco, C.V., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J., López-Peñalver, J. (2011). *Tetracycline removal from waters by integrated technologies based on ozonation and biodegradation.* Chemical Engineering Journal. 178: 115-121.

Gómez-Pacheco, C.V., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J., López-Peñalver, J. (2012). *Tetracycline degradation in aqueous phase by ultraviolet radiation.* Chemical Engineering Journal. 187: 89-95.

González de la Huebra, M.J., Vincent, U. (2005). *Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 39: 376–398.

Gray, N.F. (1990). *Activated sludge: theory and practice*. Oxford University Press.

Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A. (2006). *Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid*. Chemosphere. 66: 1494-1501.

Gutiérrez-Navarro, P., El Bekkouri, A., Rodríguez-Reinoso, E. (1998). *Spectrofluorimetric study of the degradation of α-amino β-lactam antibiotics catalyzed by metal ions in methanol*. Analyst. 123(11): 2263-2266.

Gutiérrez-Navarro, P., Hernández, I., Quintero, B., Martínez-de las Parras, P., Martínez, M., Marquez, A. (2003). *Penicillin degradation catalyzed by Zn (II) ions in metanol*. International Journal of Biological Macromolecules. 33(3-5): 159-166.

Haddad, T.m Baginska, E., Kuemmerer, K. (2015). *Transformation products of antibiotic and cytostatic drugs in the aquatic cycle that result from effluent treatment and abiotic/biotic reactions in the environment: An increasing challenge calling for higher emphasis on measures at the beginning of the pipe*. (2015). Water Research. 72: 75-126.

Haller, M.Y., Muller, S.R., McArdell, C.S., Alder, A., Suter, M.J. (2002). *Quantification of veterinary antibiotics (sulphonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*. (2002). Journal of Chromatography A. 952(1-2): 11-120.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H., Jørgesen, S.E. (1998). *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment.* Chemosphere (2): 357-393.

Halling-Sørensen, B. (2001). *Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents.* Arch. Environ. Contam. Toxicol, 40.

Hamscher, G. (2006). *Veterinary Pharmaceuticals, Organic Pollutants in the Water Cycle. Properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*. Edited by Thorsten Reemtsma and Martin Jekel. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. Weinheim: 99-120.

Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C. (1998). *Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors*. Trends in Analytical Chemistry, 17: 448-451.

Heberer, T. (2002). *Occurrence, fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment, a review*. Toxicol. Lett., 131:5.

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D. (2005). *Toxicity assays applied to wastewater treatment.* Talanta, 65: 358-366.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The science of the total environment, 225: 109-118.

Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher, G. (2002). *Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden*. Bodenschutz. 4/2002: 141-148.

Höper, H., Kues, J., Hamscher, G., Sczesny, S., Nau, H. (2002). *Detection of veterinary pharmaceuticals in soil fertilized with liquid manure.* Landwirtschaft in Mittel- und Osteuropaeischen Laendern: Potenziale und deren Nutzung, Part 2. 57: 747-752.

Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y. (2010). *Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China.* Environmental Pollution. 158: 2992-2998.

Huang, K., Liu, H., Zhang, H., Zhao, J., Wei, M., Wang, M., Ye, C. (2014). *Effects of land utilization of sludge compost on wheat and the risk of heavy metals.* Biomedical Engineering and Environmental Engineering. 447-454.

Ibáñez, M., Sancho, J.V., Pozo, O.J., Hernández, F. (2006). Estrategias analíticas para la determinación de plaguicidas en aguas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Cromatografía y Técnicas Afines, 27 (2): 51-64.

ICH Q2(R1). (1996). Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Guideline.

Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. (2001). *Biodegradability of metronidazole, olaquindox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil manure slurries*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 48 (3): 311-320.

Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Hansen, S.H. (2004). *Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 1038: 157–170.

Jenkins, D, Richard, M.G., Deigger, G.T. (1993).*Manual on the causes and control of activated sludge bulking.* Lewis Publishers. Chelsea.

Jones, A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2004). *Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment.* Critical Reviews in Toxicology, 34: 335-250.

Jørgesen, S.E., Halling-Sørensen, B. (2000). *Drugs in the environment.* Chemosphere, 40: 691-699.

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffman, B., Siegrist, H. (2006). *Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme*. Water Research, 40: 1686-1696.

Kakimoto, T., Funamizu, N. (2007). *Factors affecting the degradation of amoxicillin in composting toilet.* Chemosphere, 66: 2219-2224.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2009). *The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters*. Water Research, 43: 363-380.

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall A.B.A. (2005). *Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land*. Chemosphere.

Keither, L.H., Telliard, W.A. (1979). *Priority pollutants. A perspective view.* Environ.Sci. Technol., 13: 416-423.

Kemper, N. (2008). *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators*, 8: 1-13.

Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J.N., Weber, A.S., Aga, D.S. (2005). *Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solids retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process*. Environmental Science and Technology. 39: 5816–5823.

Kimura, K., Hara, H., Watanabe, Y. (2007). *Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sludge system and membrane bioreactors.* Environ. Sci. Technol., 41: 3708-3714.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.A.T. (2002). *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance.* Environ. Sci.Technol, 36: 1202-1211.

Kolz, A.C., Ong, S.K., Moorman, T.B. (2005b). *Sorption of tylosin onto swine manure.* Chemosphere, 60: 284-289.

Kolz, A.C., Moorman, T.B., Ong, S.K., Scoggin, K.D., Douglass, E.A. (2005). *Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons.* Water Environment Research, 77 (1): 49-56.

Kraigher, B., Kosjek, T., Heath, E., Kompore, B., Mandic-Mulec, I. (2008). *Influence or pharmaceutical residues on the structure or activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. Water Research. 42:* 4758-4788.

Kumar, K., Thompsom, A., Singh, A.K., Chander, Gupta, S.C. (2004). *Enzyme-linked immunosorbent assay for ultra trace determination of antibiotics in aqueous samokes*. Journal of Environmental Quality, 33: 250-256.

Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, K.S., Chander, Y., Rosen, C.J. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. Journal of Environmental Quality, 34: 2082-2086.

Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000). *Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test.* Chemosphere, 40: 701-710.

Kümmerer, K. (2001). *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disisnfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review.* Chemosphere, 45: 957-969.

Kümmerer, K. (ed.) (2004). *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risk*. Springer. Berlín.

Kümmerer, K. (2004b). *Resistance in the environment*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54: 311–320.

Kuster, M., López de Alda, M.J., Barceló, D. (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. Trends in Analytical Chemistry, 23: 790-798.

Larsen, T.A., Lienert, J., Joss, A., Siegrist, H. (2004). *How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment.* Journal of Biotechnology, 113: 295-304.

Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Petterson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E., Förlin, L. (1999). *Ethinyl-Estradiol – an undesired fish contraceptive?.* Aquatic Toxicology, 45: 91-97.

Lee, N. M. (1996). *Parameters affecting microorganism and the process performance in biological wastewater treatment.* Thesis. Dpt. Biotechnology. Luna University, Suecia.

Lee, H., Lee, E., Lee, C-H., Lee, K. (2011). *Degradation of chlortetracycline and bacterial disinfection in livestock wastewater by ozone-based advanced oxidation*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 17: 468-473.

Lei, H., Chen, K., Li, Y., Li, H., Yu, Q., Zhang, X., Yao, C. (2012). *Electro kinetic recovery of Copper, Nickel and Zinc from wastewater sludge: effects of electrical potentials.* Environmental Engineering Science. 29(6): 472-478.

Lemmer, H., Lind, G., Schade, M., Ziegelmayer, B. (1998). Autecology of scum producing bacteria. Water Science Technology, 37 (4-5): 527-530.

Lence, S. (2005). *What can the United States learn from Spain's pork sector? Implications from a comparative economic analysis*. MATRIC. Research Paper 05-MRP 12. Available on the web site: www.matric.iastate.edu

Li, D., Yang, M., Hu, J., Ren, L., Zhang, Y. (2008). *Determination and fate of Oxytetracycline and related compounds in oxytetracyline production wastewater and the receiving river.* Environmental Toxicology and Chemistry. 27: 80–86.

Li, B., Zhang, T. (2010). *Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process*. Environmental Science and Technology. 44: 3468-3473.

Li, B., Zhang, T. (2011). *Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants.* Chemosphere. 83: 1284-1289.

Lin, B., Lyu, J., Lyu, X., Yu, H., Hu, Z., Lam, J.C.W., Lam, P.K.S. (2015). Characterization of cephalexin degradation capabilities of two Pseudomonas strains isolated from activated sludge. Journal of Hazardous Materials. 282: 158-164.

Liu, M., Zhang, Y., Ding, R., Gao, Y., Yang, M. (2013). *Response of activated sludge to the treatment of oxytetracycline production waste stream*. Applied Microbiology and Biotechnology. 97: 8805-8812.

Loke, M.L., Tjørnelund, J., Halling-Sørensen, B. (2002). *Determination of the distribution coefficient (log K_d) of oxytetracycline, tylosin A, olaquindox and metronidazole in manure.* Chemosphere, 48: 351-361.

López de Alda, M.J., Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. Journal of Analytical Chemistry, 371: 437-447.

López-Peñalver, J.J., Sánchez-Polo, M., Gómez-Pacheco, CV., Rivera-Utrilla, J. (2010). *Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/H2O2 oxidation processes.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 85: 1325-1333.

López-Peñalver, J.J., Gómez-Pacheco, C.V., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J. (2013). *Degradation of tetracyclines in different water matrices by advanced oxidation/reduction processes based on gamma radiation.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 88: 1096-1108.

Ma, Y., Wang, L., Liu, L., Zhang, X. (2015). *Biodegradation of tylosin residue in pharmaceutical solid waste by a novel Citrobacter amalonaticus strain.* Environmental Progress & Sustainable. 34(1): 99-104.

Macauley, J., Oiang, Z., Adams, C.D., Surampalli, R., Mormile, M. (2006). *Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone.* Water Research, 40: 2017-2026.

Madoni, P. (1991). *Role of protozoa and their indicator value in the activated sludge process. Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives.* P. Madoni (ed.), Perugia. 21-27.

Malintan, N.T., Mohd, M.A. (2006). *Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine.* Journal of Chromatography A, 1127: 154-160.

Martínez-Carballo. E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O. (2007). *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environmental Pollution. 148: 570-579.

Marx, C., Guenther, N., Schubert, S., Oertel, R., Ahnert, M., Krebs, P., Kuehn, V. (2015). *Mass flow of antibiotics in a wastewater treatment plant focusing on removal variations due to operational parameters*. Science of the Total Environment.

Matia, L., Martín, J., Ventura, F, Campos, C. (1999). *La calidad de recursos no convencionales.* Xarsa temática: Recursos d'aigües. Fundacion Agbar.

Matsché, N., Kreuzinger, N. (1998). *Blähschlamm, schwimmschlamm, schaum-ur-sachenerkennung und Bekämpfung.* Wiener Mitteilungen, 145: 141-177.

Meakins, N.C., Bubb, J.M., Lester, J.N. (1994). *Fate and behaviour of organic micropollutans during wastewater treatment process: a review.* Int. J. Environ. Pollut, 4: 27-58.

Melse, R.W., Verdoes, N. (2005). Evaluation of four farm-scale systems for treatment of liquid pig manure. Biosystems Engineering, 92(1): 47-57.

Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K.L. (2001). *Estimates of antimicrobial abuse in livestock*. UCS Food and Environment Program.

Metcalf & Eddy. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización.* McGraw-Hill/Interamericana de España S.A. Tercera edición. Madrid.

Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koening, B.D., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T. (2001). *The estrogenic potency of chemicals in sewage treatment plan effluents as determined by in vivo assays with the Japanese medaka. Oryzias latipes.* Environ. Toxicol. Chem, 20: 297-308.

Meyer, M.T., Bumgraner, J.E., Varns, J.L., Daughtridge, J.V., Thurman, E.M., Hostetler, K.A. (2000). *Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry*. Science of the Total Environment, 248: 181-187.

Miao, X.S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C.D. (2004). *Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada*. Environ. Sci. Technol., 38: 3533-3541.

Miége, C., Choubert, L., Ribeiro, M., Eusébe, M., Coquery, M. (2009). *Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants-Conception of a database and first results.* Environmental Pollution, 1-6.

Miyata, M., Ihara, I., Yoshid, G., Toyod, K., Umetsu, K. (2011). *Electrochemical oxidation of tetracycline antibiotics using a Ti/IrO2 anode for wastewater treatment of animal husbandry.* Water Science and Technology. 63: 456-61.

Moro, P. P., Fernández, L. G. (1986). *El proceso de depuración en una planta piloto de fangos activados. Dinámica de los parámetros físico-químicos y de las comunidades biológicas*. *Tecnología del Agua. 31:* 56-63.

Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiyama, K., Shinohara, R. (2011). *Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level.* Chemosphere. 84: 432-438.

Mujeriego, R. (1990). *Riego con agua residual municipal regenerada. Manual práctico.* Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. España.

Muñoz de la Peña, A., Mahedero, M.C., Bautista-Sánchez, A. (2003). Monitoring *of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection.* Talanta, 60: 279-285.

Muyima, N.Y., Momba, M.N.B., Cloete, T.E. (1997). B*iological methods for the treatment of wastewaters. Microbial Community Analysis: The key to the design of biological wastewater treatment systems*. Scientific and Technical Report. IAWQ. England.

Nikovskaya, G.N., Kalinichenko, K.V. (2014). *Biotechnological utilization of sediments of municipal wastewaters*. Biotechnologia Acta. 7(3): 21-32.

NORMAN. (2005). *6th EU Framework Programme Project (Network of referent laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants).* Contract number 018486.

Ohlsen, K., Werner, G., Ternes, T., Ziebuhr, W., Witte, W., Hacker, J. (2003). *Impact of antibiotics on conjugational resistance in gene transfer in Staphylococcus aureus in sewage*. Environ. Microbiol., 5: 711-716.

Ohlsen, K., Zieburg, W., Koller, K., Hell, W., Wichelhaus T.A., Hacker, J. (1998). *Effects of sub inhibitory concentrations of antibiotics on alfa-toxon (hla) gene expression of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates.* Antimicrob. Agents Chemother., 42: 2817-2823.

Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., Chen, M. (2011). *Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry.* Journal of Environmental Sciences 23: 1729-1737.

Parody, D.F. (1997). *Microorganismos filamentosos. Microorganismos filamentosos en el fango activado*. EMASESA. Ayuntamiento de Sevilla, 23-95.

Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Orriols, A., Miñarro, M., Ticó, J.R., Suñé-Negre, J.M. (2006). *Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis.42: 192-199.

Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D. (2002). *Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples.* Journal of Chromatography A, 974: 23-51.

Petrovic, M., González, S., Barceló, D. (2003). *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water.* Trends in Analytical Chemistry, 22: 685-696.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Groot, B.I., Friis, C., Jones, R., Nightingale, G., Prseton, R., Waddell, J. (2004). *Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health?*. A critical review of published data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53: 28-52.

POSEIDON Project. (2005). *Removal of pharmaceuticals and personal care products: results of the POSEIDON Project.* WEFTEC. Water Environment Federation.

Prado, N., Ochoa, J., Audic, J.L., Amrane, A., Meinhold, J. (2007). *Semi-industrial-scale process for dilute swine wastewater treatment using a submerged membrane bioreactor (MBR) with direct reuse of treated water.* International Journal of Chemical Reactor Engineering. 5: 44–45.

Prado, N., Ochoa, J., Amrane, A. (2009). *Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor*. Bioresource Technology. 100: 3769–3774.

Qiao, M., Chen, W., Su, J., Zhang, B., Zhang, C. (2012). *Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China.* Journal of Environmental Sciences. 24: 1047-1052.

Radjenovic, E., Petrovic, M., Barceló, D. (2007). *Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor*. Anal. Bioanal. Chem., 387: 1365-1377.

Radjenovic, E., Petrovic, M., Barceló, D. (2009). *Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment.* Water Research, 43: 831-841.

Ramalho. R.S. (1993). *Tratamiento de aguas residuales*. Ed Reverté. 2ª ed. Barcelona.

Ran, J. (2013). *The removal of heavy metals in sludge using Chlorphytum comosum and Geranium.* Hunan Huanjing Shengwu Zhiye Jishu Xueyuan Xuebao. 19(3): 9-14.

Ratasuk, N., Boonsaner, M., Hawker, DW. (2012). *Effect of temperature, pH and illumination on abiotic degradation of oxytetracycline in sterilized swine manure.* Journal of Environmental Science and Health. Part A 47: 1687–1694.

Reemtsma, T., Jekel, M. (2006).*Organic pollutants in the water cycle: properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*. Wiley-VCH. Water Chemical Society. Weinheim. Alemania.

Reinoso, R., Bécares, E. (2008). *The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants*. Bioresource Technology, 99 (14): 6661-6665.

Riaño, B., García-González, MC. (2014). *On-farm treatment of swine manure based on solid-liquid separation and biological nitrification-denitrification of the liquid fraction.* Journal of Environmental Management. 132: 87-93.

Rittman B.E., McCarty P. (2001). *Biotecnología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones.* Mc Graw Hill.1ª Edición. Madrid.

Rius, M.M. (2003). *Caracterización del proceso de depuración de aguas residuales y dinámica de las comunidades de microorganismos en plantas de tipo SBR*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Rodríguez-Sánchez, A., González-Martínez, A., Martínez-Toledo, M.V., García-Ruíz, M.J., Osorio, F., González-López, J. (2014). *The effect of influent characteristics and*

operational conditions over the performance and microbial community structure of partial nitritation reactors. Water. 6(7): 1905-1924.

Ronzano, E., Dapena, J.L. (1995). *Tratamiento biológico de las aguas residuales*. Díaz de Santos. Madrid.

Salgot, M., Tapias, J.C. (1999). *Aguas superficiales.* Xarsa temática: Recursos d'aigües. Fundación Agbar.

Salmiati, S., Mohd, R., Ujang, Z., Azman, S. (2012). *Potential of sewage sludge as soil amendment.* International Proceedings of Chemical Biological & Environmental. 35: 66-70.

Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M., Li, L.Y. (1995). *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. Microbial. Review, 59: 579-590.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. (2006). *A global perspective in the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment.* Chemosphere. 65: 725–759.

Schleenstein, G. (2002). *Muestra de trabajo, el proceso de lodos activados y el problema del bulking.* Berlín.

Schmidt, S., Winter, J., Gallert, C. (2012). *Long-term effects of antibiotics on the elimination of chemical oxygen demand, nitrification and viable bacteria in laboratory-scale wastewater treatment plants*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 63(3): 354-364.

Schwaiger, K., Harms, K., Hölzel, C., Meyer, K., Karl, M., Baue, J. (2009). *Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes tet (M) and tet (L) in Enterococcus faecalis*. Veterinary Microbiology. 139: 386-392.

Sedlak, R. (1991). *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice.* 20 ed. Lewis Publishers. New York.

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maak, G., Pascoe, D., Schäfers, Ch., Vanderbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A. (2003). *Identification of endocrine disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA Projects.* Ecotox. Environ. Safety, 54: 302-314.

Seoanez, M. (1999). *Aguas residuales urbanas. Tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento.* Mundiprensa. 2ª Ed. Colección Ingeniería Ambiental.

SERVIMA. (2000). *León Ecosistema urbano*. Eds. Ayuntamiento de León y Junta de Castilla y León.

Spencer, P. (2005). *The biological basis of wastewater treatment*. Strathkelvin Instruments.

Su, M., Cao, H., Cheng, X., Cai, Y., Zhang, L. (2014). *Comparison of different digestion methods for analyzing heavy metals content in sludge*. Huaxue Yanjiu. 25(5): 492-496.

Suárez, S. (2004). *Master Thesis*. Universidad de Santiago de Compostela.

Sunderland, J., Lovering A.M., Tobin, C.M., Mac Gowan, A.P., Roe J.M., Delsol A.A. (2003). *Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57: 135-137.

Stumm, W., Morgan, J.J. (1996). *Aquatic Chemistry—Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. Third ed. Wiley-Interscience, New York.

Tavakoli N., Varshosaz, J., Dorkoosh, F., Zargarzadeh, M.R. (2007*). Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 43: 325–329

Teeter, J.S., Meyerhoff. R.D. (2002). *Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken and swine excreta*. Environmental research 93: 45-51.

Teixidó, M., Granados, M., Prat M.D., Beltran, J.L. (2012). *Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction.* Environmental science and pollution research. 19(8): 3087- 3095.

Ternes, T.A. (1998). *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Research, 32: 3245-3260.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Smidt, T. (2001). *Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 938 (1-2): 175-185.

Thompson, T.S., Pernal S.F., Noot, D.K. (2007). *Degradation of incurred tylosin to desmycosin—Implications for residue analysis of honey*. Analytica Chimica Acta 586: 304–311

Tolls, T. (2001). *Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review*. Environ. Sci. Technol, 35: 3397-3406.

Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K. (2009). *Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS.* Chemosphere. 74: 1090-1097.

Tong, Z.L., Liu, Y.L., Hu, Z.H., Yuan, S.J. (2012). *Anaerobic digestion of animal manure contaminated by tetracyclines.* Huan Jing Ke Xue. 33: 1028-32.

Tyler, C.R., Jobling, S.R., Sumpter, J.P. (1998). Endocrine Disruption in wildlife: a critical review of the evidence. Critical Reviews in Toxicology, 28 (4): 319-361.

Tylová, T., Olšovská, J., Novák, P., Fliege, M. (2010). *High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection.* Chemosphere. 78 Issue 4: 353-359.

Tytla, M., Widziewicz, K., Zielewicz, E. (2015). *Heavy metals and its chemical speciation of in sewage sludge at different stages of its processing*. Environmental technology. 1-22.

Uslu, M.O., Balcıoğlu, I.A. (2009). *Comparison of the ozonation and Fenton process performances for the treatment of antibiotic containing manure.* Science of the Total Environment. 407: 3450–3458.

Varel, V.H., Wells, J.E., Shelver, W.L., Rice, C.P., Armstrong, D.L., Parker, D.B. (2012). *Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure.* Journal of Applied Microbiology. 112: 705–715.

Viancelli, A., Kunz, A., Steinmetz, RLR., Kich, JD., Souza, CK., Canal, CW., Coldebella, A., Esteves, PA., Barardi, CRM. (2013). *Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens*. Chemosphere. 90: 1539-1544.

Wang, C., Wang Y., Kiefer. F., Yediler, A., Zijian, W., Kettrup, A. (2002). *Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant*. Ecotoxicology and Environmental Safety.

Wanner, J. (1998). *Begining of the activated sludge*. Activated Sludge Pages. Nº1. http://scitrav.com/wwater/asp1/begin.htm

Watkinson, A.J., Murby, E., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D. (2009). *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water*. Science of the Total Environment, 407: 2711-2723.

Webb, K.E.J., Fontenot, J.P. (1975). *Medicinal drug residues in broiler litter and tissues from cattle fed litter*. Journal of animal Science, 42(4): 1212-1217.

Westerman, P.W., Bicudo J.R., Kantardjieff, A. (2000). *Up flow biological aerated filters for the treatment of flushed swine manure.* Bioresource Technology, 74: 181-190.

WHO. (2002). *Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark*. Document WHO/CDS/CPE/ZPK/2003.1. World Health Organization.

Winkler, M.A. (1998). *Tratamiento biológico de aguas de desecho*. Limusa S.A. Eds. México D.F.

Wise, R. (2002). *Antimicrobial resistance: priorities for action.* Journal Antimicrob. Chemoth., 49: 585-586.

Wu, X., Wei, Y., Zheng, J., Zhao, X., Zhong, W. (2011). *The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting.* Bioresource Technology. 102: 5924-5931.

Yang, S., Cha, J., Carlson, K. (2005). *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 1097: 40–53

Yang, F., Zhang, M., Zhou, A., Lin, M, Wei, B. (2014). *Research on immobilization of heavy metals in sludge by pyrolysis*. Advanced Materials Research. 1745-1749.

Youssef, M.K., Kassem, A.A. (1971). *Pyrocatechuic acid and gentisic acid-tetracycline complexes. Their solubility and stability*. Bulletin of the Faculty of Pharmacy. 9(1): 1-10.

Zafra, A., del Olmo, M., Suárez, B., Hontoria, E., Navalón, A., Vílchez, J.L. (2003). *Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater.* Water Research. 37: 735-742.

Zhang, Q-Q., Ying, G-G., Pan, C-G., Liu, Y-S., Zhao, J-L. (2015). Comprehensive evaluation of antibiotics emission fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling and linkage to bacterial resistance. Environmental Science and & Technology. 49(11): 6772-6782.

Zhao, L., Dong, Y.H., Wang, H. (2010). *Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China.* Science of the Total Environment. 408: 1069-1075.

Zhou, L.J., Ying, G-G., Liu, S., Zhao, J-L., Yang, B., Chen, Z-F., Lai, H-J. (2013). *Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China*. Science of the Total Environment. 452–453, 365–376.

Zuccato, E, Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rosseti., Calamari., D. (2006). P*harmaceuticals in the environment in Italy: causes,*

occurrence, effects and control. Environmental Science and Pollution Research, 13 (1): 15-21.

Zwiener, C., Frimmel, F.H. (2004). *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology a critical review part II: applications for emerging contaminants and related pollutans, microorganisms and humic acids.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378: 862-874.

Referencias Web:

https://scifinder.cas.org; http://www.geocities.com (Santos, J.A.); http://www.norman-network.net; http://www.saleal.es

DEPARTAMENTO: QUÍMICA Y FÍSICA APLICADAS

ÁREA: QUÍMICA-FÍSICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: ECOLOGÍA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Tesis Doctoral

Nuria Montes de Campo