



**UNIVERSITAT
JAUME I**



**Institut Universitari
de Plaguicides
i Aigües**

“Avances en la investigación de fármacos en aguas residuales: 1) Estudio de la presencia de antibióticos y posibles resistencias antimicrobianas generadas, 2) Aplicación de procesos avanzados de tratamiento de las aguas residuales para la eliminación de fármacos”

**Proyecto de investigación aplicada a los Recursos
Hídricos en la Comunidad Valenciana
Ejercicio 2022**

**Financiado por la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural,
Emergencia Climática y Transición Ecológica.**

INFORME FINAL, NOVIEMBRE 2022

Elena Pitarch Arquimbau

EQUIPO DE TRABAJO

Dra. Elena Pitarch Arquimbau

Profesora Titular de Universidad de Química Analítica, IUPA, UJI, Investigadora responsable del proyecto

Dr. Félix Hernández Hernández

Catedrático de Química Analítica, IUPA, UJI

Dr. Lubertus Bijlsma

Investigador contratado doctor, IUPA, UJI

Dra. María Ibáñez Martínez

Profesora Titular de Universidad de Química Analítica, IUPA, UJI

Claudia Simarro Gimeno

Personal investigador pre-doctoral, IUPA, UJI

Dra. Rosa de Llanos Frutos

Investigadora contratada doctora, Unidad Predepartamental de Medicina, UJI

Dr. Javier Navarro Laboulais

Catedrático de Ingeniería Química y Nuclear, ITQ, UPV

Dr. Antonio Chica Lara

Científico Titular, ITQ, UPV

Isabel Vidal Barreiro

Personal investigador pre-doctoral, ITQ, UPV

Contratadas con cargo al convenio

Elisa Gracia Marín

María Mata Pesquera

Marina Puerta Rodríguez

INDICE

- 1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**
- 2. SEGUIMIENTO DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PROVINCIA DE CASTELLÓN**
 - 2.1. Toma de muestras**
 - 2.2. Determinación cuantitativa de los fármacos mediante LC-MS/MS**
 - 2.3. Variación estacional de fármacos en las EDARES**
 - 2.4. Eficacia de eliminación de fármacos en las EDARES**
- 3. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE SALIDA TRAS APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS AVANZADOS**
 - 3.1. Aplicación de ozonización catalítica en agua fortificada**
 - 3.2. Seguimiento cuantitativo de la eliminación de fármacos en agua residual**
- 4. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN LAS AGUAS RESIDUALES**
 - 4.1. Detección y cuantificación de los GRA mediante PCR cuantitativa**
 - 4.2. Caracterización microbiana de las aguas residuales**
- 5. BIBLIOGRAFÍA**

Anexo 1.- Metodología analítica para fármacos. Metodología tratamientos avanzados con ozonización catalítica. Metodología resistencia a antibióticos

1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la presencia de productos farmacéuticos en el medio acuático ha ido ganando interés debido a su amplio y creciente uso, así como a su frecuente detección en el ciclo del agua (Bellver-Domingo et al., 2019). Aunque los fármacos pueden llegar al medio acuático a través de diferentes vías, la baja eficacia de eliminación de la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) convencionales es una de las razones principales de su presencia en las aguas superficiales receptoras a través de los efluentes tratados (Botero-Coy et al., 2018; Fonseca et al., 2020; Bijlsma et al., 2021; López et al., 2022). Varios trabajos han destacado la necesidad de mejorar el tratamiento aplicado en las EDAR, empleando procesos de tratamiento terciario adicionales (Sousa et al., 2018).

En la mayoría de los municipios, las aguas residuales son vertidas a ríos y lagos con un tratamiento deficiente, provocando una importante contaminación del medio acuático (Singh, 2021). Actualmente se exploran varias tecnologías de tratamiento para eliminar de manera eficiente los contaminantes orgánicos y patógenos específicos de los efluentes. Así, se han aplicado diferentes procesos de oxidación avanzada (POA) para la eliminación de estos contaminantes en aguas residuales (Giwa et al., 2021). Una tecnología muy eficaz para la eliminación de un amplio espectro de contaminantes emergentes es la oxidación química mediante el uso de ozono, ya sea directa o indirectamente (Derco et al., 2021). Desde el punto de vista de la ingeniería de procesos, la ozonización se encuentra entre los métodos más competitivos para el tratamiento de grandes volúmenes de agua de EDAR (Ferré-Aracil et al., 2016). Desde un punto de vista químico, el ozono tiene la ventaja de poder reaccionar directamente a través de radicales modificando el pH, utilizando reactivos como H₂O₂ (proceso de peroxona) o catalizadores. La ozonización catalítica permite una oxidación efectiva con un amplio número de aplicaciones (Wang y Chen, 2020). La principal ventaja de este proceso catalítico es la completa mineralización de la materia orgánica que no se puede oxidar directamente con el ozono.

Dentro de los productos farmacéuticos, los antibióticos son sin duda uno de los descubrimientos de mayor relevancia en la historia de la humanidad. Sin embargo, esta gran efectividad ha sido también el origen de su declive, ya que durante décadas se ha producido un uso desmesurado e inadecuado de los antimicrobianos, lo cual ha promovido la evolución de la resistencia a antimicrobianos en los microorganismos. De hecho, las bacterias resistentes a antibióticos representan uno de los principales problemas actuales de salud pública y predicciones recientes indican que pronto se convertirán en la primera causa de mortalidad a nivel mundial. Debido a

la repercusión mundial de estos microorganismos en hospitales, así como su impacto en medicina veterinaria, seguridad alimentaria y el medioambiente, se requieren de esfuerzos y acciones locales, nacionales y mundiales para evitar su propagación. Con todo ello, hoy en día esta problemática se estudia desde una perspectiva integral bajo el enfoque de la organización Mundial de la Salud denominado “One Health” o “Única salud”. Dentro de este enfoque global, el medioambiente juega un papel fundamental tanto en la dispersión de los microorganismos resistentes a antimicrobianos (MRA) así como en la generación de éstos (Buelow et al., 2020). En este sentido las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas se encuentran entre los receptores y fuentes más importantes de MRA ambiental. Por tanto, se espera que los afluentes de las EDAR reflejen, al menos en parte, el resistoma de la población humana de cada EDAR, incluida la presencia de MRA, genes de resistencia a antibióticos (GRA) y elementos genéticos móviles asociados (Pärnänen et al., 2019).

La problemática abordada en la presente investigación (anualidad 2022) pretende ser una continuación del proyecto “Investigación de antibióticos en aguas residuales de la provincia de Castellón: detección, eficiencia de eliminación en las EDAR, impacto ambiental y resistencia antimicrobiana” codirigido por el Dr. Félix Hernández y la Dra. Elena Pitarch en 2021 y enmarcado en el convenio entre la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural y la Universitat Jaume I. En este sentido, el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) tiene capacidad demostrada, a través de sus investigaciones, publicaciones y proyectos, para abordar esta problemática, tanto en su vertiente puramente analítica, basada en el uso de acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas, como en los aspectos medioambientales. Asimismo, en los últimos años, el IUPA ha llevado a cabo proyectos de investigación en los que se ha abordado esta problemática “Estrategias analíticas para el control de contaminantes emergentes y evaluación de la eficiencia de eliminación en procesos avanzados de oxidación en aguas residuales” (Dr. Félix Hernández, 2019-2021, MINECO, RTI2018-097417-B-I00) y “Estrategias analíticas avanzadas para el control y evaluación de contaminantes emergentes en aguas de riego” (Dra. Elena Pitarch, 2019-2020, UJI-B2018-55). Además, el IUPA ha participado en un proyecto internacional COLCIENCIAS “Remoción de antibióticos y bacterias resistentes en aguas residuales hospitalarias empleando tecnologías avanzadas de oxidación” (2019-2021) en colaboración con la Universidad de Antioquía (Medellín, Colombia) y con el Instituto de Tecnología Química (ITQ) de la Universitat Politècnica de València.

Uno de los objetivos principales de este proyecto ha sido realizar **un seguimiento de los niveles de concentración de los productos farmacéuticos en las aguas residuales de la provincia de Castelló** para conocer la situación actual de las EDARES. Para ello se han seleccionado tres municipios (Castelló, Borriana y Alcora) para **investigar la presencia de alrededor de 40 fármacos** ampliamente utilizados, entre los que se han incluido **16 antibióticos**. La determinación analítica se ha llevado a cabo utilizando metodología analítica basada en el acoplamiento cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) desarrollada en la anualidad anterior y que permite determinar con fiabilidad niveles de concentración extremadamente bajos en las aguas. La realización de los muestreos de las aguas residuales en tres diferentes épocas del año ha permitido obtener conclusiones sobre **la existencia de una variación estacional**. Adicionalmente, con los análisis realizados en las aguas de entrada y salida de las tres EDARES, se ha podido estudiar la **eficiencia de eliminación de la planta para los fármacos estudiados**.

Por otra parte, y como muestra de la interdisciplinariedad del proyecto, se ha llevado a cabo un **estudio de degradación y/o eliminación de fármacos en las aguas residuales de salida de la EDAR utilizando diferentes tratamientos avanzados con ozonización catalítica**. Esta parte del estudio se realizó en colaboración con el ITQ de la UPV. La aplicación de catalizadores basados en **zeolitas Y junto con el ozono**, ha permitido el seguimiento cuantitativo mediante LC-MS/MS de la eliminación de fármacos, tanto en aguas fortificadas como en aguas residuales de salida de la EDAR de Castelló.

Finalmente, y una vez más en colaboración con otro grupo de investigación de la UJI, la Unidad Predepartamental de Medicina, se ha seguido con la línea de **resistencias a antibióticos en aguas residuales** que se empezó, de manera preliminar, durante la anualidad 2021 y que, durante el 2022 se ha visto ampliada y afianzada. Se ha llevado a cabo una **extracción de ADN de las aguas residuales**, y una posterior **detección y cuantificación de los GRA** (qnrS, blaTEM, sul1, blaCTX -M-32, blaOXA-58, tet, int1 y 16S rRNA) mediante PCR cuantitativa (qPCR). Finalmente, algunas muestras de aguas residuales han sido seleccionadas para la **caracterización microbiana para evaluar la presencia de coliformes y enterococos** totales, así como la población de ambos grupos bacterianos, resistentes a tetraciclina y ciprofloxacina.

Cabe destacar que el proyecto realizado es amplio y complejo, que además de requerir aplicación de metodología analítica sofisticada, ha involucrado a varios investigadores de distintas disciplinas y centros de investigación. Como aspecto relevante, cabe destacar el elemento innovador y distintivo, como es la aplicación de técnicas de oxidación avanzada

mediante el uso de la ozonización catalítica para la eliminación de fármacos en aguas residuales y que puede ser el punto de partida para la reutilización de estas aguas en una etapa posterior. Además, el seguimiento de datos encontrados en las aguas residuales en tres EDARES de la provincia de Castelló, tanto a nivel de concentración de fármacos como de resistencias antimicrobianas, se debería realizar a lo largo de varios años para poder alcanzar conclusiones suficientemente soportadas y concluyentes, e implementar sistemas de vigilancia capaces de determinar la prevalencia de la resistencia de la población.

Los resultados más relevantes obtenidos en el marco de este trabajo se enviarán para su publicación en revistas especializadas y se presentarán en congreso y reuniones científicas, en el marco de la **difusión pública** que debe tener toda investigación.

Para la realización del estudio se ha contado con la colaboración inestimable de FACSA, empresa operadora de la EDAR de Castelló, que ha suministrado las muestras de agua residual y ha facilitado los datos necesarios para los cálculos de cargas diarias de fármacos en las aguas. Además, la toma de muestras de las aguas residuales ha sido autorizada por la Dirección de Servicios Urbanos, Infraestructuras y Sostenibilidad del Ayuntamiento de Castelló.

2. SEGUIMIENTO DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PROVINCIA DE CASTELLÓN

2.1. Toma de muestras

El presente estudio se ha focalizado en tres EDARES de la provincia de Castelló (Castelló, Borriana y Alcora). Se han llevado a cabo tres muestreos de agua residual (tanto de entrada como de salida) de una semana en tres estaciones diferentes (mayo, julio y septiembre de 2022). En total, se tomaron 126 muestras compuestas de 24 h, que correspondieron a 63 muestras de agua de entrada (influyente) y otras 63 de agua de salida (efluente). El muestreo fue realizado por personal de la planta y refrigeradas inmediatamente en la misma planta. Posteriormente, las muestras fueron recogidas por personal del IUPA y recepcionadas en el laboratorio en buen estado. En el caso de no poder realizar los análisis inmediatamente, se guardaron en las instalaciones del IUPA en congelador a temperatura inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de los análisis.

Finalmente, de entre todas las muestras recogidas, se analizaron cuatro muestras (2 de influyente y 2 de efluente) en cada muestreo y por cada EDAR. En la **Tabla 2.1** se indican las diferentes muestras analizadas, las fechas de muestreo y sus códigos de identificación, así como el caudal de entrada y de salida del día del muestreo.

Tabla 2.1. Muestreos de agua residual de entrada y de salida de las tres EDARES de la provincia de Castelló

EDAR	Muestreo	Muestras de entrada a la EDAR				Muestras de salida de la EDAR			
		Fecha	Día	Código muestra	Caudal de entrada (m ³ /d)	Fecha	Día	Código muestra	Caudal de salida (m ³ /d)
CASTELLÓ	Mayo	15/05/2022	Domingo	CS-I-004	35374	16/05/2022	Lunes	CS-E-005	36167
		16/05/2022	Lunes	CS-I-005	36167	17/05/2022	Martes	CS-E-006	41564
	Julio	09/07/2022	Sábado	CS-I-011	36796	10/07/2022	Domingo	CS-E-012	35442
		10/07/2022	Domingo	CS-I-012	35442	11/07/2022	Lunes	CS-E-013	32846
	Septiembre	24/09/2022	Sábado	CS-I-018	35120	25/09/2022	Domingo	CS-E-019	33604
		25/09/2022	Domingo	CS-I-019	33604	26/09/2022	Lunes	CS-E-020	33602
BORRIANA	Mayo	15/05/2022	Domingo	BU-I-004	9200	16/05/2022	Lunes	BU-E-005	10320
		16/05/2022	Lunes	BU-I-005	10320	17/05/2022	Martes	BU-E-006	9495
	Julio	09/07/2022	Sábado	BU-I-011	13400	10/07/2022	Domingo	BU-E-012	11828
		10/07/2022	Domingo	BU-I-012	11612	11/07/2022	Lunes	BU-E-013	12582
	Septiembre	24/09/2022	Sábado	BU-I-018	11200	25/09/2022	Domingo	BU-E-019	13362
		25/09/2022	Domingo	BU-I-019	13257	26/09/2022	Lunes	BU-E-020	15042
ALCORA	Mayo	17/05/2022	Martes	AL-I-004	1523	18/05/2022	Miércoles	AL-E-005	1457
		18/05/2022	Miércoles	AL-I-005	1530	19/05/2022	Jueves	AL-E-006	1629
	Julio	09/07/2022	Sábado	AL-I-011	1124	10/07/2022	Domingo	AL-E-012	926
		10/07/2022	Domingo	AL-I-012	971	11/07/2022	Lunes	AL-E-013	1107
	Septiembre	24/09/2022	Sábado	AL-I-018	1312	25/09/2022	Domingo	AL-E-019	1206
		25/09/2022	Domingo	AL-I-019	1269	26/09/2022	Lunes	AL-E-020	1499

2.2. Determinación cuantitativa de los fármacos mediante LC-MS/MS

Metodología analítica

Con el fin de aportar información de interés sobre la presencia de medicamentos de diversas familias en las aguas residuales, el principal objetivo del presente estudio ha sido la determinación de unos 40 fármacos (ver **Tabla A1** en el **Anexo 1**) seleccionados sobre la base de nuestra experiencia en análisis de aguas residuales y del proyecto Conselleria anualidad 2021. De entre los compuestos seleccionados, existe un grupo de 16 compuestos pertenecientes a la familia de los antibióticos.

El análisis cuantitativo de las muestras se ha llevado a cabo mediante la aplicación de metodología analítica basada en la técnica de cromatografía líquida de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), en modo de trabajo *Selected Reaction Monitoring* (SRM). En el **Anexo 1** de este Informe, se describe el método analítico aplicado.

En cada secuencia de análisis se han inyectado tanto las muestras como los controles de calidad (QC) entre dos curvas de calibrado, utilizando las respuestas medias de los calibrados para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos. Dicha cuantificación se ha realizado mediante calibración externa, o mediante el método de calibrado de patrón interno en aquellos casos en los que se dispone de patrón interno marcado isotópicamente (ILIS). Para cada compuesto, se ha adquirido una transición de cuantificación (Q) y dos transiciones de confirmación (q_1 , q_2). Se ha dado como positivo un compuesto solamente cuando se han cumplido los criterios de confirmación de la identidad (SANTE/11813/2017). Es decir, cuando, además de coincidir el tiempo de retención con el patrón/patrón interno, con una tolerancia máxima de ± 0.1 min, al menos una de las relaciones de intensidad (q_1/Q , q_2/Q) se desvía menos del $\pm 30\%$ con respecto al patrón de referencia (como valor medio del calibrado).

Controles de Calidad de los análisis

En este trabajo, se ha prestado especial atención al control de calidad de los análisis con el fin de asegurar la fiabilidad de los resultados. Los bajos niveles de concentración de los compuestos analizados y la complejidad de la matriz de las muestras, hacen que este tipo de determinaciones sea problemático, por lo que el control de calidad adquiere especial importancia. Se ha llevado a cabo mediante el análisis de muestras control (Quality Control, QC), incluidas en cada secuencia analítica.

Los QC se prepararon a partir de muestras de agua de influente y de efluente analizadas y fortificadas a tres niveles de concentración (100, 1000 y 5000 ng L⁻¹) con los fármacos objeto de estudio. En el campo del análisis de residuos se consideran aceptables las recuperaciones individuales de QCs en el rango entre 60 y 140% (SANTE, 2019). Cuando las recuperaciones para los QC se encontraron fuera de este rango, las concentraciones obtenidas se corrigieron en función de la recuperación media de las muestras QC inyectadas en la secuencia, siempre y cuando se observase una cierta robustez en los resultados obtenidos para dichas recuperaciones fuera de rango.

La **Tabla 2.2** muestra los valores medios de recuperación de los QC obtenidos en el análisis de fármacos en las aguas residuales de entrada y de salida de las EDARES. Las recuperaciones medias de los QCs fueron satisfactorias (entre 60-140%) para la mayoría de los compuestos, a excepción de tetracycline cuyos valores fueron mayores del 140% para el QC al nivel bajo en las dos muestras. De todas maneras, no necesitó de ninguna corrección en muestra ya que tetracycline no fue detectado en ninguna de ellas. Para otros casos (acetaminophen, valsartan y OD venlafaxine), especialmente al nivel más bajo de concentración, no se pudieron calcular las recuperaciones como consecuencia de la elevada concentración de estos compuestos en las muestras “blanco” utilizadas para su preparación. Esto hizo que apenas se notase la adición de una pequeña cantidad de patrón, y que no pudiera, por tanto, calcularse su recuperación.

Tabla 2.2. Recuperaciones medias (%) de los QCs de los fármacos analizados en las aguas

	Aguas de entrada			Aguas de salida		
	QC100	QC1000	QC5000	QC100	QC1000	QC5000
Acetaminophen*	a	77	91	85	93	88
Alprazolam	70	84	74	82	94	87
Atorvastatin*	93	91	89	90	97	100
Carbamazepine*	135	106	109	100	117	91
Ciprofloxacin*	97	80	90	83	84	96
Clarithromycin*	65	79	96	71	87	98
Clindamycin	109	108	91	103	110	108
Diclofenac*	89	106	110	110	108	96
Enalapril*	95	97	98	107	101	97
Erithromycin*	85	70	89	60	82	98
Flumequine*	99	99	96	104	103	94
Furaltadone	112	110	109	140	135	124
Gabapentin*	81	70	108	61	97	96
Iopromide*	105	97	84	94	89	90
Irbesartan*	111	91	78	86	106	67
Levamisol*	84	96	94	83	104	100
Lincomycin	105	103	78	120	105	79
Lorazepam	103	91	84	110	102	94
Losartan*	88	91	91	87	99	92
Metronidazole*	108	101	98	107	103	95
Metropolol*	81	96	96	85	102	101
Nalidixic acid*	110	95	89	102	98	85
Norfloxacin*	60	79	83	67	90	88
Oxolinic acid*	106	108	104	106	112	97
Pantoprazole*	99	87	78	100	90	80
Phenazone	98	116	120	98	103	114
Primidone*	106	100	98	86	102	99
Roxithromycin*	134	81	79	94	82	95
Salbutamol*	106	98	91	101	102	79
Sulfadiazine*	102	101	94	106	103	93
Sulfamethoxazole*	114	99	96	102	113	89
Tetracycline*	<u>180</u>	113	100	<u>152</u>	108	101
Tramadol*	67	93	89	66	89	82
Trimethoprim*	95	100	93	97	108	95
Valsartan*	a	100	126	61	92	98
Venlafaxine*	75	80	75	89	83	82
OD Venlafaxine	a	131	134	116	136	120

En *cursiva* se muestran las recuperaciones fuera del rango 60-140% aceptado

*Compuestos cuantificados mediante método patrón interno, al estar disponible el ILIS correspondiente

a: Presencia del compuesto en el “blanco” utilizado para preparar el QC a concentraciones altas, lo que impide obtener un valor de recuperación satisfactorio

Análisis de las aguas residuales

Las 36 muestras de agua residual procedentes de las tres EDARES (18 muestras de influente y 18 muestras de efluente) se analizaron mediante la metodología descrita en el presente informe para la determinación de los 38 fármacos. Las **Tablas 2.3, 2.4 y 2.5** muestran los resultados obtenidos para la determinación de los productos farmacéuticos en cada una de las muestras de entrada (influyente) y de salida (efluente) recogidas en las tres EDARES (Castelló, Borriana y Alcora), respectivamente.

Se han encontrado la mayoría de los compuestos estudiados (31 de 38 fármacos), siendo flumequine, furaltadone, lincomycin, oxolinic acid, roxithromycin, sulfadiazine y tetracycline los fármacos no detectados en ninguna de las muestras analizadas. En las aguas de influente, cabe destacar el analgésico acetaminophen, el anticonvulsivo gabapentin y el antihipertensivo valsartan, que presentaron concentraciones en muestras superiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en las tres EDARES, siendo el valor más alto para acetaminophen en la muestra de Julio AL-I-011 ($247 \mu\text{g L}^{-1}$) en la EDAR de Alcora. Este hecho está de acuerdo, con los resultados encontrados durante la anualidad 2021 en el desarrollo del proyecto “Investigación de antibióticos en aguas residuales de la provincia de Castellón: detección, eficiencia de eliminación en las EDAR, impacto ambiental y resistencia antimicrobiana” enmarcado también en el convenio entre la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural y la Universitat Jaume I.

Por lo que respecta a las aguas de salida, en general los niveles de concentración han sido más bajos que los de agua de entrada, aunque se detectaron varios fármacos a concentraciones superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (acetaminophen, diclofenac, gabapentin, iopromide, phenazone, tramadol, valsartan, venlafaxine y su metabolito OD venlafaxine). Entre los tres compuestos que presentaron las concentraciones más altas en las muestras de influente, cabe señalar el caso de acetaminophen y de gabapentin, ya que sus concentraciones se rebajaron drásticamente en las muestras de efluente.

Cabe destacar que en los efluentes analizados se han detectado cinco fármacos (clindamycin, sulfamethoxazole, trimethoprim y venlafaxine junto con su metabolito OD venlafaxine) que están incluidos en la Lista de Observación (Watch List) de la UE (Decisión de ejecución 2022/1307) cuyos niveles deben ser controlados en aguas superficiales.

Tabla 2.3. Concentraciones (ng L⁻¹) de fármacos en muestras aguas residuales de la EDAR de Castelló

	Mayo 2022				Julio 2022				Septiembre 2022			
	CS-I-003	CS-I-004	CS-E-004	CS-E-005	CS-I-011	CS-I-012	CS-E-012	CS-E-013	CS-I-018	CS-I-019	CS-E-019	CS-E-020
Acetaminophen	34181	30074	-	-	5774	24921	-	-	111962	101642	-	1572
Alprazolam	-	-	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Atorvastatin	208	208	35	35	503	446	39	110	390	379	83	40
Carbamazepine	d	d	36	34	72	60	66	60	69	91	95	157
Ciprofloxacin	1082	1086	442	410	445	514	-	362	1173	1248	541	489
Clarithromycin	83	81	d	d	400	444	105	95	555	375	56	52
Clindamycin	-	-	d	d	d	d	d	67	-	-	78	82
Diclofenac	422	601	379	427	1373	1262	431	1052	1456	1613	1353	1377
Enalapril	194	227	-	-	541	386	-	-	397	374	-	-
Erythromycin	d	d	40	38	417	491	348	250	108	281	184	157
Flumequine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	6883	8100	100	d	21638	18613	684	686	15192	14074	1245	914
Iopromide	-	-	-	-	517	d	84	362	373	198	281	931
Irbesartan	404	538	373	521	1085	1074	909	680	1027	1007	906	870
Levamisol	-	d	20	d	-	-	71	45	93	90	78	78
Lincomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	-	d	98	89	145	141	96	87
Losartan	209	271	161	174	739	586	440	373	689	705	394	373
Metronidazole	-	-	d	d	-	-	84	88	-	-	106	87
Metoprolol	d	d	d	d	132	112	66	69	352	355	167	184
Nalidixic acid	d	d	d	-	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacin	d	d	d	d	178	201	d	91	452	457	141	137
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	-	d	d	-	-	d	d	d	d	d	d

Phenazone	-	d	509	417	73	96	71	437	206	236	698	2199
Primidone	-	d	29	24	85	79	85	74	139	148	98	139
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	d	d	d	d	d	d	d	50	50	27	29
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	262	429	58	44	836	699	463	504	1109	1165	344	213
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	500	579	388	359	3288	3517	2410	2295	3630	3680	2614	2440
Trimethoprim	86	93	29	29	184	221	118	124	438	449	93	93
Valsartan	3325	4808	2044	1632	20090	17446	4169	2827	13897	12954	5213	4147
Venlafaxine	189	236	156	131	1790	1824	1077	1096	3822	2404	1413	1287
OD Venlafaxine	649	915	554	501	847	847	541	2043	2818	2732	2236	1802

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

Tabla 2.4. Concentraciones (ng L⁻¹) de fármacos en muestras aguas residuales de la EDAR de Borriana

	Mayo 2022				Julio 2022				Septiembre 2022			
	BU-I-003	BU-I-004	BU-E-004	BU-E-005	BU-I-011	BU-I-012	BU-E-012	BU-E-013	BU-I-018	BU-I-019	BU-E-019	BU-E-020
Acetaminophen	15322	19071	-	-	11267	2448	-	-	13960	35253	-	-
Alprazolam	-	-	d	d	d	d	d	d	-	-	-	d
Atorvastatin	130	240	d	106	194	191	149	163	158	295	115	140
Carbamazepine	d	d	22	23	69	77	70	78	56	121	96	117
Ciprofloxacin	1034	1244	777	739	552	504	478	163	516	998	746	747
Clarithromycin	d	51	d	d	355	327	189	126	525	675	245	205
Clindamycin	-	-	-	d	50	50	37	32	-	-	37	35
Diclofenac	d	412	294	292	406	501	471	533	300	697	413	463
Enalapril	125	144	-	-	141	137	-	-	120	226	-	-
Erithromycin	-	d	20	20	189	326	251	292	-	-	60	57
Flumequine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	3275	5559	763	587	7251	7617	2056	1746	4440	8725	2188	2507
Iopromide	1131	542	821	275	3628	1028	2107	823	3937	4432	4614	3419
Irbesartan	291	379	309	284	328	400	322	368	305	466	347	397
Levamisol	d	d	52	59	-	-	40	44	73	87	44	53
Lincomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	39	86	36	54
Losartan	176	275	176	208	287	293	281	344	235	426	299	353
Metronidazole	-	-	d	d	-	-	50	40	-	-	144	142
Metropolol	d	d	d	d	63	56	37	37	309	322	136	141
Nalidixic acid	-	d	d	d	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacin	d	d	d	d	116	117	99	43	197	200	122	127
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	-	d	d	-	-	d	d	32	36	22	21

Phenazone	-	d	291	330	58	52	56	156	173	194	731	938
Primidone	d	d	40	53	d	d	54	66	81	70	97	84
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	118	174	25	21	180	237	231	235	222	578	47	40
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	500	627	482	459	1468	1357	1386	1622	1413	2649	1818	2067
Trimethoprim	d	52	37	40	109	103	92	90	160	239	155	170
Valsartan	1685	2744	1910	1988	4890	4600	1743	5367	3086	6071	3780	3919
Venlafaxine	97	153	131	129	392	399	406	458	608	798	463	515
OD Venlafaxine	361	578	478	517	282	292	916	1192	806	1337	1094	1189

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

Tabla 2.5. Concentraciones (ng L⁻¹) de fármacos en muestras aguas residuales de la EDAR de Alcora

	Mayo 2022				Julio 2022				Septiembre 2022			
	AL-I-001	AL-I-002	AL-E-002	AL-E-003	AL-I-011	AL-I-012	AL-E-012	AL-E-013	AL-I-018	AL-I-019	AL-E-019	AL-E-020
Acetaminophen	88250	127213	-	-	246823	115799	-	-	106030	112215	-	-
Alprazolam	-	-	d	d	24	25	21	21	-	d	d	d
Atorvastatin	506	376	-	-	867	848	d	23	1004	730	d	d
Carbamazepine	d	d	36	24	76	62	85	83	123	124	169	145
Ciprofloxacin	972	1302	200	214	1926	1560	180	129	1181	1635	159	126
Clarithromycin	d	d	d	d	158	158	68	67	268	133	46	36
Clindamycin	-	245	d	d	-	-	46	45	-	-	68	60
Diclofenac	212	422	694	686	2437	2572	2196	2054	2572	2494	2444	1981
Enalapril	184	190	-	-	496	478	-	-	664	446	-	-
Erithromycin	-	-	34	27	495	204	127	125	57	-	87	60
Flumequine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	9480	8909	246	211	36094	31882	1073	1078	76435	35827	296	264
Iopromide	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-
Irbesartan	613	571	561	470	1055	1493	967	952	2260	1162	1152	951
Levamisol	319	156	39	51	534	256	236	214	99	156	276	176
Lincomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	d	d	-	117	121	98	141	151	125	119
Losartan	275	322	111	97	813	729	175	197	1048	1010	223	187
Metronidazole	-	-	-	-	-	-	40	30	-	-	-	-
Metropolol	d	d	d	d	-	-	-	-	336	304	136	130
Nalidixic acid	d	-	d	d	-	-	-	-	d	d	d	d
Norfloxacin	175	163	d	d	307	418	104	77	360	398	120	104
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	27	25	33	30	50	44	31	32	33	32

Phenazone	d	d	408	402	72	59	2288	2311	227	208	5682	5050
Primidone	99	258	98	90	313	188	255	255	346	147	361	302
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	-	d	d	26	34	d	d	64	43	33	29
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	661	2096	188	135	1629	1386	552	428	1433	683	300	295
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	555	953	493	475	3636	3013	2896	3026	3407	2854	3760	3294
Trimethoprim	222	1217	100	89	615	499	108	129	651	359	186	162
Valsartan	6983	11028	1225	747	47505	41221	1845	1660	32647	29691	4063	3396
Venlafaxine	447	478	86	96	1515	5286	557	498	1570	1807	1032	596
OD Venlafaxine	1041	1130	694	645	1158	822	1652	1787	3392	3411	2359	2150

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

Las concentraciones medias mensuales (mayo, julio y septiembre) encontradas en cada muestreo se muestran en las **Tablas 2.6, 2.7 y 2.8** para cada una de las tres EDARES, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones en el efluente son, en general, menores que en las muestras de influente, lo que denota una cierta eficiencia de la EDAR en cuanto a la eliminación de fármacos, aunque queda lejos de ser completa pues aún se encuentran muchos fármacos y a niveles relativamente importantes en las aguas tratadas. Sin embargo, se observan algunos fármacos (diclofenac, levamisol, lorazepam, losartan, phenazone, primidone y tramadol) con concentraciones medias mensuales del mismo orden, e incluso mayores, en las muestras de efluente.

Comparando los resultados de las tres EDARES, se puede apreciar que la situación es similar, aunque llama la atención el medio de contraste iopromide puesto que es el compuesto que tiene un comportamiento más diferente. Este fármaco en Castelló se detectó en algunos muestreos en concentraciones inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (606 ng L^{-1} como concentración máxima), en Borriana se detectó en todos los muestreos en concentraciones más altas ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$) y por último en Alcora solo se encuentra en un muestreo en concentración de 26 ng L^{-1} .

Tabla 2.6. Concentraciones medias (ng L⁻¹) mensuales de fármacos en la EDAR de Castelló

	Mayo-I	Mayo-E	Julio-I	Julio-E	Septiembre-I	Septiembre-E
Acetaminophen	32128	-	15347	-	106802	786
Alprazolam	-	d	d	d	d	d
Atorvastatin	208	35	474	74	385	61
Carbamazepine	d	35	66	63	80	126
Ciprofloxacin	1084	426	480	181	1211	515
Clarithromycin	82	d	422	100	465	54
Clindamycin	-	d	51	43	-	80
Diclofenac	511	403	1318	742	1534	1365
Enalapril	210	-	463	-	385	-
Erithromycin	d	39	454	299	194	170
Flumequine	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	7491	100	20126	685	14633	1079
Iopromide	-	-	279	223	285	606
Irbesartan	471	447	1080	795	1017	888
Levamisol	d	20	-	58	91	78
Lincomycin	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	43	94	143	92
Losartan	240	168	663	406	697	383
Metronidazole	-	d	-	86	-	96
Metropolol	d	d	122	67	353	175
Nalidixic acid	d	d	-	-	d	d
Norfloxacin	d	d	190	58	454	139
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	-	19	30	20
Phenazone	d	463	84	254	221	1449
Primidone	d	26	82	79	143	119
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	33	13	45	28
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	345	51	768	483	1137	278
Tetracycline	-	-	-	-	-	-
Tramadol	540	373	3403	2352	3655	2527
Trimethoprim	89	29	203	121	443	93
Valsartan	4066	1838	18768	3498	13425	4680
Venlafaxine	213	144	1807	1087	3113	1350
OD Venlafaxine	782	528	847	1292	2775	2019

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

Tabla 2.7. Concentraciones medias (ng L⁻¹) mensuales de fármacos en la EDAR de **Borriana**

	Mayo-I	Mayo-E	Julio-I	Julio-E	Septiembre-I	Septiembre-E
Acetaminophen	17197	-	6857	-	24607	-
Alprazolam	-	d	d	d	-	d
Atorvastatin	185	106	193	156	226	127
Carbamazepine	d	23	73	74	89	106
Ciprofloxacin	1139	758	528	320	757	747
Clarithromycin	51	d	341	157	600	225
Clindamycin	-	d	50	34	-	36
Diclofenac	412	293	454	502	498	438
Enalapril	134	-	139	-	173	-
Erithromycin	d	20	257	271	-	59
Flumequine	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	4417	675	7434	1901	6583	2347
Iopromide	836	548	2328	1465	4185	4016
Irbesartan	335	296	364	345	386	372
Levamisol	d	55	-	42	80	48
Lincomycin	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	-	-	-	63	45
Losartan	226	192	290	313	331	326
Metronidazole	-	d	-	45	-	143
Metropolol	d	d	59	37	316	138
Nalidixic acid	d	d	-	-	d	d
Norfloxacin	d	d	116	71	199	124
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	-	d	-	d	34	21
Phenazone	d	310	55	106	183	835
Primidone	d	46	25	60	76	91
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	d	d	d	d	d	d
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	146	23	208	233	400	44
Tetracycline	-	-	-	-	-	-
Tramadol	563	471	1413	1504	2031	1943
Trimethoprim	52	38	106	91	199	162
Valsartan	2215	1949	4745	3555	4578	3850
Venlafaxine	125	130	396	432	703	489
OD Venlafaxine	469	497	287	1054	1072	1141

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

Tabla 2.8. Concentraciones medias (ng L⁻¹) mensuales de fármacos en la EDAR de Alcora

	Mayo-I	Mayo-E	Julio-I	Julio-E	Septiembre-I	Septiembre-E
Acetaminophen	107732	-	181311	-	109122	-
Alprazolam	-	d	25	21	d	d
Atorvastatin	441	-	857	21	867	d
Carbamazepine	d	30	69	84	123	157
Ciprofloxacin	1137	207	1743	155	1408	143
Clarithromycin	d	d	158	67	200	41
Clindamycin	123	d	-	45	-	64
Diclofenac	317	690	2504	2125	2533	2212
Enalapril	187	-	487	-	555	-
Erithromycin	-	30	350	126	28	73
Flumequine	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	9195	228	33988	1076	56131	280
Iopromide	-	-	-	-	26	-
Irbesartan	592	516	1274	960	1711	1051
Levamisol	237	45	395	225	128	226
Lincomycin	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	-	d	58	110	146	122
Losartan	299	104	771	186	1029	205
Metronidazole	-	-	-	35	-	-
Metropolol	d	d	-	-	320	133
Nalidixic acid	d	d	-	-	d	d
Norfloxacin	169	d	362	91	379	112
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	d	26	32	47	32	32
Phenazone	d	405	65	2300	217	5366
Primidone	179	94	250	255	247	331
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	d	30	17	53	31
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	1379	162	1507	490	1058	297
Tetracycline	-	-	-	-	-	-
Tramadol	754	484	3325	2961	3131	3527
Trimethoprim	720	94	557	119	505	174
Valsartan	9006	986	44363	1753	31169	3729
Venlafaxine	463	91	3401	528	1689	814
OD Venlafaxine	1086	669	990	1719	3401	2255

d: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación

2.3. Variación estacional de fármacos en las EDARES

La variación estacional de los fármacos en las tres EDARES objeto de estudio se ha llevado a cabo seleccionando la concentración total de cinco familias terapéuticas: antibióticos, antiepilépticos, antihipertensivos, analgésicos y antidepresivos. Las **Figuras 2.1, 2.2 y 2.3** muestran los resultados obtenidos en la EDAR de Castelló, Borriana y Alcora, respectivamente.

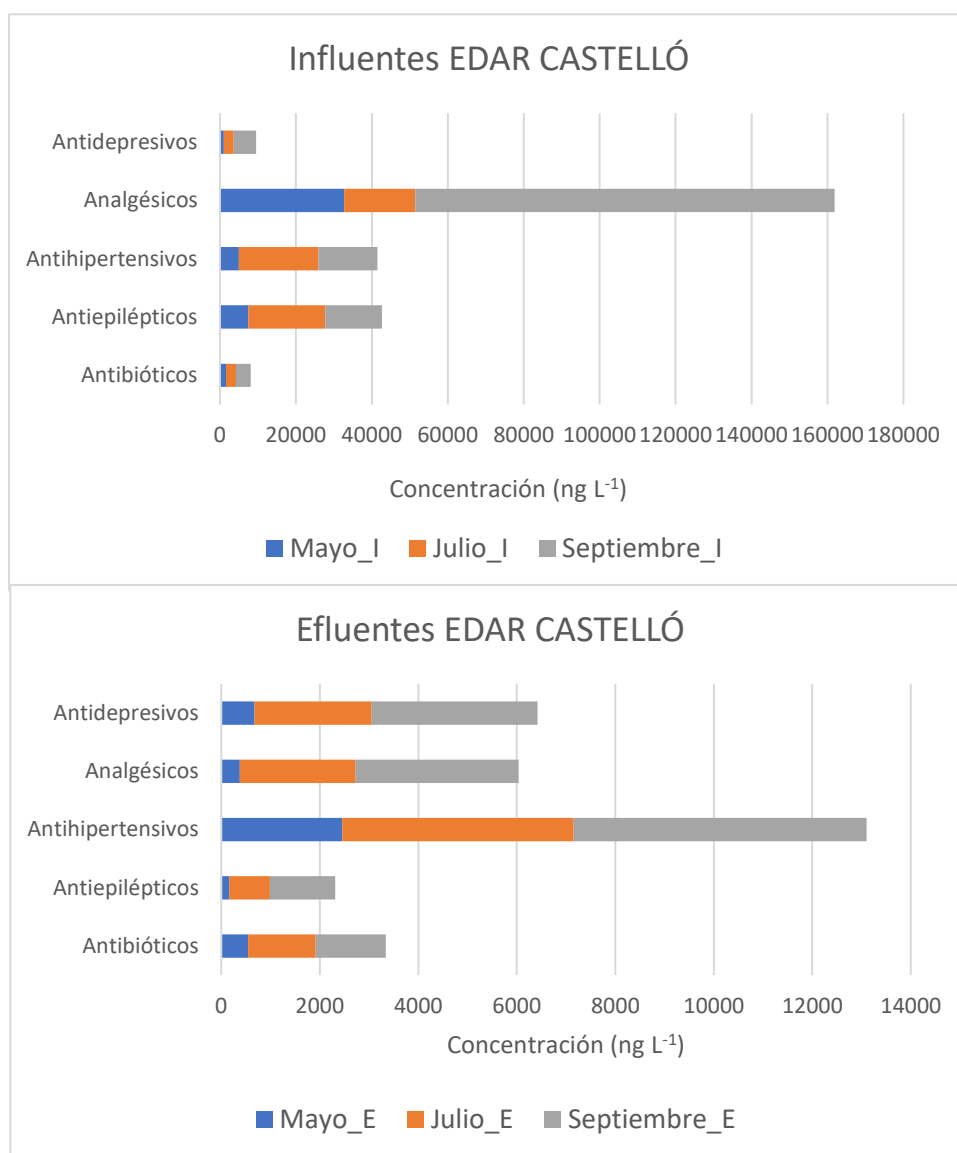


Figura 2.1. Concentraciones totales por familias terapéuticas encontradas en aguas de salida y de entrada de la EDAR de Castelló en cada uno de los tres muestreos

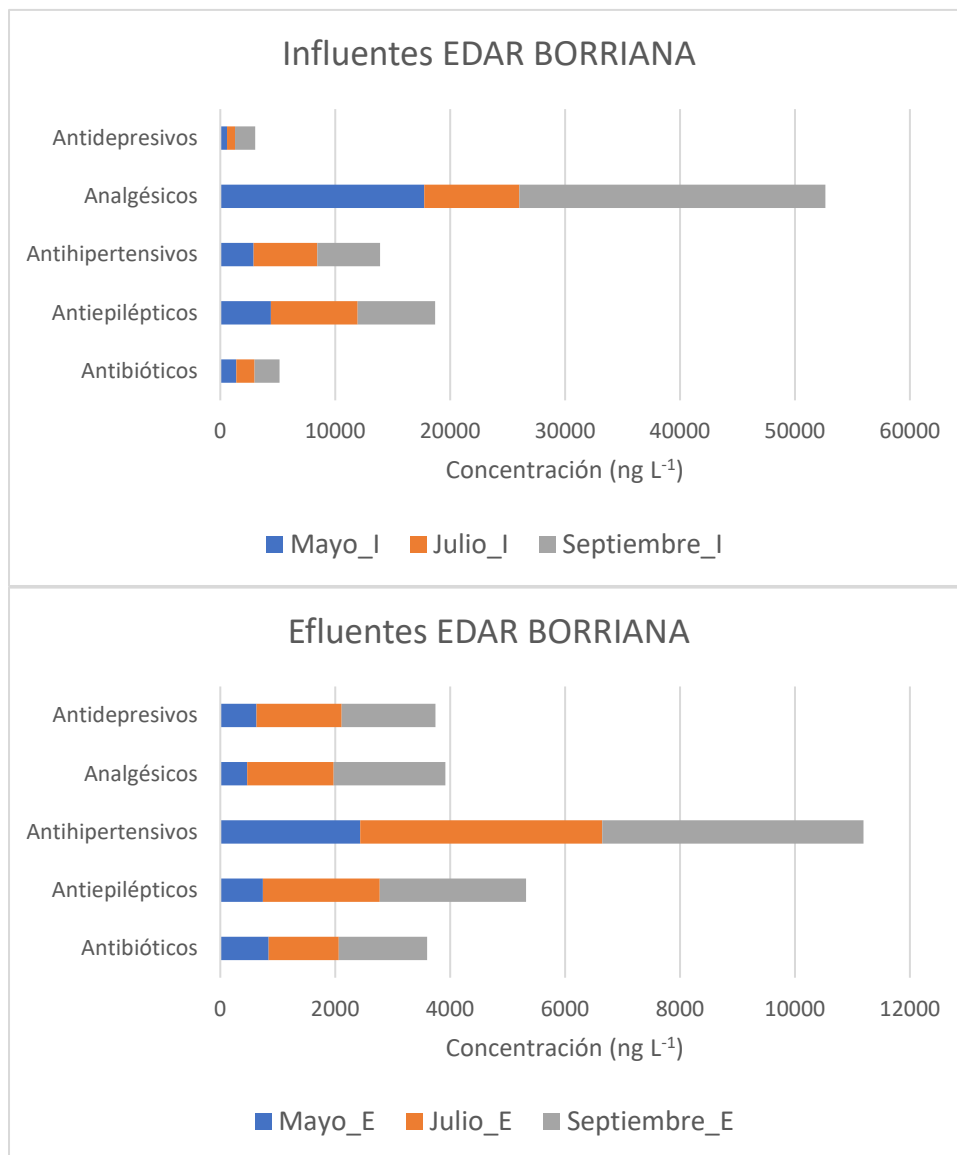


Figura 2.2. Concentraciones totales por familias terapéuticas encontradas en aguas de salida y de entrada de la EDAR de Borriana en cada uno de los tres muestreos

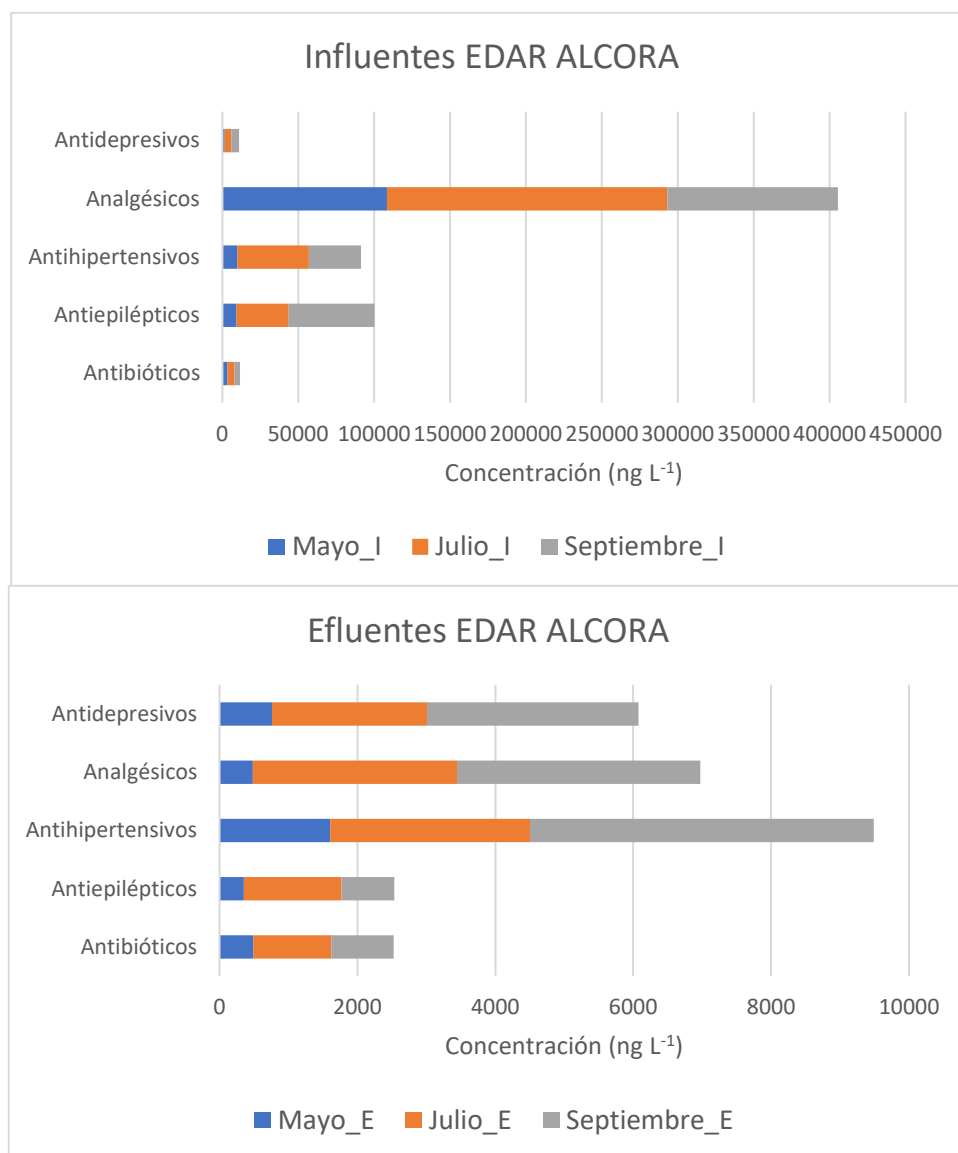


Figura 2.3. Concentraciones totales por familias terapéuticas encontradas en aguas de salida y de entrada de la EDAR de Alcora en cada uno de los tres muestreos

Aunque resulta complicado establecer unas tendencias claras del uso de fármacos en el tiempo, comparando las concentraciones totales en las aguas de entrada de las tres EDARES se puede llegar a establecer algunas similitudes y diferencias. Las EDARES Castelló y Borriana siguen un perfil parecido en donde las concentraciones de antidepresivos, analgésicos y antibióticos son claramente más altas en las aguas de influente durante el muestreo de septiembre, y las concentraciones de antihipertensivos y antiepilépticos son más altas durante el verano (julio). Sin embargo, en Alcora el comportamiento es otro, ya que son los antidepresivos y

antiepilépticos, los encontrados en mayor concentración en las aguas de entrada del mes de septiembre, y el resto parece que su uso aumenta en verano. En todas las EDARES, el muestreo llevado a cabo durante la primavera (mayo) ha determinado las menores concentraciones de las cinco familias, a excepción de los analgésicos.

Comparando las aguas de salida, se observa que en general las concentraciones de las familias de los fármacos son mayores durante el mes de septiembre, a excepción de los antibióticos y antiepilépticos en la EDAR de Alcora cuya determinación es mayor durante el verano.

2.4. Eficacia de eliminación de fármacos en las EDARES

La eficiencia de eliminación de los fármacos seleccionados se ha estimado comparando las cargas totales diarias de los compuestos en las aguas de entrada y de salida (Bijlsma et al., 2021), haciendo uso de los caudales ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) de las corrientes correspondientes (ver **Tabla 2.1**).

Las cargas diarias de fármacos se han calculado a partir de las concentraciones encontradas en las aguas, del siguiente modo:

$$q = C \times F \times 1000$$

q: carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de influente o del efluente

C: concentración del fármaco (g L^{-1}) en la muestra de influente o del efluente

F: caudal ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) de entrada o de salida de la EDAR

El porcentaje de eliminación se ha calculado a partir de la siguiente expresión:

$$E (\%) = \frac{q_i - q_E}{q_i} \times 100$$

E: porcentaje de eliminación (%)

q_i : carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de influente del día x

q_E : carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de efluente del día x+1

La **Tabla 2.9** muestra la eficiencia de eliminación (%) estimada para los fármacos detectados en las tres EDARES estudiadas. Para la estimación de la eficiencia se ha comparado las aguas del efluente del día después con las aguas del influente del día anterior, asumiendo de este modo un tiempo de residencia de los fármacos de 24h en la planta.

Tabla 2.9. Eficiencia de eliminación (%) mensual y promedio para los fármacos en cada una de las EDARES estudiadas

	Castelló				Borriana				Alcora			
	Mayo	Julio	Sept.	Promedio	Mayo	Julio	Sept.	Promedio	Mayo	Julio	Sept.	Promedio
Acetaminophen	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Alprazolam	<0	6	-19	0*	<0	42	0	0*	<0	11	-138	0*
Atorvastatin	100	83	85	89	78	20	30	43	83	97	99	93
Carbamazepine	-20	-7	-53	<0	9	1	-57	0*	-42	-30	-32	<0
Ciprofloxacin	82	67	58	69	33	45	-29 ^a	39	61	91	89	80
Clarithromycin	60	73	88	74	70	56	55	60	88	56	76	73
Clindamycin	<0	14	<0	0*	<0	34	<0	0*	<0	0	<0	0*
Diclofenac	-145	41	13	0*	-53	-8	-20	<0	20	13	9	14
Enalapril	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Erythromycin	<0	21	-10	0*	<0	-6	<0	<0	<0	52	-40	0*
Flumequine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furaltadone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentin	97	96	93	95	83	75	54	71	99	97	99	98
Iopromide	-	79	-172	0*	24	31	-14	0*	-	-	100	100
Irbesartan	13	15	15	14	9	7	-16 ^a	8	5	22	28	18
Levamisol	77	0	16	0*	-120	0	30	0*	60	31	-94	0*
Lincomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorazepam	<0	4	37	0*	-	0	11	5	-	-1	13	0*
Losartan	64	31	46	47	12	-6	-23	0*	29	74	79	61
Metronidazole	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0
Metropolol	-	39	51	45	-	39	49	44	-	-	56	56
Nalidixic acid	-	-	18	18	-	-	29	29	100	-	59	80
Norfloxacin	85	70	70	75	67	43	27 ^a	55	67	74	69	70
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	<0	0	36	0*	<0	0	27	0*	<0	-54	-7	0*

Phenazone	-1500	-176	-528	<0	-600	-104	-427	<0	-500	-3660	-2488	<0
Primidone	36	-9	19	0*	-90	-136	-39	<0	0	-17	-69	0*
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salbutamol	-	57	39	48	-	44	39	35	-	41	36	39
Sulfadiazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	83	30 ^a	76	79	83	-10 ^a	83	83	84	67	65	72
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	30	21	32	28	15	-6	-21	0*	30	5	-19	0*
Trimethoprim	74	32	80	62	2	16	2	6	68	77	60	68
Valsartan	87	79	66	77	28	21	-10 ^a	25	52	96	88	78
Venlafaxine	81	32	56	56	16	-7 ^a	18	17	31	78	50	53
OD Venlafaxine	38	-54	29	0*	-11	-263	-31	<0	30	-93	31	0*

*Se ha considerado eficiencia nula de eliminación puesto que los datos son altamente variables, pero con tendencia a la no eliminación

^a Valor no considerado en el promedio por ser anómalo al resto

Se observa que 4 de los 30 fármacos que se encontraron en las aguas se eliminaron en mayor o menor medida en la EDAR por encima del 70% (acetaminophen, enalapril, gabapentin y sulfamethoxazole) en las tres EDARES. Cabe destacar, que otros 5 compuestos (atorvastatin, ciprofloxacina, clarithromycin, norfloxacina y valsartan) fueron eliminados casi totalmente ($\geq 70\%$) en las EDARES de Castelló y Alcora, pero sin embargo la eliminación fue inferior en la EDAR de Borriana. Cinco fármacos mostraron, en general, eficiencias de eliminación parciales con valores inferiores al 60% (metoprolol, nalidixic acid, salbutamol, trimethoprim y venlafaxine). También existe un amplio número de fármacos que mostraron eficiencia de eliminación altamente variable durante los diferentes muestreos realizados, e incluso también entre las tres EDARES estudiadas, aunque con tendencia a la no eliminación (alprazolam, clindamycin, diclofenac, erithromycin, iopromide, levamisol, lorazepam, pantoprazol, tramado y OD venlafaxine). Por último, se han obtenido eficiencias negativas para algunos compuestos en algunos muestreos de las tres EDARES, al presentar niveles de concentración en el agua de salida superiores a los del agua de entrada. Cabe destacar el antiinflamatorio phenazone, ya que ha sido el compuesto con eficiencia negativa en todas las estaciones y en las tres EDARES. Este hecho de eliminación negativa puede parecer sorprendente pero que ha sido reportado en la literatura científica (Botero-Coy et al., 2018; Bijlsma et al., 2021). La baja eficiencia de la planta para la eliminación de estos compuestos unida a la posible liberación de conjugados (generalmente glucurónidos y sulfatos) durante el paso del agua por la planta podrían ser posibles causas de este aumento de concentración.

La **Figura 2.4** muestra gráficamente las eficiencias de eliminación promedio para los fármacos en las tres EDARES estudiadas. Se ha considerado eficiencia 0% cuando el valor de la eliminación ha sido <0 . Como ya se ha indicado anteriormente, 12 de los 30 compuestos detectados (atorvastatin, ciprofloxacina, clarithromycin, gabapentin, irbesartan, losartan, metoprolol, norfloxacina, salbutamol, trimethoprim, valsartan y venlafaxine) mostraron una eficiencia de eliminación inferior en la EDAR de Borriana, comparada con la de Castelló y la de Alcora. Contrariamente, el antibiótico sulfamethoxazole presentó una mayor eliminación en la EDAR de Borriana. Estos hechos pudieran indicar que, aunque en las tres EDARES se aplican tratamientos convencionales, la eliminación no siempre es eficiente.

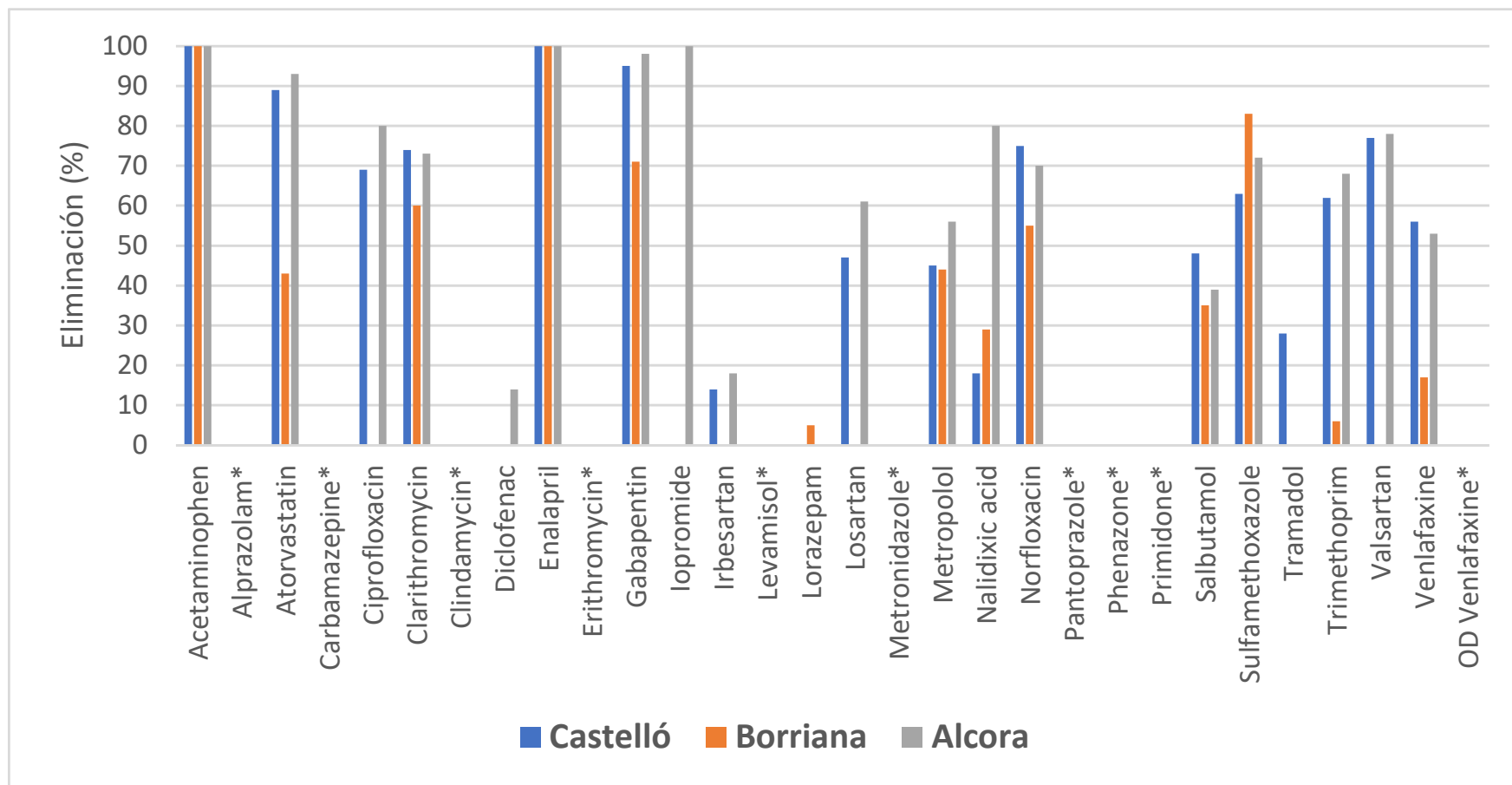


Figura 2.4. Eficiencia de eliminación promedio (%) de los fármacos detectados en las aguas residuales de las tres EDARES (*compuesto con eficiencia de eliminación 0% en las tres EDARES)

3. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE SALIDA TRAS APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS AVANZADOS

Esta parte del proyecto se llevó a cabo en conjuntamente con el Instituto de Tecnología Química (ITQ) de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV), en donde el ITQ desarrolló y aplicó los tratamientos terciarios y el IUPA llevó a cabo los análisis de las aguas.

3.1. Aplicación de ozonización catalítica en agua fortificada

La aplicación de tratamientos avanzados se llevó a cabo, en una primera fase, para estudiar la eliminación del antiinflamatorio ibuprofeno. La selección de este fármaco se hizo en base a la experiencia previa del ITQ y a que es un compuesto que no se elimina en los tratamientos convencionales de la EDAR.

Se llevaron a cabo dos ensayos, uno con agua Milli-Q fortificada con ibuprofeno a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ y otro con agua de salida de la EDAR de Castellón fortificada con ibuprofeno a $500 \mu\text{g L}^{-1}$. En ambos casos, se aplicaron tratamientos terciarios utilizando el reactor de columna que se encuentra en las instalaciones del ITQ utilizando tanto la ozonización simple (O_3) como la ozonización catalítica usando óxido de manganeso como centro activo (MnO_2) soportado en diferentes tipos de zeolitas comerciales (zeolita Y) con relaciones molares $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$: 60 y 12 (H-CBV760 y NH4-CBV712, abreviadas en este informe como ZY60 y ZY12). Las condiciones experimentales fueron: caudal gas = 2.0 L/min; concentración ozono de entrada = 6.1 g/Nm³; pH natural = 6.5; temperatura ambiente 23°C.

Más detalle sobre la síntesis de los catalizadores y la configuración experimental se incluye en el **Anexo 1**.

La **Tabla 3.1** muestra los diferentes tratamientos avanzados aplicados para la eliminación de ibuprofeno usando diferentes tiempos de reacción.

Tabla 3.1. *Tratamientos avanzados aplicados*

Tratamiento	Tiempo (min)		
O_3	10	30	60
$\text{O}_3/\text{ZY60}$	10	30	60
$\text{O}_3/\text{ZY12}$	10	30	60

El primer ensayo consistió en analizar la muestra de agua Milli-Q fortificada antes y después del tratamiento para llevar a cabo un seguimiento cuantitativo de la eliminación de ibuprofeno mediante LC-MS/MS. La **Figura 3.1** muestra los resultados obtenidos para este ensayo.

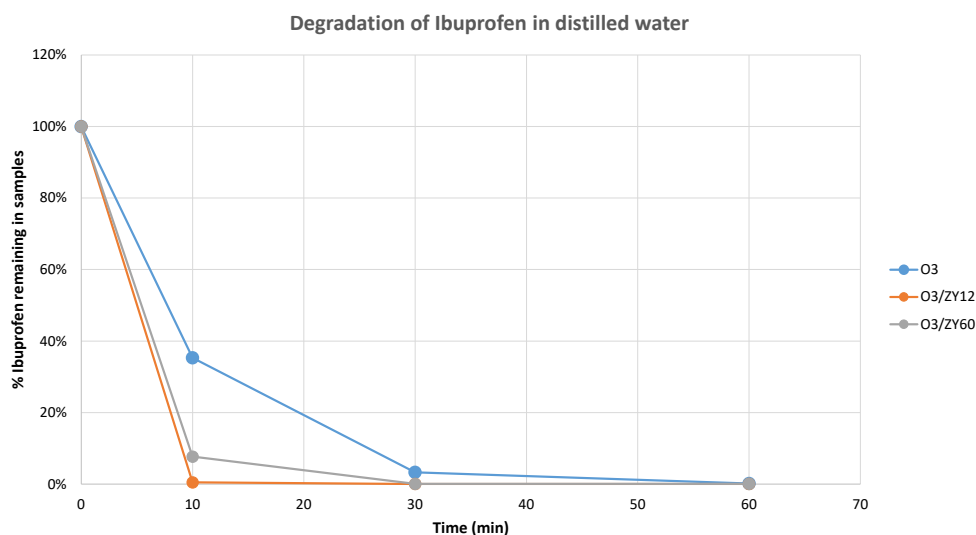


Figura 3.1. Evolución de la eliminación de ibuprofeno en agua Milli-Q fortificada a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando tres tratamientos terciarios.

En la Figura se observa que prácticamente a los 30 min, la eliminación de ibuprofeno es casi completa utilizando los tres tratamientos aplicados. A los 10 min, es donde se observan mayores diferencias ya que la eliminación de ibuprofeno en la ozonización simple es mucho menor que utilizando tratamientos de ozonización catalítica. Este hecho se puede atribuir a que la molécula de ibuprofeno no tiene grupos funcionales que reaccionen con el ozono. Así mismo, estudios previos han encontrado que la constante de segundo orden para la reacción de ibuprofeno con ozono es 9.1 Ms^{-1} y con radical hidroxilo es $7.4 \times 10^9 \text{ Ms}^{-1}$ en un efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales (Nakada et al., 2007). La adición de zeolita en la ozonización aceleró la velocidad de degradación del ibuprofeno, llegando a eliminar casi el 100% con $\text{O}_3/\text{ZY12}$ y el 92% con $\text{O}_3/\text{ZY60}$.

En general, las zeolitas Y se consideran un adsorbente polar que puede adsorber fácilmente moléculas polares. La molécula de ozono, que puede reaccionar como un dipolo y un agente nucleófilo, es muy inestable en el agua y cuando se acerca a la zeolita Y, puede adsorberse preferentemente sobre la estructura de la zeolita y disociarse posteriormente (Qi et al., 2015). Por tanto, se puede decir que la zeolita Y es ventajosa para la adsorción y la descomposición del ozono. Una posible explicación de la mayor mineralización de ambas zeolitas en solución acusa

en comparación con ozonización simple o no catalítica, también puede ser el efecto de las zeolitas en la generación del radical OH y su capacidad de reaccionar directamente con el ozono (StaeHELLn and Hoigne, 1985).

El segundo ensayo consistió en analizar la muestra de agua residual de salida fortificada antes y después del tratamiento para llevar a cabo un seguimiento cuantitativo de la eliminación de ibuprofeno mediante LC-MS/MS. La **Figura 3.2** muestra los resultados obtenidos este ensayo.

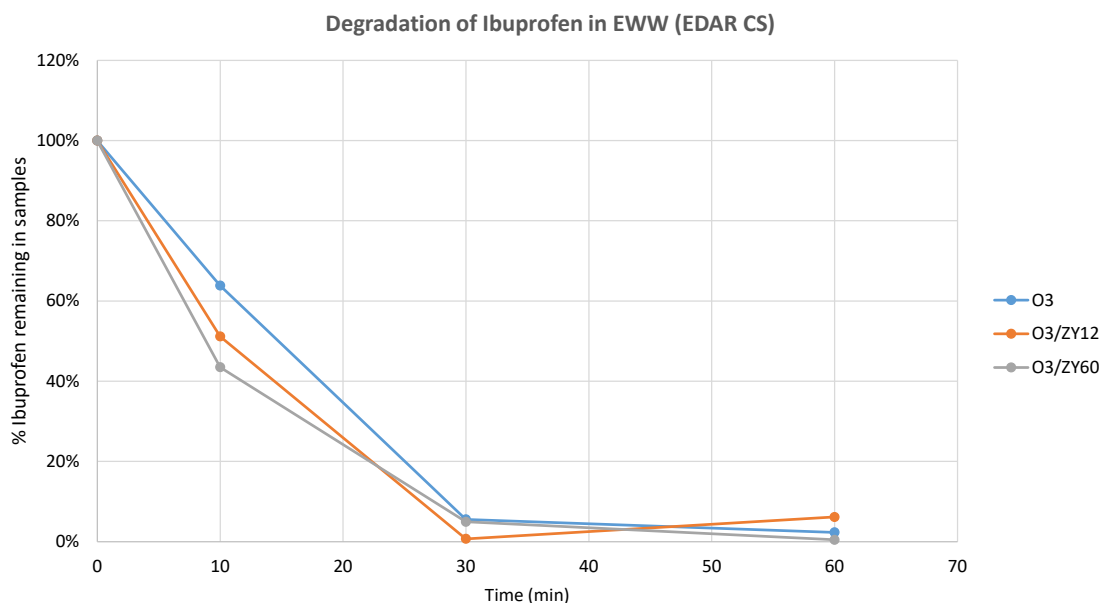


Figura 3.2. Evolución de la eliminación de ibuprofeno en agua residual de salida de la EDAR de Castelló a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando tres tratamientos terciarios.

Los resultados obtenidos mostraron que, de nuevo, prácticamente a los 30 min la eliminación de ibuprofeno fue casi completa con cualquiera de los tres tratamientos utilizados. Sin embargo, a los 10 min ningún tratamiento consiguió una eliminación de ibuprofeno mayor del 60% (36% con O_3 , 49% con $\text{O}_3/\text{ZY12}$ y 56% con $\text{O}_3/\text{ZY60}$), a diferencia de los resultados obtenidos con agua Milli-Q en donde la eliminación con ozonización catalítica era casi completa. Este hecho posiblemente sea debido a la mayor complejidad de la matriz y a la presencia de materia orgánica que disminuye la capacidad de adsorción del ozono y de los catalizadores.

3.2. Seguimiento cuantitativo de la eliminación de fármacos en agua residual

En una segunda fase, y para entender la aplicabilidad de los sistemas seleccionados $\text{O}_3/\text{ZY12}$ y $\text{O}_3/\text{ZY60}$, la aplicación de tratamientos avanzados se llevó a cabo en un tercer ensayo utilizando directamente el agua residual de salida de la EDAR de Castelló. El objetivo fue realizar un seguimiento cuantitativo de los 38 fármacos seleccionados en la sección 2 tras la aplicación de

tratamientos como la ozonización simple y la ozonización catalítica a diferentes tiempos de reacción (ver **Tabla 3.1**).

El ensayo consistió en analizar la muestra de agua EWW antes y después del tratamiento para llevar a cabo un seguimiento cuantitativo mediante LC-MS/MS de la eliminación de los fármacos seleccionados. Los resultados mostraron que para 17 de los 25 fármacos cuantificados en el agua residual (atorvastatin, carbamazepine, ciprofloxacin, clarithromycin, clindamycin, diclofenac, enalapril, erithromycin, levamisol, losartan, metropolol, phenazone, tetracycline, tramadol, trimethoprim, venlafaxine y OD venlafaxine), la ozonización sin catalizadores era capaz de eliminar completamente el contaminante incluso al tiempo más bajo de reacción de 10 min. Ocho fármacos mostraron un comportamiento diferente, puesto que a los 10 min de los tratamientos aplicados todavía quedaba fármaco en el agua residual. La **Figura 3.3** muestra la evolución de la eliminación de los ocho fármacos tras aplicar los diferentes tratamientos de ozonización.

Entre los ocho fármacos, se observan cuatro comportamientos diferentes:

- Gabapentin, irbesartan, sulfamethoxazole y valsartan mostraron una eliminación completa a los 30 min tanto con ozonización simple como con ozonización catalítica. En general, cabe destacar que a los 10 min la ozonización catalítica fue más eficaz, especialmente con zeolita ZY12.
- Lorazepam y metronidazole fueron eliminados completamente a los 10 min con ozonización catalítica (indistintamente con ZY12 o ZY60), mientras que con ozonización simple fueron necesarios 30 min para la eliminación al 100%.
- Norfloxacin también fue eliminado completamente a los 10 min con ozonización catalítica, sin embargo, la ozonización simple no consiguió eliminar más del 70% ni incluso con 60 min.
- Primidone mostró un comportamiento similar con los tres tratamientos, necesitando 60 min para la eliminación completa tanto con ozonización simple como con ozonización completa.

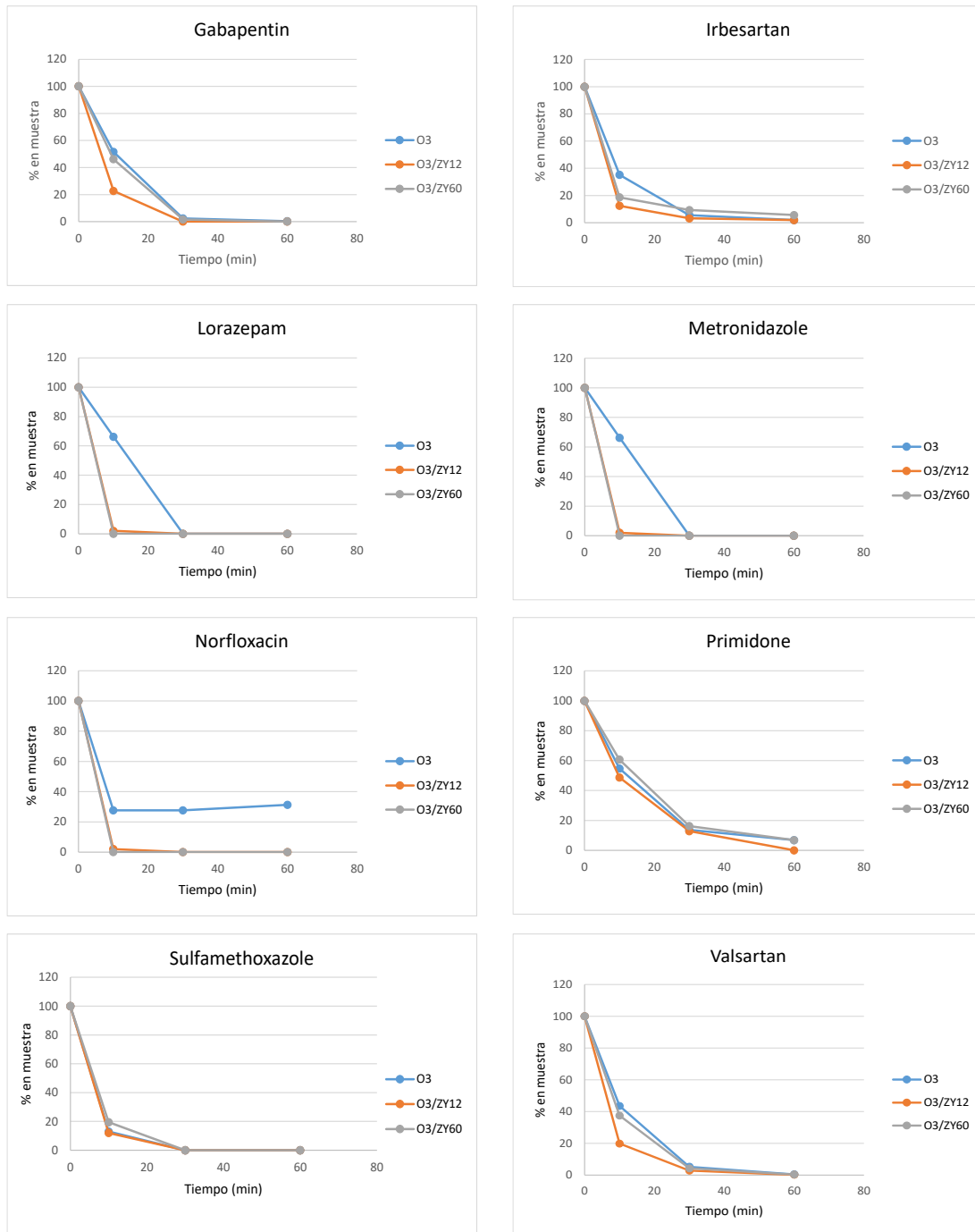


Figura 3.3. Evolución de la eliminación de fármacos en agua residual de salida de la EDAR de Castelló utilizando tres tratamientos terciarios.

4. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN LAS AGUAS RESIDUALES

Esta parte del proyecto se llevó a cabo en colaboración con la Unidad Predepartamental de Medicina de la UJI.

4.1. Detección y cuantificación de los GRA mediante PCR cuantitativa

El estudio de los genes de resistencia a antibióticos (GRA) se ha llevado a cabo en muestras residuales de la EDAR de Castelló, almacenadas y congeladas (-18 °C) en las instalaciones del IUPA. Concretamente, se corresponden a 16 muestras de influente (de entrada) recogidas durante los meses mayo-octubre 2021 y enero 2022.

Para evaluar la presencia de los GRA y su cuantificación en las muestras estudiadas, en primer lugar, se llevó a cabo la extracción y cuantificación de ADN total/muestra según la metodología explicada en el **Anexo 1**. A continuación, se estudió la presencia de cada gen mediante el uso de la PCR cuantitativa (qPCR) (ver **Anexo 1**). Los genes que se analizaron fueron los siguientes:

- qnrS (familia de proteínas, que protege a la ADN girasa de la inhibición de las quinolonas)
- erm (gen que codifica la 23S RNA metilasa, asociada a la eritromicina)
- sul1 (dihidropteroato sintasa resistente a las sulfonamidas)
- blaCTX -M-32 (β -lactamasa de clase A, cefalosporinasa),
- tet (W) (proteína de protección ribosómica que protege al ribosoma de la inhibición de la traducción de la tetraciclina),
- int1 (integrasa de clase I, este gen está asociado con la transferencia horizontal de genes y la contaminación ambiental)
- 16S rRNA, que es un indicador de la abundancia microbiana total

A continuación, se calcularon las copias génicas de cada gen estudiado, en base a los datos de sus curvas de calibrado, relacionándose los valores de Ct (valor umbral) con los valores de copias génicas. En la **Figura 4.1** se muestra un ejemplo de los cálculos para el gen int1, gen que codifica para la integrasa de clase I que está asociado con la transferencia horizontal de genes y la contaminación ambiental. Posteriormente, se realizan los cálculos pertinentes para obtener los valores de copias génicas/día (ver metodología en **Anexo 1**).

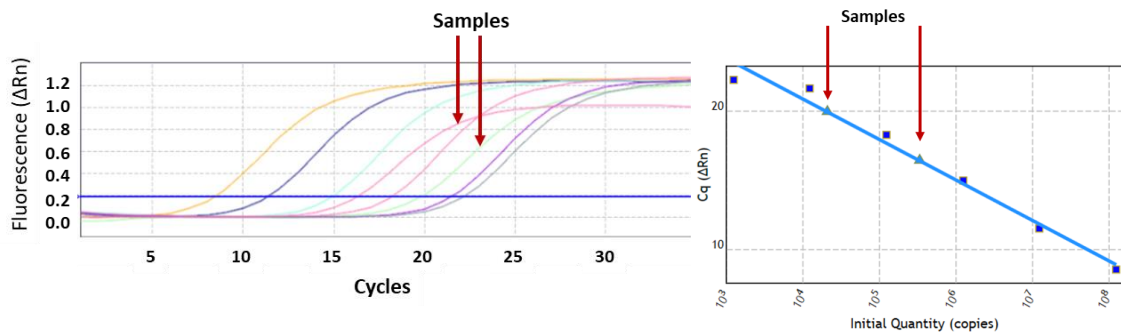


Figura 4.1. Gráfico de amplificación donde se muestra la fluorescencia y los ciclos para los puntos de la curva patrón del gen *int1*, así como dos muestras de aguas a estudiar. También se muestra el gráfico, donde se extrapola las copias génicas frente al valor de fluorescencia, tanto para los puntos de la curva patrón del gen *int1*, así como para dicho gen en dos muestras de aguas a estudiar.

La **Figura 4.2** muestra los resultados de las copias génicas de cada gen/ día para las 16 muestras de agua residual analizadas. Tal y como se ha comentado anteriormente, entre los genes estudiados se incluye el gen ribosomal 16S RNA, que nos permite medir la abundancia bacteriana presente en la muestra. En la **Figura 4.3** se muestran los valores de las copias génicas/ día para dicho gen, lo cual nos permite confirmar que tanto el proceso de extracción de ADN y cuantificación del gen por qPCR ha sido apropiado. Teniendo esto en consideración y a la vista de los resultados, podemos concluir que todas las muestras de aguas residuales analizadas contienen genes que confieren resistencia a todos los genes estudiados. De todos ellos, se observa una mayor proporción para el gen de resistencia *ermB* (antibióticos macrólidos), seguido de los genes *sul1* (sulfonamidas), *tet (W)* (tetraciclina) e *int1* (transferencia horizontal de genes y la contaminación ambiental), los cuales muestran un patrón similar. Finalmente, encontraríamos el gen *qnrS* (quinolonas) y, por último, *blaCTX -M-32* (cefalosporinas).

Cuando se realiza una comparación de cada gen de resistencia en relación al gen 16sRNA, que nos indica la abundancia bacteriana, se observan los resultados de la **Figura 4.3**. En general, se observa que la mayor abundancia relativa corresponde a los macrólidos (*ermB*), seguidos en menor medida de las sulfonamidas (*sul1*), tetraciclinas (*tetW*), quinolonas (*qnrS*) y cefalosporinas (β -lactámicos) (*blaCTX*).

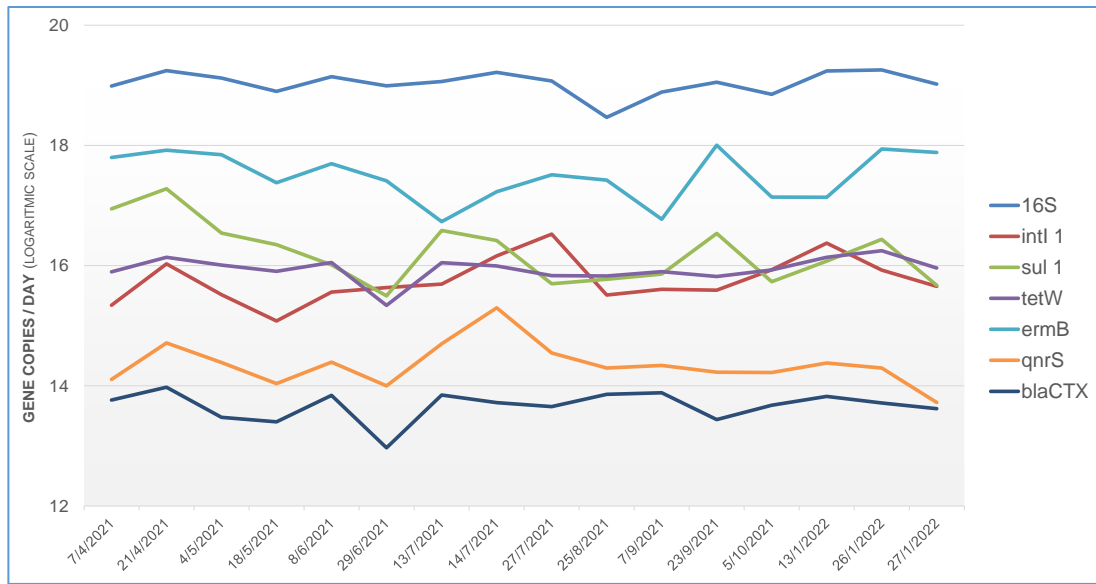


Figura 4.2. Carga de genes de resistencia y del gen 16SrRNA copias por día en aguas residuales de Castellón.

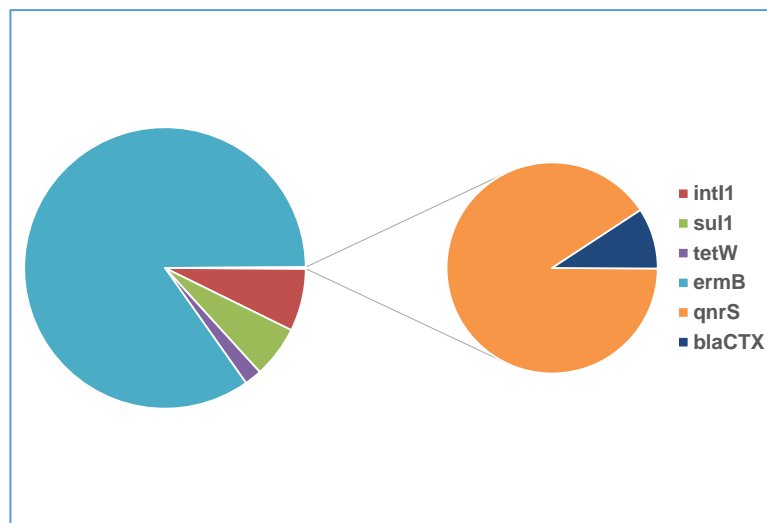


Figura 4.3. Copias génicas relativas para cada gen de resistencia relativo al gen 16S rRNA que indica abundancia bacteriana.

4.2. Caracterización microbiana de las aguas residuales

Cultivo de bacterias viables a partir de muestras de aguas frescas

De las muestras de agua residual recogidas para realizar el seguimiento de los niveles de concentración de fármacos (sección 2.1, **Tabla 2.1**), se seleccionaron una muestra de influente y una de efluente en cada una de las tres EDARES. En concreto, fueron las muestras de septiembre (CS-I-018, CS-E-019, BU-I-018, BU-E-019, AL-I-018 y AL-E-019), las cuales se procesaron a las 24h de su recogida (muestras frescas), tal y como se indica en el apartado de metodología del **Anexo 1** para evaluar la presencia de coliformes y enterococos totales, así como la población de ambos grupos bacterianos, resistentes a tetraciclina y ciprofloxacina.

Los resultados de las muestras correspondientes a la EDAR de Castellón se muestran en la **Figura 4.4** como la media y desviación típica de los logaritmos en base 10 de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro (UFC/mL). En el caso de los coliformes fecales, tanto la población total, representada por la barra de control +, como las poblaciones de coliformes fecales resistentes a tetraciclinas y ciprofloxacina, se detectan tanto en las aguas de influente y efluente, siendo menores en la muestra de efluente. En ambos tipos de muestras de agua se observa una menor población de coliformes resistentes a ciprofloxacina. En el caso de la población de enterococos fecales, se observan resultados similares a los descritos para los coliformes fecales, no habiendo una disminución significativa en las muestras de efluentes respecto a las de influentes. De nuevo, se observa que las poblaciones de enterococos resistentes a la ciprofloxacina son menores a las de tetraciclinas.

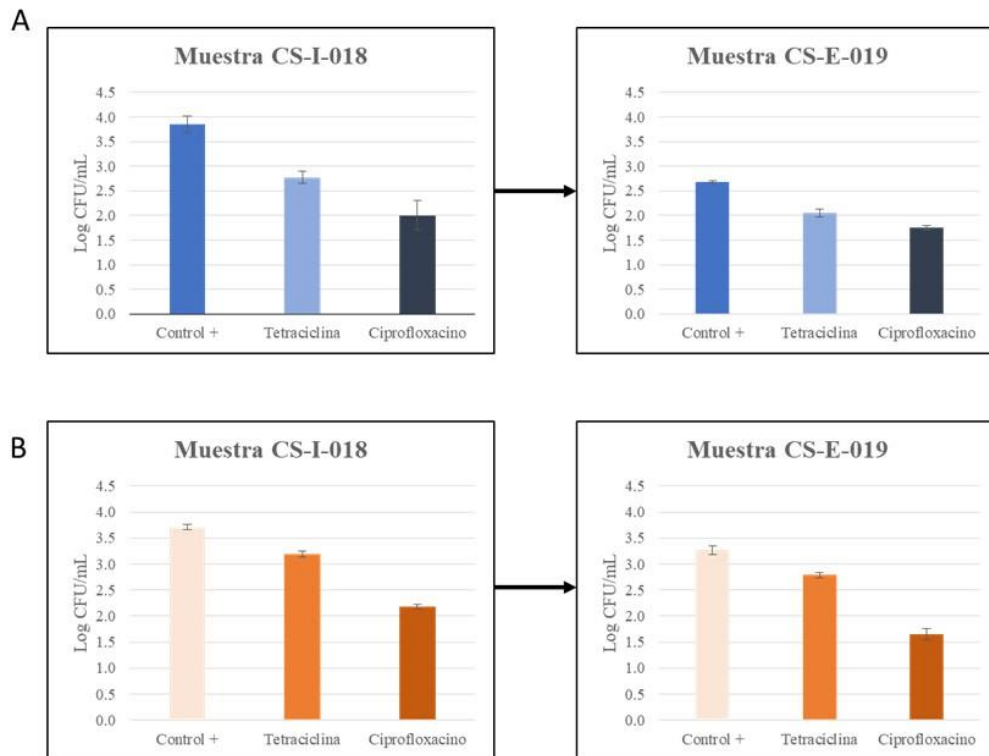


Figura 4.4. Poblaciones de coliformes fecales (A) y enterococos (B), totales (control +) y resistentes a tetraciclinas o ciprofloxacina correspondientes a las muestras de agua residual de la EDAR de Castellón.

En el caso de la EDAR de Borriana (ver **Figura 4.5**) se muestran resultados diferentes a los observados anteriormente para la EDAR de Castellón. En el caso de los coliformes fecales, aunque se observa una disminución de las poblaciones totales y resistentes a ambos antibióticos en el caso de las muestras de efluentes respecto a las de influente, la población de coliformes resistentes a ciprofloxacina, es ligeramente superior a la población resistente a tetraciclina. En el caso de los enterococos, se observa presencia de las tres poblaciones bacterianas en el influente, pero no en el efluente, de hecho, se observa una disminución en la población resistente a tetraciclinas y ausencia de la población resistente a ciprofloxacina.

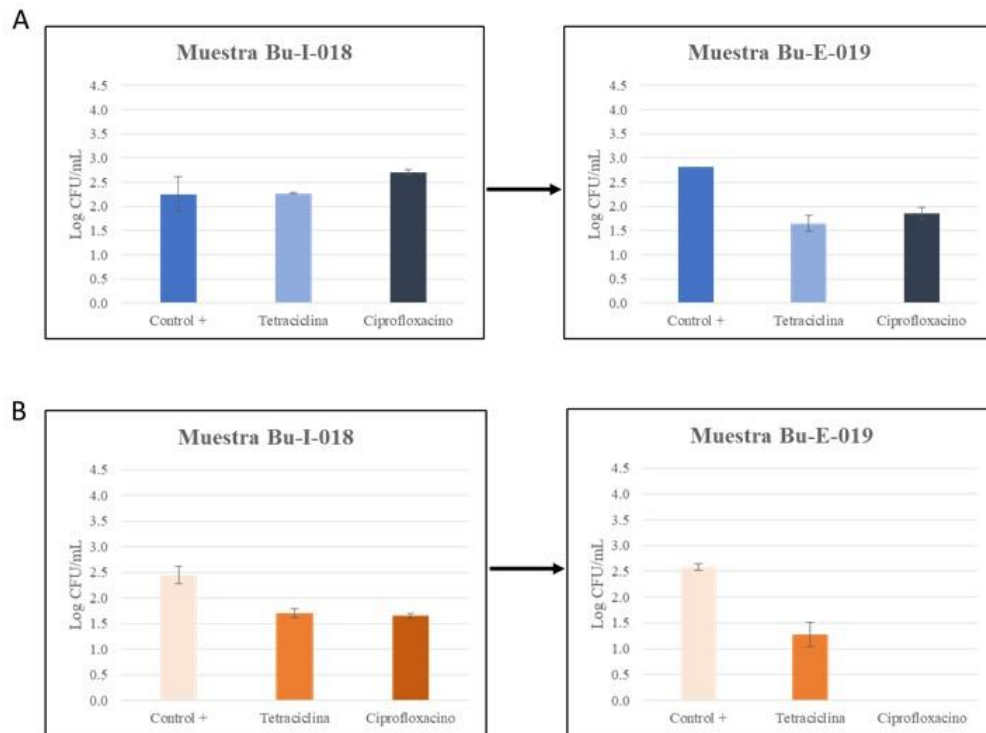


Figura 4.5. Poblaciones de coliformes fecales (A) y enterococos (B), totales (control +) y resistentes a tetraciclinas o ciprofloxacina correspondientes a las muestras de agua residual de la EDAR de Borriana.

Por último, los resultados obtenidos para las muestras de aguas residuales de la EDAR de Alcora se muestran en la **Figura 4.6**. En este caso, las poblaciones de coliformes fecales, totales y resistentes a ambos antibióticos, fueron elevadas en las muestras de influente, siendo especialmente elevadas en el caso de la población resistente a ciprofloxacina, haciendo imposible el conteo de colonias, incluso en la muestra más diluida (1/100). Sin embargo, las poblaciones bacterianas (control y resistentes a antibióticos) disminuyeron en las muestras de efluente, siendo ligeramente menor la población de resistentes a tetraciclinas respecto al control y a la de ciprofloxacina. Por lo que respecta a la población de enterococos, las tres poblaciones bacterianas mostraron elevados valores en las muestras de influente, pero disminuyeron drásticamente en las muestras de efluente, siendo incluso inexistente en el caso de la población de enterococos resistentes a ciprofloxacino.

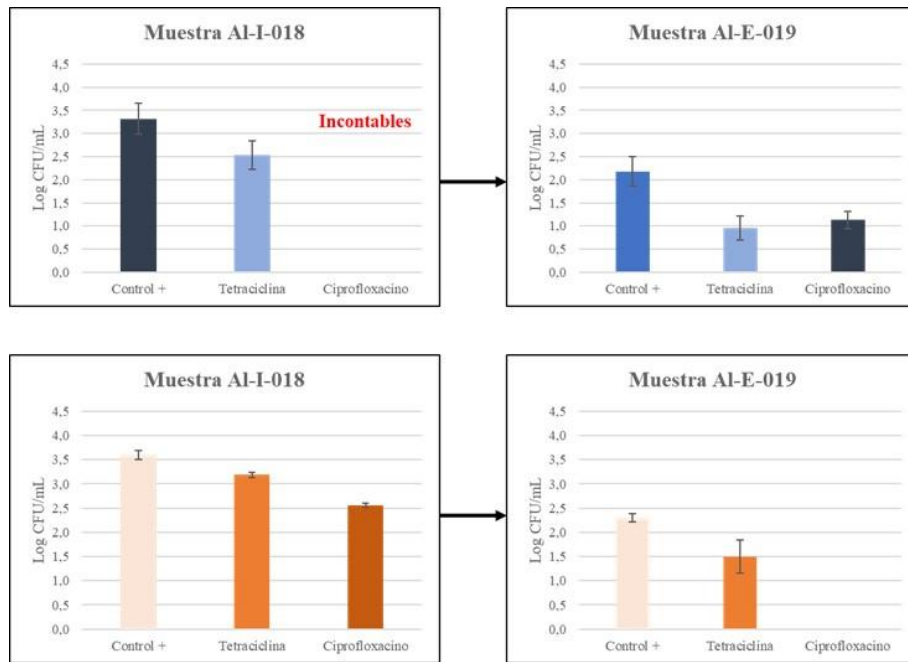


Figura 4.6. Poblaciones de coliformes fecales (A) y Enterococos (B), totales (control +) y resistentes a tetraciclinas o ciprofloxacina correspondientes a las muestras de agua residual de la EDAR de Alcora.

Cultivo de bacterias viables a partir de muestras de aguas glicerinadas

El análisis microbiológico de cualquier muestra ambiental o clínica requiere que dichas muestras sean recogidas, transportadas y almacenadas en condiciones óptimas para poder cultivar y aislar el mayor número de microorganismos viables presentes. Puesto que pueden existir situaciones que impiden que el análisis microbiológico pueda realizarse inmediatamente después de la recogida de muestras, se procedió a evaluar el impacto que tendría el almacenamiento de las muestras de aguas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ añadiendo 15% de glicerol.

Para ello, se tomaron como referencia las mismas muestras de aguas analizadas en el apartado anterior (CS-I-018, CS-E-019, BU-I-018, BU-E-019, AL-I-018 y AL-E-019). Se aplicó el mismo procedimiento, pero a partir de una alícuota que fue previamente congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un 15% de glicerol para su conservación.

A modo de ejemplo, las **Figuras 4.7** y **4.8** muestran los datos del estudio microbiológico (poblaciones bacterias como log UFC/mL) para las muestras, frescas y gliceras, de agua residual de influente y efluente de las EDARES de Castelló y Borriana, respectivamente. En las muestras de Castelló, los resultados indican que el almacenamiento de las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un 15% de glicerol es un método adecuado para preservar las poblaciones microbianas, ya que en la mayoría de los casos se obtienen resultados muy similares entre las muestras frescas y las

glicerinas, tanto de influente como de efluente. Principalmente se observa una buena correlación en el caso de las poblaciones de enterococcos. En el caso de las poblaciones de coliformes fecales, incluso se observa valores más elevados en las muestras glicerinas respecto a las frescas. En el caso de las muestras de Borriana, se observan resultados similares a los obtenidos para las aguas de Castelló. De hecho, en las muestras de efluentes se consigue recuperar un porcentaje de la población de enterococcos resistentes a ciprofloxacina.

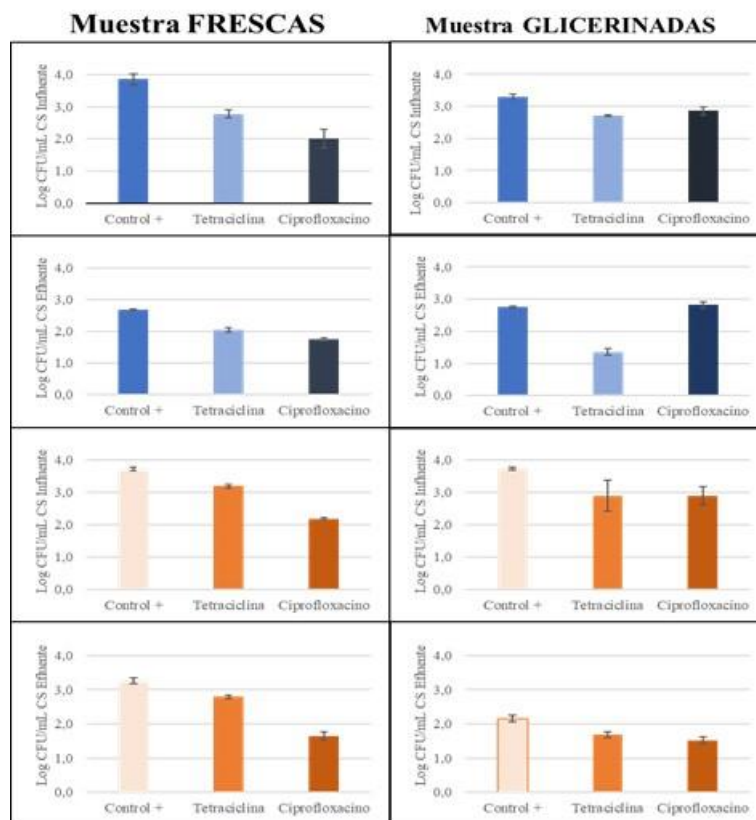


Figura 4.7. Estudio microbiológico (poblaciones bacterias como log UFC/mL) para las muestras de influente y efluente de la **EDAR de Castelló**, comparando las muestras frescas con las glicerinas almacenadas a -20 °C con un 15% de glicerol. Las poblaciones de enterococcos se muestran con barras naranjas y las de coliformes fecales con barras azules.

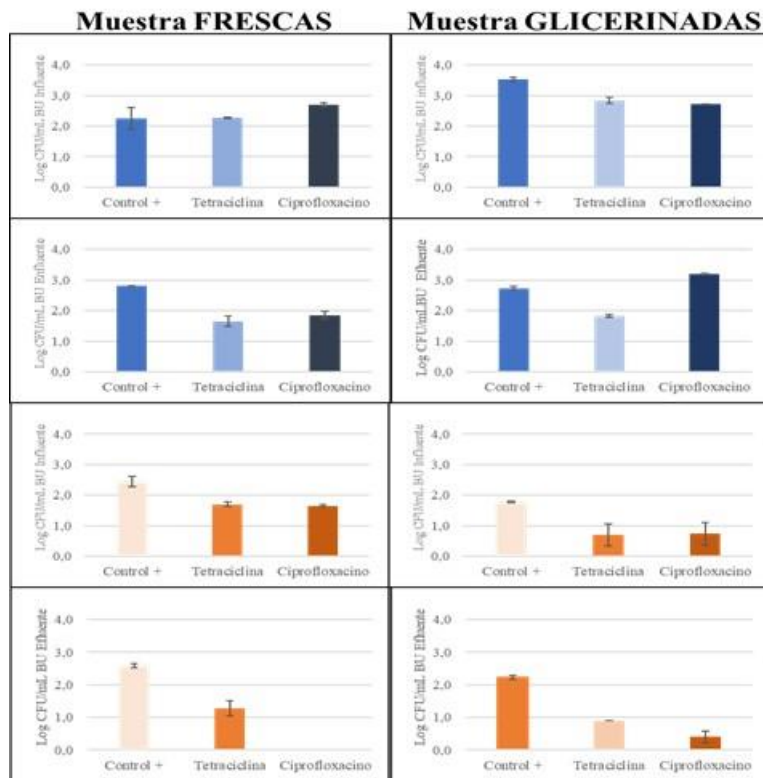


Figura 4.7. Estudio microbiológico (poblaciones bacterias como log UFC/mL) para las muestras de influente y efluente de la **EDAR de Borriana**, comparando las muestras frescas con las glicerinadas almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un 15% de glicerol. Las poblaciones de enterococcos se muestran con barras naranjas y las de coliformes fecales con barras azules.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bellver-Domingo, A., Maldonado-Devis, M., Hernández-Sancho, F., Carmona, E., Picó, Y., 2019. Identification of effective parameters for anti-inflammatory concentration in València City's wastewater using fuzzy-set qualitative comparative analysis. *Sci Tot. Environ.* 663, 110-124
- Bijlsma, L., Pitarch, E., Fonseca, E., Ibáñez, M., Botero, A.M., Claros, J., Pastor, L., Hernández, F., 2021. Investigation of pharmaceuticals in a conventional wastewater treatment plant: Removal efficiency, seasonal variation and impact of a nearby hospital. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105548
- Botero-Coy, A.M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, J., Castillo, N., Arias-Marín, L.P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R.A., Moncayo-Lasso, A., Hernández, F., 2018. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Sci. Total Environ.* 642, 842-853
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S.P., Wiest, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res.* X 7, 100045
- Derco, J., Gotvajn, A.Z., Cizmárová, O., Dudás, J., Sumegová, L., Simovicová, K., 2021. Removal of micropollutants by ozone-based processes. *Processes* 9, 1013
- European Commission. Decision (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 Establishing a Watch List of Substances for Union-Wide Monitoring in the Field of Water Policy Pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union* 2022, 48-
- Ferré-Aracil, J., Valcárcel, Y., Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., Cardona, S.C., Navarro-Laboulais, J., 2016. Ozonation of hospital raw wastewaters for cytostatic compounds removal. Kinetic modelling and economic assessment of the process. *Sci. Total Environ.* 556, 70-79
- Fonseca, E., Hernández, F., Ibáñez, M., Rico, A., Pitarch, E., Bijlsma, L., 2020. Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a Mediterranean river in Eastern Spain. *Environ. Int.* 144, 106004
- Giwa, A., Yusulf, A., Balogun, H.A., Sambudi, N.S., Bilad, M.R., Adeyemi, I., Chakraborty, S., Curcio, S., 2021. Recent advances in advanced oxidation processes for removal of contaminants from water: A comprehensive review. *Process Safety Environ. Protection* 146, 220-256
- López, F.J., Pitarch, E., Botero-Coy, A.M., Fabregat-Safont, D., Ibáñez, M., Marín, J.M., Peruga, A., Ontañón, N., Martínez-Morcillo, S., Olalla, A., Valcárcel, Y., Varó, I., Hernández, F., 2022. Removal efficiency for emerging contaminants in a WWTP from Madrid (Spain) after secondary and tertiary treatment and environmental impact on the Manzanares River, *Sci. Tot. Environ.* 812, 152567
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 4373-4382. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.06.038>
- Pärnänen, K.M.M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martínez, J.L., Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sorum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Varela Della Giustina, S., Walsh, F., Vaz-Moreira, I., Virta, M., Manaia, C.M. 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Advance* 5(3)
- Qi, F., Chu, W., Xu, B., 2015. Ozonation of phenacetin in associated with a magnetic catalyst CuFe₂O₄: The reaction and transformation. *Chem. Eng. J.* 262, 552-562. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.068>

- SANTE/12682/2019. European Commission, 2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Directorate-General for Health and Food Safety
- Singh, A., 2021. A review of wastewater irrigation: environmental implications. *Resour. Conserv. Recycl.* 168, 105454
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, F.R., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J. Hazard. Mat.* 344, 146-162
- Staehelin, J., Hoigne, J., 1985. Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical Chain Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1206–1213. <https://doi.org/10.1021/es00142a012>
- Wang, J., Chen, H., 2020. Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: recent advances and perspective. *Sci. Total Environ.* 704, 135249

ANEXO 1

Metodología analítica para fármacos

La determinación del resto de fármacos también se ha llevado a cabo mediante la inyección directa de las muestras de agua, sin tratamiento/pre-concentración previo. La metodología aplicada en este estudio es la que se viene aplicando en los últimos años en el IUPA para la determinación de fármacos en aguas residuales, y está continuamente sometida a evaluación a través del análisis de numerosos controles de calidad (QC) con resultados satisfactorios. Por consiguiente, no se ha llevado a cabo la validación de esta metodología.

Preparación de las muestras

Todas las muestras de agua se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos y se prepararon del siguiente modo:

- Influyente: 200 μL de muestra, 750 μL de agua MilliQ y 50 μL de disolución ILIS de 10 ng mL^{-1} en metanol se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 5$ de la muestra)
- Efluente: 500 μL de muestra, 450 μL de agua MilliQ y 50 μL de disolución ILIS de 10 ng mL^{-1} en metanol se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 2$ de la muestra)

Determinación UHPLC-MS/MS

El análisis de las muestras se ha llevado a cabo en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, MA., USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK) utilizando la interfase electrospray (ESI).

Columna: Cortecs C18 2.7 μm , 100 \times 2.1 mm (Waters)

Fase móvil:

- Disolvente A: agua 0.01% ácido fórmico y 1 mM acetato amónico
- Disolvente B: metanol 0.01% ácido fórmico y 1 mM acetato amónico

Gradiente fase móvil:

tiempo (min)	% A	% B
0.00	95	5
9.00	5	95
9.10	1	99
10.00	1	99
10.10	95	5
12.00	95	5

Flujo fase móvil: 0.400 mL/min; Volumen de inyección:50 µL

La **Tabla A1** muestra las condiciones MS/MS utilizadas para los fármacos seleccionados, así como la familia terapéutica a la que pertenecen. Se indica el modo de ionización (ESI), la energía de cono, las transiciones seleccionadas -cuantificación (Q) y confirmación (q)-, y las respectivas energías de colisión (EC). En la **Tabla A2** se incluyen las condiciones de medida para los ILIS que se han utilizado.

Tabla A1. Condiciones MS/MS para los fármacos

Compuesto	Familia terapéutica	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transiciones q	EC (eV)
Acetaminophen	<i>Analgesic</i>	+	10	152 > 110	15	152 > 93 152 > 65	20 25
Alprazolam	<i>Benzodiazepine</i>	+	10	309 > 281	25	309 > 274 309 > 205	25 25
Atorvastatin	<i>Hypolipidemic agent</i>	+	10	559 > 440	20	559 > 466 559 > 292	15 25
Carbamazepine	<i>Antiepileptic</i>	+	10	237 > 194	20	237 > 179 237 > 192	25 10
Ciprofloxacin	<i>Antibiotic</i>	+	10	332 > 245	20	332 > 231 332 > 294	20 25
Clarithromycin	<i>Antibiotic</i>	+	10	748 > 158	35	748 > 590 748 > 83	15 35
Clindamycin	<i>Antibiotic</i>	+	10	425 > 126	20	425 > 377 425 > 389	20 15
Diclofenac	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory</i>	+	10	296 > 214	30	296 > 250 296 > 278	10 5
Enalapril	<i>Antihypertensive</i>	+	10	377 > 234	15	377 > 303 377 > 177	15 25
Erythromycin	<i>Antibiotic</i>	+	10	734 > 158	25	576 > 158 576 > 116	25 30
Flumequine	<i>Antibiotic</i>	+	10	262 > 202	30	262 > 126 262 > 146	40 40
Furaltadone	<i>Antibiotic</i>	+	10	325 > 100	20	325 > 281 325 > 252	10 15
Gabapentin	<i>Antiepileptic</i>	+	10	172 > 154	15	172 > 137 172 > 95	15 20
Iopromide	<i>X-ray contrast agent</i>	+	10	792 > 573	30	792 > 559 792 > 445	30 30
Irbesartan	<i>Antihypertensive</i>	+	10	429 > 207	25	429 > 195 429 > 180	20 25
Levamisole	<i>Anthelmintic agent</i>	+	10	205 > 178	20	205 > 91 205 > 123	25 25
Lincomycin	<i>Antibiotic</i>	+	10	407 > 126	20	407 > 359 407 > 389	15 15
Lorazepam	<i>Benzodiazepine</i>	+	10	321 > 275	20	321 > 303 321 > 229	15 25
Losartan	<i>Antihypertensive</i>	+	10	423 > 405	10	423 > 377 423 > 207	15 15
Metoprolol	<i>Beta-blocker agent</i>	+	10	268 > 116	15	268 > 74 268 > 191	20 15
Metronidazole	<i>Antibiotic</i>	+	10	172 > 128	15	172 > 82 172 > 56	20 20
Nalidixic acid	<i>Antibiotic</i>	+	10	233 > 215	10	233 > 187 233 > 159	25 25

Compuesto	Familia terapéutica	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transiciones q	EC (eV)
Norfloxacin	<i>Antibiotic</i>	+	10	320 > 233	25	320 > 282 320 > 256	30 20
Oxolinic adic	<i>Antibiotic</i>	+	10	262 > 244	15	262 > 216 262 > 283	25 25
Pantoprazole	<i>Antiulcer drug</i>	+	10	384 > 200	10	384 > 138 384 > 153	25 15
Phenazone	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory</i>	+	10	189 > 58	20	189 > 104 189 > 131	20 20
Primidone	<i>Antiepileptic</i>	+	10	219 > 162	10	219 > 119 219 > 91	15 20
Roxithromycin	<i>Antibiotic</i>	+	10	419 > 83	15	419 > 158 419 > 116	25 15
Salbutamol	<i>Beta-blocker agent</i>	+	10	240 > 148	15	240 > 222 240 > 166	10 10
Sulfadiazine	<i>Antibiotic</i>	+	10	251 > 156	15	251 > 92 251 > 108	25 20
Sulfamethoxazole	<i>Antibiotic</i>	+	10	254 > 156	15	254 > 92 254 > 108	25 20
Tetracycline	<i>Antibiotic</i>	+	10	445 > 410	15	445 > 154 445 > 427	25 10
Tramadol	<i>Analgesic</i>	+	10	264 > 58	10	264 > 246 264 > 121	10 25
Trimethoprim	<i>Antibiotic</i>	+	10	291 > 123	25	291 > 230 291 > 261	20 25
Valsartan	<i>Antihypertensive</i>	+	10	436 > 207	25	436 > 235 436 > 291	15 15
Venlafaxine	<i>Antidepressant</i>	+	10	278 > 58	15	278 > 260 278 > 121	10 25
OD Venlafaxine	<i>Antidepressant</i>	+	10	264 > 246	10	264 > 107 264 > 133	25 20

Tabla A2. Condiciones MS/MS para los patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) utilizados en el análisis de fármacos

Compuesto	ESI	CV (V)	Transiciones	CE (eV)
Acetaminophen d ₄	+	10	156.0 > 114.0	10
Atorvastatin d ₅	+	10	564.0 > 445.0	20
Carbamazepine Epoxide d ₁₀	+	30	263.2 > 190.0	30
Ciprofloxacin d ₈	+	20	340.2 > 235.0	40
Clarithromycin d ₇	+	10	752.2 > 162.1	30
Diclofenac d ₄	+	10	300.1 > 219.2	20
Enalapril d ₅	+	10	382.3 > 239.2	20
Erithromycin ¹³ C ₄	+	20	738.3 > 162.1	25
Flumequine ¹³ C ₃	+	10	265.0 > 205.0	25
Gabapentin ¹³ C ₃	+	10	175.1 > 157.1	15
Iopromide d ₃	+	10	794.9 > 561.9	25
Irbesartan d ₆	+	10	435.1 > 213.3	25
Levamisol d ₅	+	20	210.2 > 183.1	25
Losartan d ₄	+	10	427.1 > 211.1	20
Metronidazole d ₃	+	20	175.0 > 131.0	15
Metropolol d ₇	+	10	275.2 > 123.1	20
Nalidixic acid d ₅	+	10	238.1 > 220.1	15
Norfloxacin d ₅	+	20	325.1 > 231.0	35
Oxolinic acid d ₅	+	10	267.0 > 248.9	15
Pantoprazole d ₆	+	10	390.1 > 206.0	10
Primidone d ₅	+	20	224.1 > 167.0	10
Roxithromycin d ₇	+	20	422.2 > 158.0	15
Salbutamol d ₃	+	20	243.2 > 151.0	20
Sulfadiazine ¹³ C ₄	+	10	257.1 > 162.1	10
Sulfamethoxazole ¹³ C ₆	+	10	260.0 > 162.0	15
Tetraciclina d ₆	+	10	451.1 > 416.0	15
Tramadol ¹³ Cd ₃	+	20	268.1 > 57.9	15
Trimethoprim ¹³ C ₃	+	20	294.1 > 123.1	25
Valsartan d ₈	+	10	444.0 > 207.0	25
Venlafaxine d ₆	+	30	284.1 > 64.0	30

Cuantificación

La cuantificación se ha realizado mediante el método del patrón interno (para aquellos compuestos con ILIS) o del patrón externo (cuando no se aplicó ILIS), con curvas de calibrado preparadas en agua HPLC:metanol (90:10, v/v).

Las disoluciones patrón de calibrado se han preparado mediante dilución de diferentes mezclas patrón de todos los antibióticos estudiados. El rango de concentración nominal de las curvas de calibrado ha sido ente 1 y 5000 ng L⁻¹. Como valor límite de cuantificación se ha considerado el correspondiente al punto del calibrado de menor concentración (*lowest calibration level*, LCL) teniendo en cuenta la dilución de las aguas de influente (LCLx5) y de efluente (LCLx2).

Metodología tratamientos avanzados con ozonización catalítica

Síntesis de los catalizadores

Para llevar a cabo la síntesis y caracterización de los diferentes materiales catalíticos utilizando el óxido de manganeso como centro activo (MnO_2) soportado en diferentes tipos de zeolitas comerciales: zeolita Y. Se emplearon como soportes las zeolitas comerciales, zeolita Y (adquiridas en *zeolyst international*) con relaciones molares $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$: 60 y 12 (H-CBV760 y NH4-CBV712, abreviadas en este informe como ZY60 y ZY12). Inicialmente las zeolitas de partida se intercambiaron con sodio con el fin de eliminar los centros ácidos, que podrían afectar en la descomposición del ozono. El intercambio de sodio (Na) se llevó a cabo sumergiendo las zeolitas en una disolución acuosa de NaCl (2.5 M, relación líquido/sólido de 10) a 80 °C durante 1 h. El sólido se filtró, se lavó con agua destilada y se secó a 100 °C durante 30 min. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, la muestra se calcinó a 450 °C durante 3 h. El método de síntesis de los catalizadores (MnO_2 /zeolita) fue preparado siguiendo el método de impregnación húmeda a volumen de poro usando cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) como agente precursor. La impregnación se llevó a cabo por la adición sobre la zeolita ZY60 y ZY12, de una disolución acuosa del precursor, para obtener un 10% en peso de MnO_2 en los catalizadores preparados. Posteriormente, la mezcla se dejó secando a temperatura ambiente por 24 h y luego se calcinó en mufla a 450°C durante 3 h para obtener los catalizadores, MnO_2 /ZY60 y MnO_2 /ZY12. La selección de la temperatura de calcinación se realizó en base a previos análisis termogravimétricos.

Configuración experimental empleada y procedimiento

Los ensayos de ozonización catalítica se llevaron a cabo en un reactor de semi-batch de capacidad 1 L con un diámetro de 65 mm. El sistema de trabajo estaba monitorizado mediante un software (Sadyco_v6.5, ver figura 2) que permitía adaptar las diferentes condiciones del ensayo y registrar la evolución de la reacción. La corriente de gas de ozono fue proporcionada por un generador de ozono (Ozone Solutions TG-20) alimentado por oxígeno puro. La mezcla de ozono-oxígeno se reguló mediante controladores de caudal másico digitales y se alimentó al reactor a través de un difusor de placa porosa de vidrio ubicado en el fondo del reactor de columna, con un caudal de gas de 2.0 L/ min y con una concentración de 6.1 g N/m^3 . La concentración de ozono en fase gas se midió utilizando un analizador de ozono BMT 964, que consiste en un espectrofotómetro de absorbancia UV a 254 nm, el cual es capaz de medir concentraciones hasta 200 g N/m^3 . Para medir la concentración de ozono disuelto se empleó

una sonda óptica conectada mediante fibra óptica a una fuente luminosa de deuterio/wolframio (Ocean Optics DH2000S) y a un espectrofotómetro de alta resolución HR4000. El espectrómetro es capaz de realizar medidas del espectro completo entre 200 y 1100 nm con una resolución de 0.02 nm y tiempos de integración mínimos de 4 ms. El muestreo de datos se realiza por lo general cada 500 ms. Este espectrofotómetro se encuentra conectado por vía USB al ordenador. Los ensayos de ozonización catalítica se realizaron con la misma masa de catalizador, para todos los casos 0.2 g/L, a temperatura ambiente. Las muestras líquidas se extrajeron a través de un puerto de muestreo en diferentes momentos y se adicionaba una solución 0.1 M de tiosulfato de potasio para eliminar el ozono disuelto residual. Para los ensayos, la concentración de ozono se fijaba haciendo pasar la corriente de salida del ozonizador por el by-pass. Se modificaba la posición del potenciómetro del ozonizador hasta que la señal del detector permaneciera constante. En este momento se hacía circular la corriente de gases por el reactor y se recogían las variaciones del sistema. A la hora de iniciar el experimento el software (ver **Figura A1**) cierra la válvula de entrada de aire al reactor (V1) y la de entrada al by-pass (V3) y abre la válvula que controla la entrada al reactor (V2), de esta manera la corriente de salida del ozonizador deja de circular por el by-pass y entra al reactor, donde se lleva a cabo la reacción de ozonización catalítica.

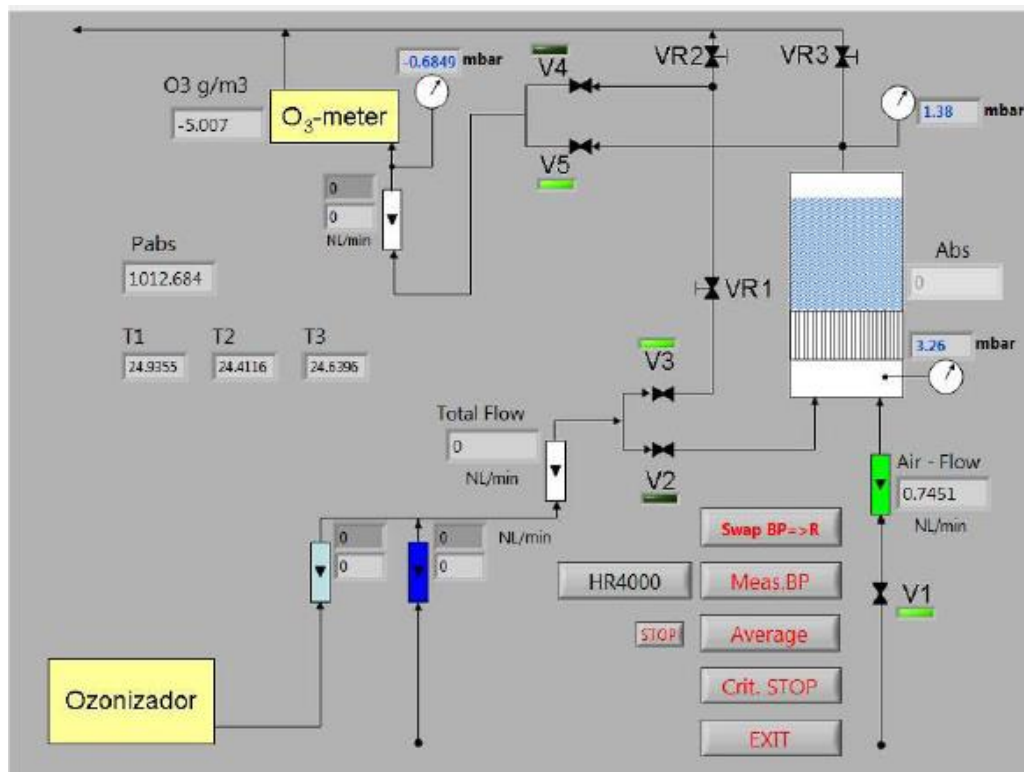


Figura A1. Software utilizado en el control del proceso y registro de datos experimentales.

Metodología resistencia a antibióticos

Extracción de ADN y PCR cuantitativa en tiempo real

Las muestras de aguas residuales (25-50 mL influentes y 150-400 mL de efluentes) se filtraron a través de membranas de policarbonato estériles (porosidad de 0,22 μ m; Whatman, Reino Unido) y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ADN. La extracción de ADN de las muestras de aguas residuales se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el kit DNeasy PowerWater. La cantidad y calidad del ADN se midió con NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Alemania).

La detección y cuantificación de los GRA se llevó a cabo mediante el uso de la PCR cuantitativa (qPCR). En primer lugar, se ajustaron las concentraciones de todas las muestras de ADN (obtenida mediante el Nanodrop) y se guardaron en el congelador a -20 °C. Para cada gen se prepararon curvas de calibrado utilizando para ello los correspondientes plásmidos control con concentración conocida. Para todas las curvas se prepararon 6 puntos, correspondientes a diluciones decrecientes, excepto para qnrS y Bla-CTX que la curva se realizó con 7 puntos.

Las placas de qPCR de 96 pocillos se cargaron con las muestras de ADN, los controles negativos y las curvas patrón siguiendo la disposición que se muestra en la **Figura A2**. Cada pocillo contiene un volumen final de 20 μ L. En primer lugar, se añaden 15 μ L de mezcla que contiene la master mix, los cebadores de los genes correspondientes y agua, y, por último, se adicionan los 5 μ L restantes del ADN de cada una de las muestras.

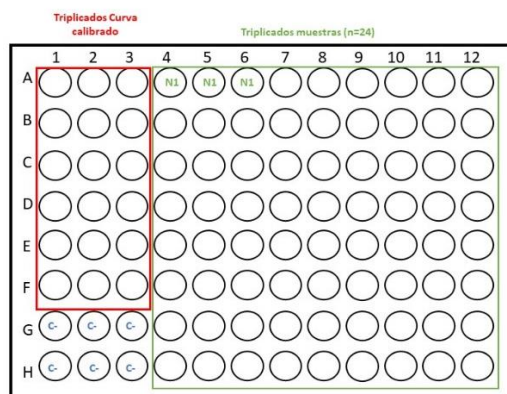


Figura A2. Disposición de la placa de PCR de 96 pocillos para analizar cada gen de resistencia, junto a la curva de calibrado de dicho gen, las muestras de ADN de las aguas a estudiar y los controles negativos donde no se añade ADN

El protocolo de qPCR que se ha seguido para todos los genes es el siguiente:

1. 50 °C ----- 2min
2. 95 °C----- 5min
3. 40 ciclos de
 - 95°C-----15 seg
 - 60°C-----3 seg

Por último, los valores de Ct (valor umbral) de cada muestra obtenidos de la qPCR se correlacionan con los valores de Ct de cada curva de calibrado, obteniendo así las copias de cada gen presentes en la muestra. A continuación, se calculan las copias de cada gen/día, teniendo en cuenta tanto el volumen de la DNA extraído, volumen de DNA analizado en la qPCR, y el volumen de agua filtrado.

Caracterización microbiana de las aguas residuales: cultivo de bacterias viables

Las muestras de aguas residuales FRESCAS se caracterizan por los recuentos de coliformes fecales y enterococos, dos grupos de bacterias que se utilizan con frecuencia como indicadores microbiológicos de la calidad del agua. La enumeración bacteriana se realizó en agar de coliformes fecales de membrana (mFC) o en agar Base Slanetz y Bartley, para Enterococos. Estos medios de cultivo fueron suplementados con uno de los siguientes antibióticos: tetraciclina (16 mg /litro), o ciprofloxacina (1 mg/litro). De cada medio de cultivo se prepararon placas sin antibióticos que permitirán conocer la población bacteriana total (control positivo). Las placas de dichos medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y los antibióticos se añadieron cuando el medio alcanzó una temperatura de 50 °C.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones seriadas y se sembró por triplicado una alícuota de 0.5 mL, en dichos medios, de la muestra directa y las diluciones 1/10 y 1/100. La siembra de cada una de las alícuotas/medio de cultivo se realizó empleando un asa de Digralsky para repartir el volumen de manera uniforme. A continuación, las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h para los coliformes y 48 h para los enterococos (**Figura A3**). Tras el tiempo de incubación, se cuantifican las colonias indicativas de coliformes fecales (colonias azules) y las de enterococos fecales (colonias moradas) (**Figura A4**). Los valores se expresan como la media y la desviación típica de las unidades formadoras de colonias por mL de muestra analizada (UFC/mL).

Las muestras de aguas residuales que no pudieron procesarse para el análisis microbiológico el mismo día de su recogida se guardaron a -20 °C, pero previamente se añadió glicerol estéril (concentración final 15% v:v) para garantizar la conservación de las especies microbianas presentes en la muestra de agua, y poder ser estudiadas posteriormente (muestras gliceradas).

El análisis microbiológico de las aguas que pudieron analizarse el mismo día de su recogida, se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En este caso, las aguas residuales se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su análisis (muestras frescas).

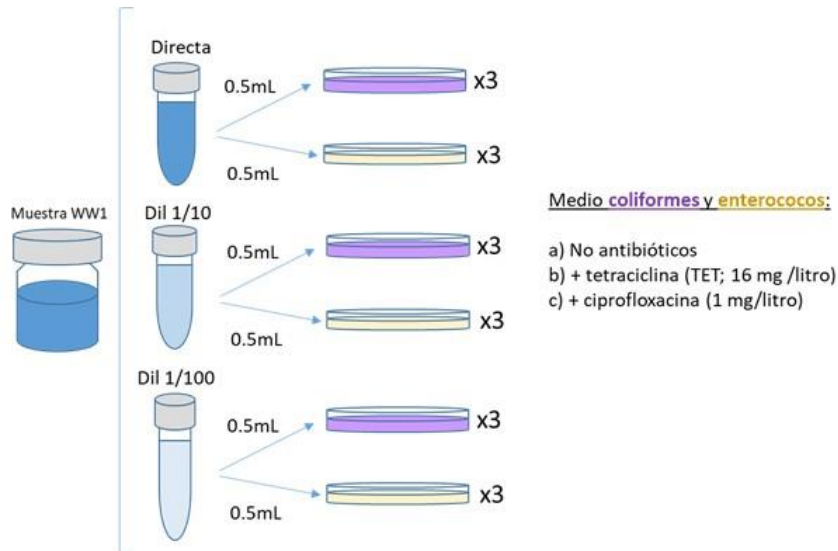


Figura A3. Esquema del análisis microbiológico. Preparación de diluciones seriadas y siembra en placas de medios selectivos para coliformes fecales, agar de coliformes fecales de membrana (mFC) y de enterococos, en agar Base Slanetz y Bartley. Se prepararon placas de cada medio con/sin los antibióticos tetraciclina y ciprofloxacina.

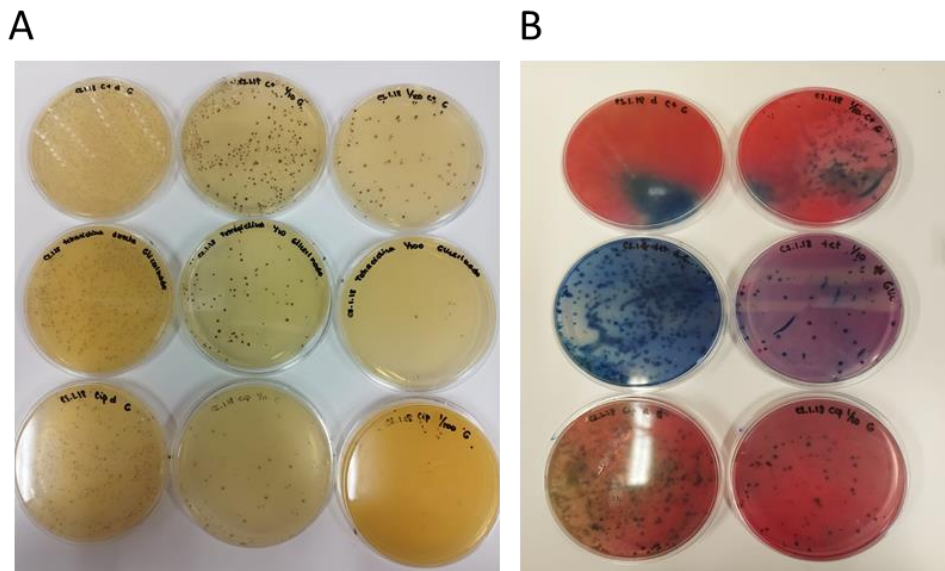


Figura A4. Placas crecidas de los medios de agar de coliformes fecales de membrana (mFC) para coliformes fecales y agar Base Slanetz y Bartley para enterococos. Las placas sembradas con las diluciones seriadas de cada muestra de agua se inocularon en dichos medios con/sin antibióticos y se incubaron a 30 °C durante 48 h para enterococos (A) y 24 h para coliformes (B).