



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO
DE CEPAS BACTERIANAS
DEGRADORAS DE FÁRMACOS
PRESENTES EN LODOS DE
DEPURADORA**

CARMEN MEJÍAS PADILLA



**INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN ESPECIALIZACIÓN PROFESIONAL
EN FARMACIA: INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

**ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE FÁRMACOS
PRESENTES EN LODOS DE DEPURADORA**

CARMEN MEJÍAS PADILLA

**TIPOLOGÍA DE PROYECTO: EXPERIMENTAL
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

**TUTORES:
DOCTOR DON JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ
DOCTORA DOÑA ESMERALDA MORILLO GONZÁLEZ**

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia

Fecha de presentación: julio 2020



JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ, Profesor del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

INFORMA, que el presente trabajo titulado “Enriquecimiento y aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de fármacos presentes en lodos de depuradora” ha sido realizado, bajo mi tutorización y asesoramiento, dentro del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante el curso académico 2019/20, constituyendo la memoria que presenta la Lda. CARMEN MEJÍAS PADILLA como Trabajo Fin de Máster del Máster en Especialización Profesional en Farmacia, especialidad Industria Farmacéutica, y que cumple los requisitos necesarios para ser presentado como Trabajo Fin de Máster.

Y para que conste, a los efectos oportunos, se expide el presente informe en Sevilla, a 6 de julio de 2020.

Fdo.: JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ

VºBº

Fdo.: MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Director del Departamento

RESUMEN

La gestión de lodos de depuradoras constituye un importante problema medioambiental. Gran parte se aplica como enmienda orgánica en agricultura y los contaminantes orgánicos que contienen, entre ellos, fármacos como ibuprofeno, paracetamol, carbamazepina u ofloxacino, se acumulan en los suelos, contaminando aguas superficiales y subterráneas, concentrándose en plantas y animales, y en los seres humanos a través de la cadena alimentaria, siendo fundamental la biorremediación de estos lodos mediante diferentes técnicas tales como el bioaumentación, con bacterias degradadoras específicas de cada contaminante.

Es por ello, que el objetivo del presente trabajo es la búsqueda y aislamiento de cepas bacterianas degradadoras específicas de los citados fármacos. Concretamente se obtuvieron mediante la técnica de cultivos de enriquecimiento del lodo con dichos fármacos el aislamiento de 3 cepas bacterianas para ibuprofeno (I1, I2 e I3), 4 para paracetamol (P1, P2, P3 y P4), 5 para carbamazepina (C1, C2, C3, C4 y C5) y 5 para ofloxacino (O1, O2, O3, O4 y O5).

La demanda biológica de oxígeno (DBO) es una prueba para determinar que las cepas bacterianas aisladas son capaces de usar los distintos fármacos como única fuente de carbono y energía. En esta prueba se observó que sólo las cepas bacterianas C3, C5, P1, P2 y P3 son potencialmente degradadoras de carbamazepina y paracetamol en solución acuosa, respectivamente.

Palabras claves: biodegradación, PPCPs, lodo, cepa bacteriana.

ABSTRACT

The management of sewage sludge constitutes a big environmental problem. The sludge is usually applied as an organic amendment in agriculture and the organic pollutants that it contains, among them, drugs such as ibuprofen, paracetamol, carbamazepine or ofloxacin, accumulate in soils, contaminating surface and underground waters, concentrating in plants and animals, and in the human through the food chain, being fundamental the bioremediation of these sludges by different techniques such as bioaugmentation, with specific degrading bacteria of each pollutant.

For this reason, the objective of this work is to search and to isolate specific bacterial degrading strains of the mentioned drugs. Specifically, we isolated 3 bacterial strains for ibuprofen (I1, I2 and I3), 4 for paracetamol (P1, P2, P3 and P4), 5 for carbamazepine (C1, C2, C3, C4 and C5) and 5 for ofloxacin (O1, O2, O3, O4 and O5). These bacterias were obtained using the sludge enrichment culture technique with these drugs.

Biological oxygen demand (BOD) is a test to determine that isolated bacterial strains are capable of using the different drugs as the only source of carbon and energy. In this test it was observed that only the bacterial strains C3, C5, P1, P2 and P3 are potentially degraders of carbamazepine and paracetamol in aqueous solution, respectively.

Key words: biodegradation, PPCPs, sludge, bacterial strain.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs).....	7
1.2. Tratamientos de lodos de depuradora.....	9
1.3. Contaminantes orgánicos en lodos de depuradora.....	12
1.3.1. Productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) en lodos de depuradora.....	14
1.4. Problemática medioambiental derivada de la presencia de PPCPs en lodos de depuradora.....	16
1.5. Biorrecuperación de lodos de EDARs.....	18
1.5.1. Microorganismos potencialmente degradadores de PPCPs en lodos de EDARs.....	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Materiales.....	23
3.1.1. Fármacos.....	23
3.1.1.1. Ofloxacino	23
3.1.1.2. Carbamazepina.....	23
3.1.1.3. Paracetamol	24
3.1.1.4. Ibuprofeno.....	24
3.1.2. Lodo	25
3.1.3. Cepas bacterianas.....	26
3.1.4. Solución de nutrientes (SNs).....	26
3.1.5. Medios de cultivo	27
3.2. Métodos	28

3.2.1. Enriquecimiento del lodo para la obtención de consorcios microbianos degradadores específicos	28
3.2.2. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras específicas	30
3.2.3. Preparación de los inóculos de las cepas bacterianas.....	31
3.2.4. Demanda biológica de oxígeno	32
3.2.5. Análisis de los fármacos.....	35
3.2.6. Ensayos de biodegradación de fármacos en solución en presencia de cepas bacterianas	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de los distintos fármacos	40
4.2. Demanda biológica de oxígeno.....	42
4.3. Análisis de los fármacos tras los experimentos de DBO.....	45
4.4. Biodegradación de los fármacos en solución en presencia de cepas bacterianas.....	47
5. CONCLUSIONES	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE: Antiinflamatorio no Esteroideo
COX: Ciclooxigenasa
DBO: Demanda Biológica de Oxígeno
EDARs: Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales
EPA: Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LAS: Sulfonatos de Alquilbenzeno Lineales
LB: Luria-Bertani Medium
NPEs: Nonilfenoletoxilados
MSM: Mineral Salt Medium
PAHs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
PCBs: Policlorobifenilos
PCDD/Fs: Dioxinas y furanos
POPs: Persistent Organic Pollutants
PPCPs: Pharmaceutical and Personal Care Products
SNs: Solución de Nutrientes
WRF: White Rot Fungi

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la generación y tratamiento de lodos.....	7
Figura 2. Tratamientos a los que son sometidos los lodos obtenidos en EDARs.....	10
Figura 3. Biodegradación aerobia y mineralización.....	19
Figura 4. Bioaumento y bioestimulación.....	19
Figura 5. Estructura química de ofloxacino.....	23
Figura 6. Estructura química de carbamazepina.....	24
Figura 7. Estructura química de paracetamol.....	24
Figura 8. Estructura química de ibuprofeno.....	25
Figura 9. Esquema del enriquecimiento del lodo.....	29
Figura 10. Esquema del aislamiento de cepas bacterianas.....	30
Figura 11. Esquema del proceso de preparación del inóculo de cada cepa bacteriana.....	31
Figura 12. Reacción química en el oxi-top.....	32
Figura 13. Esquema de la preparación del ensayo de DBO con paracetamol y ofloxacino.....	33

Figura 14. Esquema de la preparación del ensayo de DBO con ibuprofeno y carbamazepina.....	34
Figura 15. Cabezal oxitop y cabina termostática.....	34
Figura 16. Esquema de la preparación ensayo de biodegradación de carbamazepina en solución.....	37
Figura 17. <i>Pseudomonas putida</i>	38
Figura 18. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	38
Figura 19. Esquema de la preparación del ensayo de biodegradación de paracetamol en solución.....	39
Figura 20. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con paracetamol.....	40
Figura 21. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con ibuprofeno.....	41
Figura 22. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con carbamazepina.....	41
Figura 23. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con ofloxacino.....	42
Figura 24. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con ibuprofeno.....	43
Figura 25. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con paracetamol.....	44
Figura 26. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con carbamazepina.....	44
Figura 27. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con ofloxacino.....	45
Figura 28. Gráfica de porcentaje remanente de ibuprofeno a los 20 días.....	45
Figura 29. Gráfica de porcentaje remanente de ofloxacino a los 20 días.....	46
Figura 30. Gráfica de porcentaje remanente de paracetamol a los 20 días.....	46
Figura 31. Gráfica de porcentaje remanente de carbamazepina a los 20 días.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del lodo utilizado.....	25
Tabla 2. Nomenclatura utilizada para las bacterias aisladas de lodo contaminado con los distintos fármacos.....	26
Tabla 3. Composición de la solución de nutrientes.....	27
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados.....	28
Tabla 5. Factor de conversión de valores obtenidos en el experimento de DBO según el volumen de muestra usado.....	35
Tabla 6. Características de los métodos utilizados en HPLC-UV para cada fármaco.....	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs)

Las EDARs son plantas dedicadas a la depuración de aguas residuales, cuya función básica es recoger las aguas de una población no industrial, y después de reducir la contaminación mediante ciertos tratamientos y procesos, la devuelve a un cauce receptor como un río, embalse, mar, etc. Por lo tanto, su objetivo es el de eliminar residuos, aceites, grasas, arenas y sólidos sedimentables, así como eliminar compuestos como amoníaco y fósforo de las aguas, y también transformar los residuos generados, denominados lodos de depuradora, en lodos estables y velar porque sean utilizados correctamente. En las EDARs se llevan a cabo una serie de tratamientos y procesos los cuales se presentan en la figura 1.

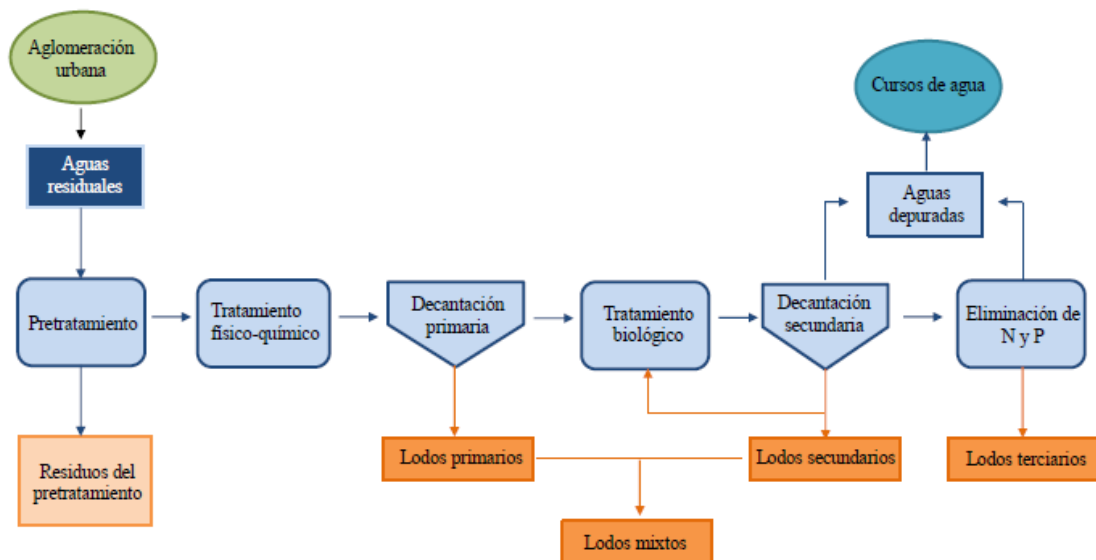


Figura 1. Esquema de la generación y tratamiento de lodos (Ministerio para la Transición Ecológica y el reto Demográfico, 2020).

A modo de resumen, se procede a narrar las diferentes etapas que ocurren en una EDAR:

Pretratamiento. El primer paso que se lleva a cabo en las EDARs es el pretratamiento, el cual es un proceso físico en el que se eliminan los sólidos grandes, arenas, grasas y otros elementos que pudieran ocasionar problemas en los tratamientos posteriores. En este tratamiento se utilizan procesos tales como desbaste de gruesos, desbaste de finos o desarenado-desengrasado.

Tratamiento físico-químico. A continuación, tiene lugar el tratamiento primario o físico-químico, en el cual se lleva a cabo la eliminación de sólidos en suspensión (sólidos inertes, materia orgánica particulada...). Los métodos utilizados para ello pueden ser:

- Decantador primario: se utiliza la fuerza de la gravedad para que sedimenten los sólidos.
- Flotador por aire disuelto: se separan las partículas en suspensión mediante burbujas de aire.
- Tratamiento químico: se adicionan reactivos (tales como coagulantes, antiespumantes, floculantes...) para aumentar la formación de sólidos sedimentables a partir de sólidos disueltos, basándose en métodos químicos, tales como la oxidación, floculación, neutralización o coagulación, entre otros.

Decantación primaria. Tras estos procesos, tiene lugar la decantación primaria, en la cual se produce la separación entre el agua y el lodo generado, al que llamaremos lodo primario.

Tratamiento biológico. Posteriormente, se produce el tratamiento secundario o biológico, en el cual se transforma la materia orgánica del agua residual en materia celular, gases, energía y agua. Para ello, se utiliza la digestión aerobia o anaerobia, existiendo diversos métodos de depuración, como por ejemplo, lodos activados (también llamado fangos activos o barros activados), este proceso es la técnica más frecuentemente utilizada en esta etapa, éste se basa en la utilización de una población diversa de microorganismos los cuales convierten constituyentes orgánicos biodegradables de las aguas residuales, y ciertas fracciones inorgánicas, en nueva biomasa y subproductos, que posteriormente son eliminados por arrastre gaseoso, sedimentación, o por otros medios físicos. Hay varias formas en las que se opera este proceso, que van desde sistemas muy básicos (por ejemplo, zanjas de oxidación) a sistemas más avanzados (por ejemplo, los biorreactores de membrana).

Decantación secundaria. Tras el tratamiento biológico, se lleva a cabo la decantación secundaria, en la cual se produce la separación entre el agua y el lodo generado en el proceso biológico, al cual llamaremos lodo secundario. Los lodos primarios y secundarios pueden unirse formando los denominados lodos mixtos.

Tratamiento terciario. Por último, se produce el tratamiento terciario, el cual sólo ocurre en EDARs que vierten sus aguas depuradas a zonas protegidas. En este tratamiento ocurre la eliminación de nutrientes (N y P) por lo que puede ser necesario dosificar algún tipo de reactivo, de cara a precipitar el fósforo. También ocurre la desinfección, intentándose reducir la cantidad de microorganismos patógenos en el agua, mediante luz ultravioleta, filtración, cloración, ósmosis inversa, entre otros procesos (García-Astillero, 2018). Tras esta etapa se obtienen los lodos terciarios.

Es por todo esto que los lodos de depuradora consisten en una mezcla de agua y sólidos separada del agua residual, como resultado de procesos naturales o artificiales de las distintas etapas de depuración de las aguas residuales, que se generan en las EDARs. Según los datos del Registro Nacional de Lodos, en España se producen anualmente aproximadamente 1.200.000 toneladas (en materia seca) de estos lodos de depuradora. Son un residuo extremadamente líquido (más de un 95% de agua) y su composición es variable, dependiendo de las características técnicas de los tratamientos llevados a cabo en las aguas residuales (Ministerio para la Transición Ecológica y el reto Demográfico, 2020). Los lodos pueden clasificarse según su procedencia en:

- **Lodos urbanos:** el agua tratada en la EDAR tiene un componente predominantemente urbano. La cuenca de recogida de aguas está formada por aguas domésticas y de pequeña y mediana empresa ubicada dentro de los cascos urbanos.
- **Lodos industriales:** son los lodos generados en estaciones de tratamiento de vertidos industriales o con una predominancia de éstos.

1.2. Tratamientos de lodos de depuradora

Tradicionalmente, el exceso de lodos generados ha sido vertido al mar, depositados en vertederos o incinerados. Sin embargo, debido a las estrictas regulaciones medioambientales en los países desarrollados, esta práctica está siendo prohibida y reemplazada por diferentes tratamientos (figura 2), cuyos objetivos principales son la estabilización de los biosólidos generados, reduciendo su capacidad de fermentación y la presencia de organismos patógenos y la estabilización de la materia orgánica del lodo, obteniendo un menor volumen de un residuo más manejable y prácticamente inerte.



Figura 2. Tratamientos a los que son sometidos los lodos obtenidos en EDARs (González-Granados, 2015).

Espesamiento. En primer lugar, se da el proceso de espesamiento, cuyo objetivo es reducir el volumen de lodos mediante eliminación de agua. El interés primordial de este proceso es incrementar la eficacia y economía de los procesos posteriores, permitiendo reducir la capacidad de tanques y equipos, cantidad de reactivos químicos y cantidad de calor y combustible en digestores, secado e incineración. Esto se suele llevar a cabo mediante espesamiento por gravedad-decantación, en cuyo proceso los lodos se concentran en la zona inferior del tanque, o mediante espesamiento por flotación, en cuyo proceso los lodos se concentran en la zona superior del tanque. El espesamiento por flotación está indicado para los lodos biológicos (lodos activados) y el espesamiento por gravedad para el resto de los lodos obtenidos. También se puede utilizar el espesamiento por procedimientos mecánicos, como por ejemplo, la centrifugación, el tambor rotativo, el cual tiene capacidad filtrante, o mesas espesadoras, en las cuales la eliminación del agua se lleva a cabo por drenaje al depositarse el lodo en una cinta horizontal porosa.

Estabilización. Posteriormente, se produce la estabilización del lodo, cuyo objetivo es eliminar olores y organismos patógenos para reducir los riesgos sobre la salud y estabilizar la materia orgánica. Es necesario este proceso para hacer adecuado el lodo según su fin requerido. Esto se consigue mediante diferentes procesos, tales como *estabilización aerobia*, que es un proceso biológico en el que se oxidan en presencia de oxígeno los compuestos orgánicos presentes en el lodo gracias a la utilización de microorganismos añadidos con los lodos activados que se incorporan. También es utilizada la *estabilización termófila*, la cual se parece a la estabilización aerobia pero produciéndose el intercambio de energía de manera

exotérmica, liberándose energía, principalmente en forma de calor, el cual ayuda a la degradación de la materia volátil y a la eliminación de patógenos. Otro tipo de proceso es la *estabilización anaerobia*, en la cual se convierten compuestos orgánicos biodegradables en metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) principalmente, en ausencia de oxígeno elemental, gracias a la acción de distintos grupos de bacterias, convirtiéndose el sustrato en biogás. Otra técnica utilizada es el *compostaje*, el cual se explica posteriormente en este apartado de la memoria, también se utilizan diferentes *procesos químicos* (estabilización con cal para aumentar el pH).

Deshidratación o secado. Por último, se produce la deshidratación o secado del lodo, cuyo objetivo es disminuir el contenido de agua para facilitar el transporte y el manejo de los lodos. Para esto, primero se produce un acondicionamiento, pudiendo ser térmico, cuyo proceso consiste en el calentamiento del lodo a temperaturas en torno a los 60-70°C, pudiéndose obtener una mejora en la deshidratación mecánica posterior, o químico, cuya finalidad es conseguir una aglomeración de partículas en forma de flóculos, mediante la adición de reactivos químicos (la cal (CaO) y el cloruro férrico (FeCl₃) son los reactivos minerales más empleados y conducen a la formación de un flóculo relativamente fino y estable). Posteriormente al acondicionamiento, se lleva a cabo una deshidratación natural mediante eras de secado, que son superficies de materiales drenantes, dónde se vierte el lodo. O también se puede utilizar una deshidratación mecánica, la cual se puede llevar a cabo mediante: filtros de banda, en este proceso es necesario la adición de polielectrolito para que se produzca la suspensión de flóculos voluminosos en un agua intersticial clara que tiene gran facilidad de escurrir rápidamente por simple drenaje, colocándolo sobre una tela filtrante, también mediante filtros prensa, el cual es un proceso en el que se ejerce presión sobre unas placas con tela o placas con membrana, realizándose una filtración, o mediante la utilización de centrifugas (González-Granados, 2015).

En España, la mayor parte del lodo que se genera se consigue valorizar, principalmente, en provecho de la agricultura (80% de los lodos generados, según datos del Registro Nacional de Lodos). En el caso de Andalucía, el 61% de todo el lodo generado se dedica a aplicación agrícola directa, el 34% a compostaje y el resto (5%) se somete a otros procesos (vertedero, incineración, estabilización con cal, etc.). Los lodos pueden ser aplicados en España a los suelos agrícolas conforme a lo que establece el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, y su actualización conforme a lo que establece la Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. En los lodos aplicables en agricultura, al tener consideración de residuo, les es también de aplicación la Ley 22/2011 de Residuos y

Suelos Contaminados, además de la normativa específica (RD 1310/1990) que regula la aplicación de los lodos a los suelos agrícolas y que incorpora la Directiva 86/278 (EC, 1986) relativa a la protección del medio ambiente y, en particular de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. La gestión y tratamiento de lodos en España se realiza conforme a lo que establece la Ley 22/2011, de 28 de julio de residuos y suelos contaminados.

Es por ello que en Andalucía se aprobó la Orden de 6 de agosto de 2018 (BOJA de 13 de agosto de 2018) de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural y de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se regula la utilización de lodos tratados de depuradora en el sector agrario. De acuerdo a dicha Orden, por primera vez se prohíbe la aplicación directa de lodos en agricultura, y solo será posible aplicarlos si previamente han sido tratados mediante algunos de los métodos que se proponen. Uno de los cuales es el compostaje, que es un proceso de transformación biológica aeróbico y termófilo. En este proceso, los lodos son mezclados con uno o más tipos de agentes estructurantes de origen orgánico animal o vegetal (virutas de madera, serrín, residuos de poda, plumas, pelos, huesos de fruta, papel, etc.) y se incuban formando pilas (pilas volteadas, pilas estáticas ventiladas, en túneles) por un periodo de 21 días o más. Tras este tratamiento, el lodo tratado ha de alcanzar una serie de requisitos para ser considerado como enmienda orgánica: contenido mínimo de materia seca, 60%; relación C/N < 20; ausencia de *Salmonella* sp.; y *Escherichia coli* < 1000 U.F.C/g, además de los parámetros agronómicos y microbiológicos a analizar recogidos en el punto 4 del Anexo IIA del Real Decreto 1310/1990 y en el Anexo II de la Orden AAA/1072/2013. Otros tratamientos aprobados por dicha Orden son: la estabilización aeróbica, que se realiza en reactores y es más común en pequeñas EDARs, produciéndose una alta biodegradación de contaminantes orgánicos; también se emplea la digestión anaeróbica mesófila o termófila, cuyo uso se ha incrementado notablemente debido a su bajo coste y a la generación de energía por la producción de biogás, pero que presenta una pobre degradación de contaminantes. La estabilización alcalina es un proceso muy barato en el que se adicionan al lodo materiales tales como cal, cenizas volantes o polvo de hornos de cemento para aumentar el pH a 12 durante 24 horas o más, pero la degradación de contaminantes orgánicos no está muy clara en algunos casos; y por último, el secado térmico, en el que el lodo debe alcanzar una temperatura de 80°C como mínimo durante 10 minutos o más.

1.3. Contaminantes orgánicos en lodos de depuradora

En las EDARs, una amplia gama de microcontaminantes orgánicos son eliminados de las aguas durante los tratamientos biológicos y químicos a los que son sometidas, pero una parte de

ellos permanecen adsorbidos sobre los lodos residuales (Mailler et al., 2017). Esto conlleva la contaminación de dichos lodos por plaguicidas, productos químicos industriales, productos farmacéuticos y de higiene personal, hormonas y otros contaminantes orgánicos. La gestión y tratamiento de estos lodos constituye un importante problema medioambiental. Mediante los tratamientos mencionados en el apartado 1.2. de esta memoria, se produce la estabilización de los lodos, reduciéndose los patógenos y sólidos volátiles y, evitando su degradación espontánea, tras lo cual, los lodos se convierten en biosólidos estables que ya pueden ser reutilizados o eliminados de manera más segura. Los biosólidos obtenidos son ricos en materia orgánica y nutrientes con valor agronómico (N, P, K, Ca, Mg y otros micronutrientes esenciales para las plantas). La utilización de los biosólidos procedentes de lodos de depuradora como enmienda orgánica, mejorando las propiedades del suelo (Clarke y Smith, 2011), es una opción sostenible ya que permite la recuperación de recursos y añade un valor económico a lo que tradicionalmente se ha considerado como un producto de desecho (Semblante et al., 2015), una práctica que se enmarca en los principios de aprovechamiento de recursos que enuncia la Economía Circular promovida por la Unión Europea, por lo que puede que en un futuro sea obligatorio aplicar una mayor exigencia en la valorización agronómica de lodos en cuanto a contaminantes orgánicos, para garantizar la seguridad ambiental de esta vía de gestión.

Sin embargo, hasta ahora la concentración de contaminantes orgánicos en los lodos tratados no se contempla ni en la legislación andaluza ni a nivel nacional, teniendo en cuenta que los lodos procedentes de depuradoras son en principio un residuo extremadamente líquido (contienen un porcentaje de sólidos entre 0,25 y 12% en peso), y los tratamientos a los que son sometidos lo que hacen es concentrar no solo los nutrientes y la materia orgánica en los biosólidos finales, sino también todos los contaminantes presentes en ellos, potencialmente peligrosos para la salud y el medioambiente, tales como Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn, patógenos y contaminantes orgánicos.

En los lodos aplicables en agricultura, variables tales como la patogenicidad, olor o contenido en metales pesados están regulados para proteger el medioambiente y la salud. En particular, en la directiva 86/278 (EC, 1986) modificada por 91/271/EEC (EC, 1991) se establecen valores máximos de metales en lodos que se vayan a aplicar en agricultura. También está indicado el límite recomendable de 7 Bifenilos Policlorados (PCBs) y 3 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs). Algunos países (Dinamarca, Suecia, Austria y Alemania) ya han impuesto controles para ciertos contaminantes orgánicos en los biosólidos (Inglezakis et al., 2011), concretamente aquellos considerados contaminantes prioritarios “clásicos” (POPs, del inglés Persistent Organic Pollutants), y que aparecen en el 3^{er} Borrador de revisión de la Directiva

86/278/CEE (último documento disponible) (EC 2010), tales como Nonilfenoletoxilados (NPEs), Sulfonatos de Alquilbenceno Lineales (LAS), PAHs, PCBs y Dioxinas y Furanos (PCDD/Fs), pero no se ha llegado a aprobar una directiva específica de la Unión Europea para regular su contenido en lodos, a pesar de que la mayor parte de ellos están prohibidos y regulados tras la Convención de Estocolmo (Stockholm Convention on POPs, 2011). Parece ser que la no aprobación de una normativa al respecto se debe a la falta de acuerdo entre los distintos países en cuanto a concentraciones límite, pues, de aplicar las concentraciones propuestas por la Unión Europea, la mayoría de los países no alcanzarían los estándares necesarios para que sus lodos pudieran ser empleados en agricultura. Cabe esperar por tanto, que en un futuro no muy lejano sea obligatorio aplicar una mayor exigencia en los criterios de valorización agronómica del lodo en cuanto a contaminantes orgánicos para dar respuesta a la necesidad de conciliar el mantenimiento de los beneficios de esta vía de gestión con la garantía de seguridad ambiental y sanitaria de la misma.

Además de lo expuesto anteriormente, también es llamativo que en ningún país se han impuesto límites para otras grandes familias de contaminantes llamados emergentes, que siempre están presentes en los lodos de depuradora aplicados en agricultura, como son los productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs, Pharmaceutical and Personal Care Products en inglés), microplásticos y plastificantes, surfactantes, retardantes de llama, productos de desinfección, drogas, etc., que son cada vez más ampliamente usados por la población, generando por tanto grandes cantidades de residuos que finalmente llegan a estar presentes en los lodos de depuradora. Además, las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas específicamente para eliminar este tipo de contaminantes, por lo que importantes concentraciones quedan remanente en los lodos (Rodríguez-Rodríguez, 2014).

1.3.1. Productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) en lodos de depuradora

El término PPCPs comprende una amplia colección de miles de sustancias químicas, tales como fármacos de uso humano o veterinario, fragancias y cosméticos. Tras ser absorbidos por el organismo, en la mayoría de los casos, están sujetos a reacciones metabólicas, sin embargo, una fracción significativa de ellos (entre un 30-90% de la dosis administrada) se elimina sin metabolizar en orina o en heces, siendo emitidas a aguas residuales y estando presente, por tanto, en lodos de depuradora o en compost. Además, en algunos casos, algunos de los metabolitos excretados pueden ser transformados al fármaco original. Es por tanto, que se han encontrado en los últimos años cientos de PPCPs diferentes en muy diversas muestras

medioambientales. Muchos de estos compuestos provienen del alcantarillado doméstico, de hospitales, residuos industriales y de aguas residuales en abastecimiento de agua municipal. Para hacernos una idea, actualmente más de 15.000 medicamentos están autorizados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, lo que supone más de 2.000 principios activos.

Ciertos PPCPs se encuentran a niveles detectables en los biosólidos y su lixiviación o escorrentía desde los suelos agrícolas tratados con biosólidos se consideran como potenciales rutas de entrada de PPCPs en los distintos ecosistemas (Eggen et al., 2010; Wang et al., 2018). Sin embargo, realizando una búsqueda en SCOPUS utilizando los términos PPCP + SLUDGE (lodo en inglés) se obtienen solo 661 trabajos publicados, de los cuales 557 son posteriores al 2010, indicando la novedad de esta investigación y la importancia que tiene actualmente, ya que se percibe como una preocupación de la sociedad en general. Sin embargo, los estudios sobre el contenido de contaminantes orgánicos emergentes tales como los PPCPs en lodos de depuradora son todavía muy escasos comparados con los estudios sobre contaminantes prioritarios tales como PAHs o PCBs (Carballa et al., 2007; Stasinakis et al., 2013; Jones et al., 2014; Subedi et al., 2014; Martín et al., 2015). Jelic et al. observaron en 2011 que 21 de los 43 fármacos acumulados en lodos de tres depuradoras estudiadas estaban en concentraciones superiores a 100 ng/g. Verlicchi y Zambello realizaron en 2015 una revisión bibliográfica para ver la concentración de 152 fármacos y 17 productos de higiene personal en lodos que habían sido sometidos a distintos tratamientos de estabilización, y concluyeron que los PPCPs que más frecuentemente se presentan en los biosólidos son 27 antibióticos, lo cual es preocupante debido a la resistencia que están creando las bacterias patógenas frente a éstos, y lo difícil que resulta la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Los antibióticos más estudiados son triclosán y triclocarbán, aunque las mayores concentraciones en lodos se han observado en el siguiente orden: triclocarbán > tonalide > galaxolide > triclosán > ofloxacino > ciprofloxacino. En relación a los lodos compostados, los PPCPs más estudiados son carbamazepina y paracetamol, pero en cuanto a concentraciones son los siguientes: galaxolida > triclosán > tonalide > paracetamol > ibuprofeno. Aunque estas concentraciones variaban según la estación del año, la zona estudiada y el tratamiento llevado a cabo en la EDAR.

El gran número de compuestos que se enmarcan dentro de los PPCPs hace que, debido a las diferencias en sus características fisicoquímicas, sobre todo en su coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}), éstos se comporten en los lodos de diferente forma. Por ejemplo, ciertos PPCPs son hidrofóbicos y se adhieren a la materia orgánica de los lodos, considerándose compuestos pseudopersistentes. Otros PPCPs, sin embargo, son compuestos ionizables, siendo

su carga dependiente de sus pKa y del pH, influyendo también mecanismos tales como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y complejación con la superficie de lodos en su adsorción (Verlicchi y Zambello, 2015).

Dependiendo de las características de los contaminantes orgánicos presentes en los lodos, su concentración puede ser minimizada mediante la aplicación de tratamientos que incluyen procesos de oxidación avanzados, como ozonización o tratamiento Fenton (Qiang et al., 2013), mediante radiación ultravioleta (Salihoglu et al., 2012), tratamientos bastante efectivos, pero con altos costes de mantenimiento y consumo de energía. También se han contemplado tratamientos de extracción de los contaminantes y de biorrecuperación, utilizando el potencial de ciertos microorganismos para conseguir la biodegradación de los contaminantes (Rodríguez-Rodríguez et al., 2014).

1.4. Problemática medioambiental derivada de la presencia de PPCPs en lodos de depuradora

La presencia de PPCPs en el medio ambiente se ha convertido en una creciente preocupación debido a su impacto negativo especialmente sobre organismos acuáticos, tales como los efectos de feminización de los estrógenos sintéticos en peces (Chen et al., 2013). Los compuestos llamados disruptores endocrinos, como son los ya mencionados estrógenos sintéticos, están implicados en cambios en la fertilidad y la producción de vitelogenina (Metcalf et al., 2001; Burkhardt-Holm et al., 2008). Los PPCPs pueden dar efectos biológicos, como fitotoxicidad y toxicidad en suelos y organismos acuáticos. Por ejemplo, gemfibrozilo puede ejercer como disruptor endocrino en peces y un amplio uso de triclosán puede resultar en el desarrollo de resistencia bacteriana a antibióticos (Usyskin et al., 2015). Además, los antibióticos pueden también alterar la función y la estructura de la comunidad bacteriana. Por ejemplo, la exposición a 200 µg/L de ciprofloxacino, un antibiótico común, ha sido asociada a la alteración de la composición de la comunidad bacteriana en muestras medioambientales y a un descenso de la capacidad de metabolizar pirenos (Nislund et al., 2008). La exposición a antibióticos también ha demostrado potencial para influir en las funciones claves del ecosistema, ya que concentraciones de 50 µg/kg de sulfadimetoxina reduce la nitrificación del suelo (Toth et al., 2011). Dos de los fármacos más consumidos, paracetamol e ibuprofeno, han demostrado toxicidad en concentraciones de nanogramos por litro en efluentes de agua residuales y en concentraciones de microgramos por litro en aguas naturales. Han sido descritos una variedad de potenciales efectos negativos para estos niveles de concentración, por ejemplo, daño reproductivo, daño al ADN, acumulación en tejidos, estrés oxidativo,

peroxidación lipídica y cambios de comportamiento, todo esto se ha observado en algas, microcrustáceos, moluscos y peces teleósteos. Los efectos negativos producidos por estos dos fármacos se encuentran ampliamente descritos en la revisión bibliográfica realizada por Zur et al. (2018).

Otro ejemplo son los efectos letales de diclofenaco en buitres (Sumpter, 2010), lo que demuestran sus efectos tóxicos a bajas dosis. Además, algunas sustancias pueden ser transformadas en otras, siendo incluso más tóxicas que la sustancia original (Radjenovic et al., 2009). La absorción de PPCPs por plantas ha sido también documentada, pero se reduce al estudio de unos cuantos compuestos y cultivos (Wu et al., 2015; Cantarero et al., 2017; Ben-Mordechay et al., 2018). Bajas concentraciones de PPCPs puede tener impacto en la vida acuática, incluyendo cambios en el crecimiento y la mortalidad de algas y anfibios, y cambios en la estructura de la comunidad acuática (Wilson et al., 2003; Fraker y Smith, 2004; Brausch y Rand, 2011), pudiendo afectar también a la supervivencia de la vida acuática (Fraker y Smith, 2004).

Otros estudios (Zhenhua et al., 2016) han demostrado que algunos PPCPs, tales como, tetraciclina y triclosán, pueden dañar el centro de reacción del fotosistema II de algas por estrés oxidativo e inhibir la síntesis de algunas proteínas y la formación de cloroplastos. Trazas de PPCPs en aguas puede afectar al crecimiento normal de plantas y reducir el contenido de citocromo y hojas verdes. Esto supone la aparición de obstáculos en el crecimiento y la reproducción de animales.

Un grupo también muy persistente en lodos son los filtros ultravioletas, como el 4-metilbencilideno alcanfor, cuya concentración aumenta considerablemente en muestras ambientales en verano (Biel-Maeso et al., 2019), y que es un disruptor endocrino al poseer actividad estrogénica (Schlumpf et al., 2004).

Además, algunos estudios (Ramirez et al., 2007; Fair et al. 2009; Coogan et al. 2007; Oaks et al., 2004; Li et al., 2012; Chen et al., 2007; Liu et al., 2011; Ali et al., 2018) han comprobado la bioacumulación de PPCPs en diversos tejidos de plantas, peces, algas, mamíferos acuáticos, crustáceos y buitres.

Estos compuestos van acumulándose en suelos tratados con lodos, pudiendo pasar a aguas superficiales y subterráneas, así como a plantas y animales, y en última instancia a los seres humanos a través de la cadena alimentaria, causando enfermedades crónicas (cáncer, defectos de nacimiento, sistema inmunitario o reproductivo disfuncional, e incluso un cierto decrecimiento de la inteligencia se sospecha que están relacionados con estos contaminantes)

(Citulski y Farahbakhsh, 2010; Clarke y Smith, 2011). Sin embargo, el impacto de muchos compuestos pertenecientes a los PPCPs son aún desconocidos. Es por todo esto que es muy importante la búsqueda de cepas bacterianas con capacidad de degradar selectivamente PPCPs en lodos, las cuales han de ser aisladas y su potencial poder biodegradador de determinados contaminantes caracterizado para su utilización en EDARs para mejorar la eliminación de PPCPs mediante un proceso llamado bioaumentación.

1.5. Biorrecuperación de lodos de EDARS

Uno de los métodos más empleados para la eliminación de contaminantes orgánicos en lodos de depuradora se basa en la biorremediación, que es el proceso mediante el cual los microorganismos (endógenos o exógenos) degradan, metabolizan, transforman o mineralizan el compuesto contaminante en cuestión. Se han contemplado diferentes tratamientos de biorrecuperación del lodo utilizando el potencial de ciertos microorganismos para conseguir la biodegradación de los contaminantes (Rodríguez-Rodríguez et al., 2014).

Según la definición de la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA), la biodegradación de un compuesto consiste en aquel proceso por el cual los microorganismos transforman o alteran, por acción metabólica, la estructura de dicho compuesto. En este proceso, los contaminantes orgánicos son biotransformados debido a que, generalmente, los microorganismos pueden utilizarlos para su propio crecimiento como fuente de carbono y energía y, en el caso de que no sean capaces de crecer a partir de ellos, pueden seguir transformándolos si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo o cosustrato (Alexander, 1999). Además de los compuestos naturales, los elementos requeridos para el crecimiento celular pueden ser aportados por muchos contaminantes orgánicos. La mayoría suelen ser alifáticos o aromáticos, y contienen diferentes grupos funcionales. Estos compuestos orgánicos, actuando como donantes de electrones son oxidados durante el metabolismo microbiano para proporcionar energía para el crecimiento celular. Aunque el último metabolito generalmente es un compuesto de naturaleza orgánica, también puede obtenerse CO₂, H₂O y/o sales inorgánicas, que es lo que se conoce como mineralización (figura 3). En el proceso de biodegradación influyen diferentes factores, tales como, la temperatura, el pH, la biodisponibilidad, humedad del suelo, disponibilidad de oxígeno, entre otros.

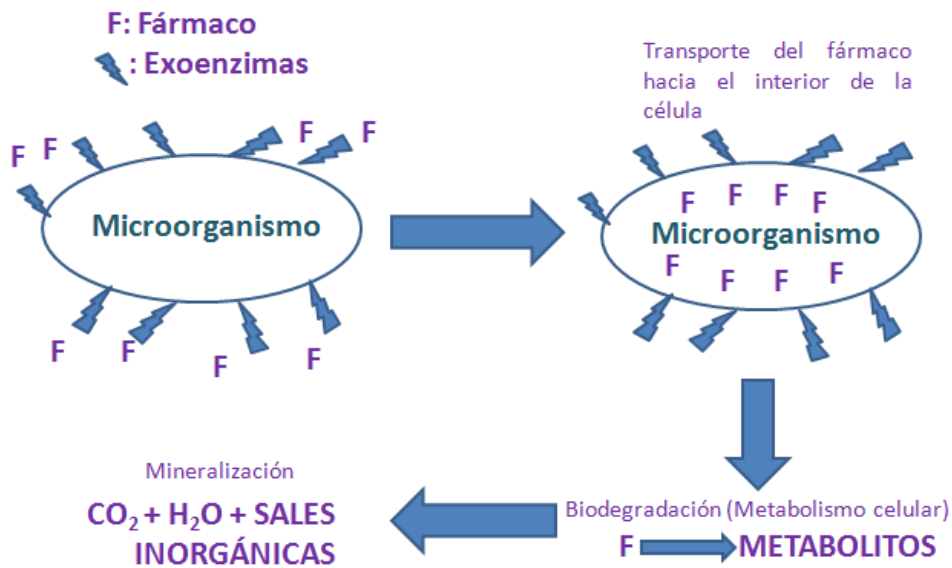


Figura 3. Biodegradación aerobia y mineralización.

Una alternativa dentro de las técnicas de biorremediación es la bioestimulación (figura 4), una técnica en la cual se adicionan macro y micro nutrientes para estimular el crecimiento microbiano y aumentar la población de microorganismos. Otra alternativa es el bioaumentación (figura 4), que consiste en la adición de microorganismos endógenos o exógenos para aumentar la biodegradación de los contaminantes.

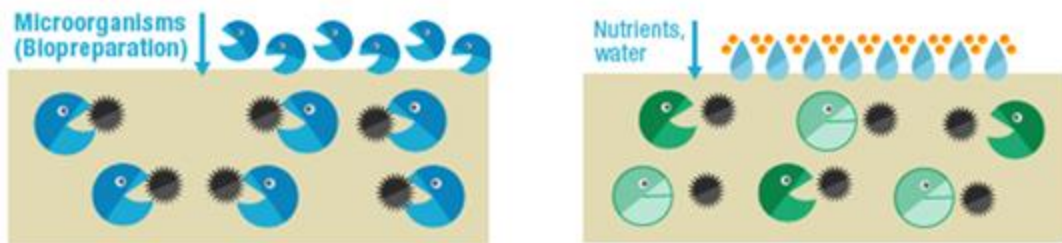


Figura 4. Bioaumentación y bioestimulación.

Los procesos de tratamiento de estabilización de los lodos que se llevan a cabo bajo condiciones aeróbicas, tales como la digestión aeróbica o el compostaje, favorecen la biodegradación de contaminantes orgánicos más que los procesos anaeróbicos, por lo que lo más lógico sería aplicar la técnica del bioaumentación durante estos procesos para aumentar la pérdida de los contaminantes a la vez que se producen dichos procesos. Sin embargo, al adicionar microorganismos exógenos, éstos tienen que competir con la comunidad microbiana establecida resultando en una disminución de la cantidad de microorganismos inoculados (Boon et al., 2000), por lo que el bioaumentación puede cambiar la composición de la comunidad microbiana por competición o inhibición, pudiendo resultar en cambios positivos o negativos. La reducción de la cantidad de microorganismos inoculados también puede deberse a la

presencia de bacteriófagos o por una mala adaptación a las condiciones ambientales. Además, si los microorganismos se encuentran simultáneamente con la presencia de más de un contaminante metabolizará el compuesto más fácilmente degradable (Herrero y Stuckey, 2015).

Hasta ahora sólo unos pocos estudios han investigado la eliminación de contaminantes orgánicos de los biosólidos mediante la técnica del bioaumentación empleando tanto bacterias como hongos o levaduras (Zhou et al., 2013). En el caso de los PPCPs, hasta ahora los estudios sobre tratamientos de los lodos de depuradora para lograr su descontaminación son bastante más escasos (Wang et al., 2018). Briones et al. (2018) observaron la biodegradación de metformina, un fármaco muy utilizado para tratar la diabetes tipo 2 pero que se considera un disruptor endocrino, utilizando cultivos bacterianos obtenidos a partir de lodos de depuradora. El grupo de investigación de Rodríguez-Rodríguez et al. (2010; 2011; 2012a,b; 2014) observó que el bioaumentación con el hongo *Trametes versicolor* daba lugar a la degradación de varios contaminantes emergentes (ciertos PPCPs como, por ejemplo, el antiinflamatorio naproxeno). Aydin (2016) también utilizó este mismo hongo para biodegradar antibióticos en lodos de depuradora provenientes de aguas residuales de una industria farmacéutica. Otro estudio investigó el potencial para mejorar la eliminación de PPCPs usando el bioaumentación, las bacterias fueron previamente aisladas de lodos activados y eran capaces de degradar los PPCPs a concentraciones de ng/L. Este estudio examinó la degradación del triclosán y bisfenol A por *Sphingomonas sp*, tanto en cultivo puro como cuando se añaden a lodos activados. Cuando las bacterias se añadieron a los lodos activados, la degradación aumentó (Zhou et al., 2014).

1.5.1. Microorganismos potencialmente degradadores de PPCPs en lodos de EDARs

Varios estudios han informado de que se detecta con frecuencia PPCPs como sulfametoxazol, paracetamol, triclosán, diclofenaco y carbamazepina, los cuales pueden ser degradados por cultivos puros aislados de lodo. Los cultivos puros aislados del proceso de lodos activados muestran la capacidad de degradar una amplia gama de PPCPs. Por ejemplo, las bacterias denitrificantes como *Achromobacter sp* pueden degradar todas las sulfonamidas incluyendo sulfametoxazol. Además, con un mecanismo de degradación diferente, muchos cultivos puros pueden utilizar PPCPs específicos como única fuente de carbono y energía, como paracetamol, y puede ser degradado por *Stenotrophomonas sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Delftia tsuruhatensis*. La biosorción juega un importante papel en la eliminación del paracetamol para *Stenotrophomonas sp* mientras que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Delftia*

tsuruhatensis desempeña un papel insignificante, esto puede deberse a la presencia de diferentes enzimas en el proceso de degradación. Las enzimas desempeñan un papel fundamental en la biodegradación de los PPCPs y su biodegradación puede determinarse mediante la producción de la enzima específica (para la descomposición) por el microorganismo. Por ejemplo, la amonio monooxigenasa puede ser producida por *Nitrosomonas europae* que puede descomponer el triclosán, pero muchos recalcitrantes PPCPs como la tetraciclina, el ciprofloxacino y el trimetoprim no pueden degradarse adecuadamente por los microorganismos, ya que estos fármacos no pueden inducir a los microorganismos para producir la enzima específica. Por lo tanto, para mejorar la biodegradabilidad de los PPCPs refractarios, el principal paso es inducir la producción de enzimas particulares (Daughton, 2001; Kagle et al., 2009). Respecto al fármaco ibuprofeno, se ha reportado su degradación por bacterias tales como, *Pseudomonas putida*, *Bacillus thuringiensis*, *Sphingomonas sp*, *Variovorax sp*, *Corynebacterium glutamicum*, entre otras, todas ellas con mecanismo de degradación diferentes (Zur et al., 2018).

Los hongos de pudrición blanca (WRF, de sus siglas en inglés White Rot Fungi) también desempeñan un papel importante en el proceso de degradación de PPCPs. Por ejemplo, la degradación de naproxeno por WRT utiliza lacasas (enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas) y citocromo P450. En otro estudio, se utilizan *T. versicolor* y *P. ostreatus* para la degradación de carbamazepina (Asif et al., 2017).

Asimismo, las microalgas también han demostrado mediante diversos estudios ser potencialmente degradadoras de PPCPs, concretamente de antibióticos. Por ejemplo, la degradación de levofloxacino por *S. obliquus* y *C. vulgaris* o ceftazidima por *C. pyrenoidosa* (Leng et al., 2020).

Por lo que se ha comprobado que existen numerosos microorganismos capaces de degradar PPCPs, al igual que otros contaminantes orgánicos, incorporándolos a su metabolismo gracias a que poseen diferentes enzimas.

2. OBJETIVOS

Tras lo expuesto anteriormente, se ha concluido en que los PPCPs son compuestos diana para los que habría que encontrar métodos de descontaminación, reduciendo su concentración en lodos, para poder evitar su acumulación en diferentes ecosistemas. Es por ello que en este trabajo se ha decidido estudiar más en profundidad la degradación por microorganismos de los fármacos paracetamol, carbamazepina, ofloxacino e ibuprofeno gracias a la técnica del bioaumentación.

La idea es obtener lodo de depuradora de calidad para uso agronómico, evitando que acabe convirtiéndose en desperdicio, y además, garantizar una mayor seguridad para la salud humana y del medioambiente. Por lo tanto, los objetivos específicos que se persiguen en el presente trabajo son los siguientes:

1. Aislar cepas bacterianas potencialmente degradadoras específicas de determinados fármacos muy presentes en lodos de depuradora (paracetamol, ofloxacino, carbamazepina e ibuprofeno) mediante el empleo de técnicas de cultivos de enriquecimiento a partir de lodos contaminados con dichos fármacos.
2. Estudios preliminares relacionados con la demanda biológica de oxígeno (DBO) a partir de un sistema acuoso contaminado artificialmente e inoculado con las cepas bacterianas aisladas, que potencialmente son biodegradadoras de dichos fármacos, con el fin de obtener una aproximación de posibles bacterias capaces de llevar a cabo la biodegradación.
3. Para confirmar la capacidad degradadora de las cepas bacterianas se realizaron ensayos de biodegradación en solución de estos fármacos con las siguientes cepas bacterianas:
 - Cepas bacterianas endógenas obtenidas del enriquecimiento de los diferentes fármacos y seleccionadas en los estudios preliminares.
 - Cepas bacterianas exógenas procedentes de otros enriquecimientos con compuestos altamente tóxicos y que han sido descritas por literatura científica que son capaces de degradar dichos fármacos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Fármacos

Se han utilizado ofloxacino (pureza > 99,0%) en polvo, carbamazepina (pureza > 98,0%) en polvo, paracetamol (pureza > 99,0%) en polvo e ibuprofeno (pureza > 98,0%) en polvo, suministrado todos ellos por Sigma Aldrich (Madrid, España).

3.1.1.1. Ofloxacino

Ofloxacino (ácido (±)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxacino-6-carboxílico) (figura 5) es un antibiótico sintético perteneciente al grupo de las quinolonas, las cuales inhiben a la ADN girasa (también llamada topoisomerasa II), la cual se encarga de los enrollamientos negativos y, por tanto, de la duplicación del ADN y de la división bacteriana. Este fármaco bloquea específicamente la replicación bacteriana sin afectar a la humana. Ofloxacino pertenece concretamente a la tercera generación de quinolonas por lo que posee un amplio espectro de acción (Bot Plus, 2020). Este principio activo posee alta estabilidad en suelos (Thomsen et al., 2003), tiene un gran potencial para acumularse en plantas (Michelini et al., 2012; Migliore et al., 1995) y está presente en lodos de depuradora y su compost (Lillenberg et al., 2009; Kipper et al., 2017).

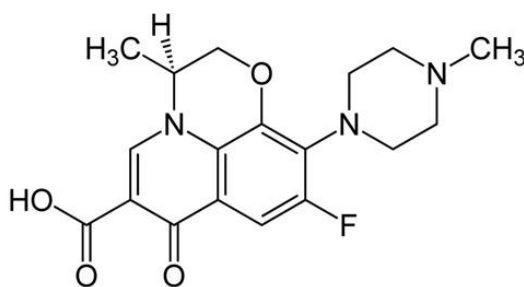


Figura 5. Estructura química de ofloxacino.

3.1.1.2. Carbamazepina

Carbamazepina (5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida) (figura 6) es un fármaco anticonvulsivante, antiepiléptico y estabilizador del estado de ánimo utilizado, principalmente, para controlar las crisis epilépticas, el trastorno bipolar y la depresión. Este fármaco está relacionado químicamente con los antidepresivos tricíclicos (Bot Plus, 2020). Es un marcador antropogénico (Clara et al., 2004) y ha sido considerado como un indicador de aguas residuales

en ambiente acuático debido a su persistencia (Strauch et al., 2008; Wolf et al., 2012). De acuerdo a Faigile y Feldman (1975), el 72% de la dosis oral de carbamazepina se excreta en orina y el 28% en heces, encontrándose por tanto muy frecuente en aguas residuales y lodos (Hai et al., 2018).

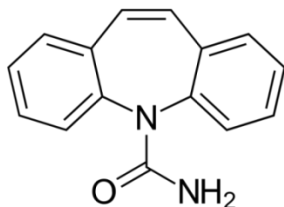


Figura 6. Estructura química de carbamazepina.

3.1.1.3. Paracetamol

Paracetamol (N-(4-hidroxifenil)acetamida) (figura 7), también conocido como acetaminofen, es analgésico y antitérmico, inhibe principalmente a la ciclooxigenasa 3 (COX-3), evitando así la biosíntesis de las prostaglandinas, aunque puede causar hepatotoxicidad en humanos (Bot Plus, 2020). Es un principio activo el cual tiene un amplio uso como materia prima de diferentes medicamentos. Sobre el 1-3% de paracetamol es excretado sin metabolizar por el sistema urinario (Kabak, 2008), por lo que podemos encontrarlo en EDARs y, consecuentemente, en suelos (Li et al, 2014; Martínez-Hernández et al., 2016; Dalgic et al., 2017).

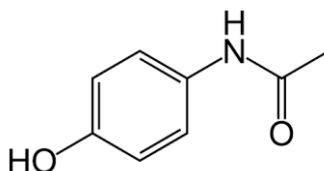


Figura 7. Estructura química de paracetamol.

3.1.1.4. Ibuprofeno

El ibuprofeno (ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propanoico) (figura 8) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Este fármaco actúa inhibiendo a la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), produciéndose así un efecto antiinflamatorio, analgésico y antitérmico, aunque también posee efectos gastrolesivos (Bot Plus, 2020). Numerosos estudios (Liu et al., 2018; Melvin et al., 2014; Zuriaga et al., 2019) indicaron que la presencia de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos en conjunto con otros fármacos aumentan su

toxicidad en humanos. Ibuprofeno se encuentra en segundo lugar en el ranking de producción de fármacos del mundo, detrás del ácido acetilsalicílico (Aspirina®) (OMS, 2015). Este fármaco se excreta en un 85% sin metabolizar en orina y heces (Rainsford, 2009), por lo que también se encuentra en lodos de depuradora (Zembrzuska et al., 2019; Jia et al., 2020; Quintelas et al., 2020).

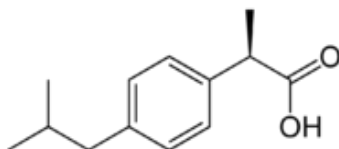


Figura 8. Estructura química de ibuprofeno.

3.1.2. Lodo

El lodo empleado en la presente memoria fue obtenido de la EDAR El Copero (EMASESA, Empresa Metropolitana de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla, S.A.), localizada en la localidad de Dos Hermanas de Sevilla. En la tabla 1 se presentan las propiedades físico-químicas de este lodo suministradas por EMASESA.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del lodo utilizado.

Materia orgánica (%)	59,9
pH	8,1
Nitrógeno (Kjeldahl) (%)	4,9
P ₂ O ₅ (%)	7,0
K ₂ O (%)	0,56
CaO (%)	6,5
MgO (%)	0,90
Fe (mg kg ⁻¹)	58.100
Cu (mg kg ⁻¹)	206
Zn (mg kg ⁻¹)	802
Mn (mg kg ⁻¹)	280
Cr (mg kg ⁻¹)	62

3.1.3. Cepas bacterianas

Se emplearon cepas bacterianas endógenas aisladas del lodo utilizado mediante la técnica de enriquecimiento. A partir del enriquecimiento con los distintos fármacos por separado se aislaron las cepas bacterianas recogidas en la tabla 2. Con ibuprofeno se obtuvieron 3 cepas bacterianas denominadas I1, I2 e I3. Del mismo modo, a partir del enriquecimiento con paracetamol se obtuvieron 4 cepas bacterianas diferentes denominadas P1, P2, P3 y P4. Asimismo, a partir del enriquecimiento con carbamazepina se obtuvieron 5 cepas bacterianas denominadas C1, C2, C3, C4 y C5. Por último, a partir del enriquecimiento con ofloxacino se obtuvieron 5 cepas bacterianas denominadas O1, O2, O3, O4 y O5.

Tabla 2. Nomenclatura utilizada para las bacterias aisladas de lodo contaminado con los distintos fármacos.

Procedencia	Nomenclatura para cepas
Bacterias aisladas de lodo contaminado con 200 ppm de ibuprofeno	I1
	I2
	I3
Bacterias aisladas de lodo contaminado con 200 ppm de paracetamol	P1
	P2
	P3
	P4
Bacterias aisladas de lodo contaminado con 200 ppm de carbamazepina	C1
	C2
	C3
	C4
	C5
Bacterias aisladas de lodo contaminado con 200 ppm de ofloxacino	O1
	O2
	O3
	O4
	O5

3.1.4. Solución de nutrientes (SNs)

La nutrición es el proceso por el que las bacterias, en nuestro caso, van a tomar del medio donde habitan las sustancias químicas (nutrientes) que necesitan para crecer. Estas sustancias

se requieren tanto para fines de aprovisionamiento de energía (reacciones de mantenimiento) como para suministro materiales para la síntesis celular (biosíntesis de nuevos componentes celulares). En los dos procesos las bacterias han de disponer de compuestos orgánicos (hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes, etc.), que serán aportados durante el proceso de enriquecimiento con cada uno de los fármacos que será explicado más adelante, y de compuestos inorgánicos tales como la solución de nutrientes la cual se ha usado en el presente estudio para estimular las cepas bacterianas. La composición de dicha solución de nutrientes se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de la solución de nutrientes.

Nutrientes	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Mn Cl ₂ .4 H ₂ O	75,0
Fe SO ₄ .7 H ₂ O	37,5
Sn Cl ₂ .2 H ₂ O	25,0
Zn SO ₄ .7 H ₂ O	12,5
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18 H ₂ O	12,5
CO Cl ₂ .6 H ₂ O	12,5
Ca SO ₄ .2 H ₂ O	10,0
K Br	3,75
K Cl	3,75
Li Cl	2,50

Las bacterias necesitan minúsculas cantidades de estos oligoelementos, a los que también se denominan como micronutrientes o elementos traza. Los componentes de la solución de nutrientes usada como enmienda inorgánica fueron suministrados por GPR RECTAPU (VWR).

3.1.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivos empleados en los diferentes experimentos realizados para la redacción de esta memoria, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados.

Componentes	MSM	LB	LB-agar
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,8 g		
KH ₂ PO ₄	2,0 g		
Na ₂ HPO ₄	4,0 g		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,6 g		
NaCl		10,0 g	10,0 g
Triptona		10,0 g	10,0 g
Extracto de levadura		5,0 g	5,0 g
Bacto Agar			20,0 g

El medio MSM (Mineral Salt Medium) contiene micronutrientes (N, P, K, Na, Mg, S) y es el resultado de la mezcla de las siguientes disoluciones:

- Disolución I: 2,0 g de KH₂PO₄ y 4,0 g de Na₂HPO₄ en 500 mL de agua milliQ.
- Disolución II: 0,8 g de (NH₄)₂SO₄ y 1,6 g de MgSO₄x 7 H₂O en 500 mL de agua milliQ.

El medio LB (Luria-Bertani) es el medio 381 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

Las sales minerales usadas para preparar el medio MSM fueron suministradas por GPR RECTAPU (VWR), y el medio LB fue suministrado en forma deshidratada por BD Difco™ (Fisher scientific).

3.2. Métodos

3.2.1. Enriquecimiento del lodo para la obtención de consorcios microbianos degradadores específicos

El lodo se enriquece con concentraciones altas de un determinado contaminante con la finalidad de observar como las bacterias endógenas se adaptan al contaminante añadido, ya que es la única fuente de carbono añadida. Del enriquecimiento se obtiene un consorcio de microorganismos que serán degradadores específicos de dicho contaminante. De este consorcio se aislarán y separarán aquellas cepas bacterianas que hayan crecido, siendo éstas degradadoras específicas del propio contaminante.

Las cepas bacterianas se obtuvieron a partir de la técnica de cultivos de enriquecimiento en lodo basada en el artículo de Shahzad-ul-Hussan et al. (2009). En primer lugar, se preparó una suspensión en tubos corex estériles con 1 g del lodo fresco en 19 mL de medio MSM

suplementado cada uno con ibuprofeno, ofloxacino, paracetamol o carbamazepina (200 ppm) y con 1 mL de solución de nutrientes (SNs). En el caso de carbamazepina e ibuprofeno, al presentar una baja solubilidad en agua, se añadieron en los tubos corex estériles 1 mL de una solución de 4000 ppm de cada fármaco en metanol para tener una concentración final de los fármacos de 200 ppm, y se dejó evaporar el metanol bajo campana de flujo laminar antes de añadir el lodo, el medio MSM y la solución de nutrientes. Con los fármacos paracetamol y ofloxacino se añadió el fármaco directamente, concretamente, se añadieron 4 mg para obtener una concentración final de fármaco de 200 ppm al añadir el resto de los componentes de la suspensión. Se dejaron agitando los tubos durante 1 semana a 20°C, tras la cual se recogieron 5 mL de la suspensión y se añadieron en tubos corex que ya contenían la cantidad de fármacos necesaria para obtener la misma concentración de fármaco mencionada anteriormente. A esta suspensión se añadieron 14 mL de medio MSM y 1 mL de SNs. Este proceso se repitió 4 veces. Tras esto, se centrifugó el último tubo corex de cada fármaco a 7000 rpm durante 10 minutos y se sembraron los consorcios bacterianos obtenidos en modo césped. Para ello se tomaron 100 µL del sobrenadante de cada tubo corex que se sembraron en placas Petri con agar que contenía medio LB diluido (1:40) y el fármaco, aunque éste no se disuelve, y se agita antes de la preparación de la placa, para asegurar que hay fármaco en las placas (12 mg en 200 mL en medio LB-agar). Se dejan crecer 48 horas y con asa de siembra estéril se introduce la biomasa de cada consorcio de microorganismos a conservar en crioviales a -80°C. Todo este proceso puede observarse de forma esquemática en la figura 9.

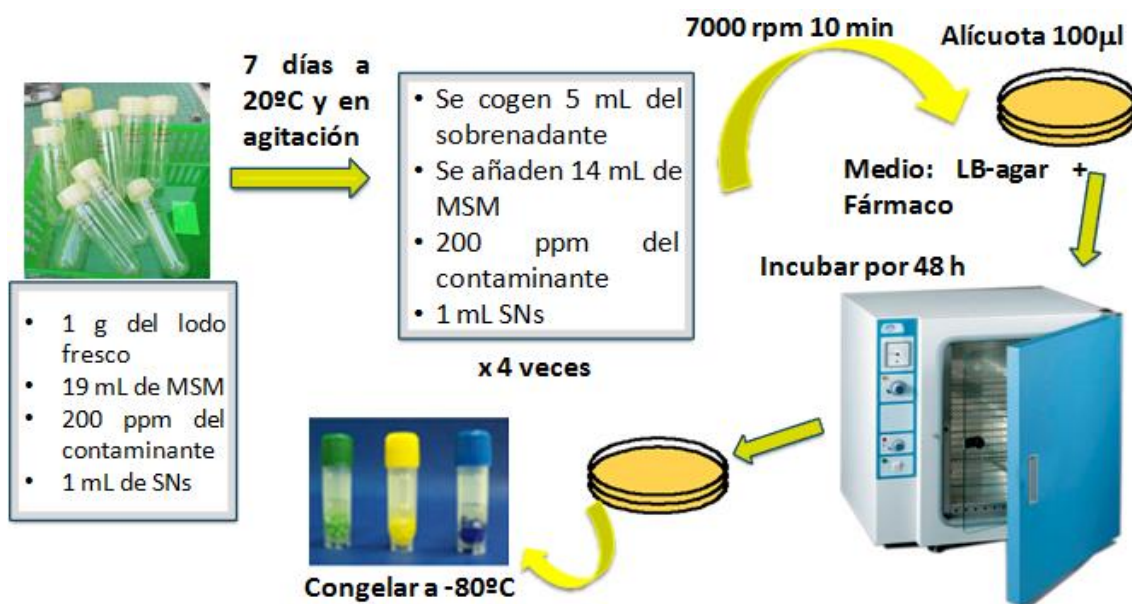


Figura 9. Esquema del enriquecimiento del lodo.

3.2.2. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras específicas

A partir de los crioviales conservados a -80°C y que contenían consorcios microbianos degradadores específicos de cada fármaco, se procedió al aislamiento de bacterias degradadoras. Se realizaron sucesivos aislamientos sembrando los consorcios obtenidos en placas Petri con medio LB-agar y con cada fármaco (12 mg en 200 mL de medio LB-agar). 100 μL del consorcio se inoculan en las placas sembrándolas en césped, y se ponen en estufa a 30°C durante dos días. Si las placas obtenidas presentan contaminación o las colonias bacterianas no están bien aisladas, se siembran nuevamente en cuadrante. Esta técnica continúa hasta que se obtienen cepas bacterianas aisladas que se distinguen visualmente en base a su morfología, tamaño, color, elevación, etc.

Una vez aisladas las distintas cepas bacterianas, se introdujo la biomasa de cada una (500 μl) en tubos Falcon estériles de 15 mL, cogiendo cada colonia bacteriana y añadiendo 5 ml de medio LB. Se agita durante 24h a 30°C y se conserva en crioviales, que son microtubos de 2 mL que contienen 20 esferas porosas de 3 mm de diámetro, y 500 μL de glicerol al 40%, junto con los 500 μl de cepa bacteriana proveniente del tubo Falcon. Se conservan los crioviales en el congelador a -80°C para asegurar la disponibilidad de las cepas en futuros ensayos. Este proceso se puede observar de forma esquemática en la figura 10.

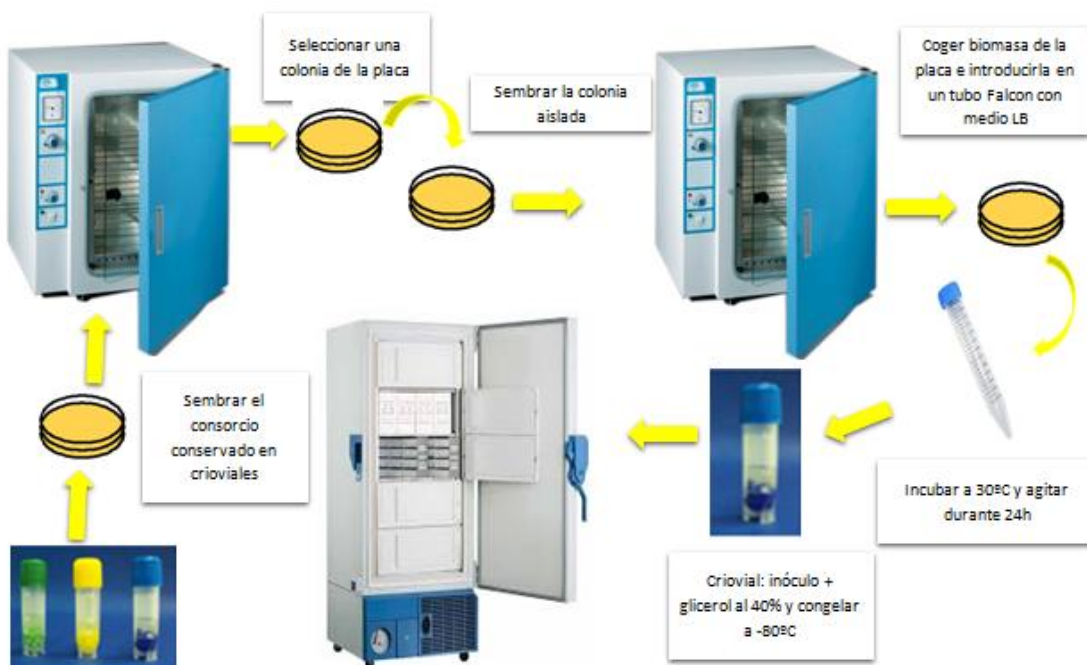


Figura 10. Esquema del aislamiento de cepas bacterianas.

3.2.3. Preparación de los inóculos de las cepas bacterianas

En este apartado se va a explicar la preparación del inóculo de cada cepa bacteriana aislada que se utiliza para el ensayo de la Demanda Biológica de Oxígeno y para la biodegradación en solución, explicado posteriormente en esta memoria en los apartados 3.2.4. y 3.2.6.

Para comenzar, a partir de los crioviales obtenidos anteriormente, se siembra en placas Petri con medio LB-agar 100µl de cada cepa bacteriana aislada en el enriquecimiento. Obtenida ya la suficiente biomasa, ésta se trasladó a frascos de vidrio estériles con 100 mL de LB líquido, dejándolas en estufa a 30°C durante 21h con una agitación de 130 rpm. El cultivo para la preparación del inóculo debe estar entre el final de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria de su crecimiento. Después de este periodo, el volumen completo de las muestras se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, conservando el pellet se procedió a su lavado en dos ocasiones con 50 mL MSM para garantizar la pureza del inóculo. Después del último lavado, se conservó el pellet, el cual junto con un pequeño volumen de MSM se resuspendió. La cantidad de medio MSM con la que se resuspende dependerá de la densidad óptica que vayamos buscando, y se añade en un tubo Falcon hasta el volumen necesario, en torno a los 3 mL de cada bacteria para el global del ensayo, estimando una concentración de 10^9 UFC/g en la escala de McFarland. Todo este proceso se puede observar en la figura 11.

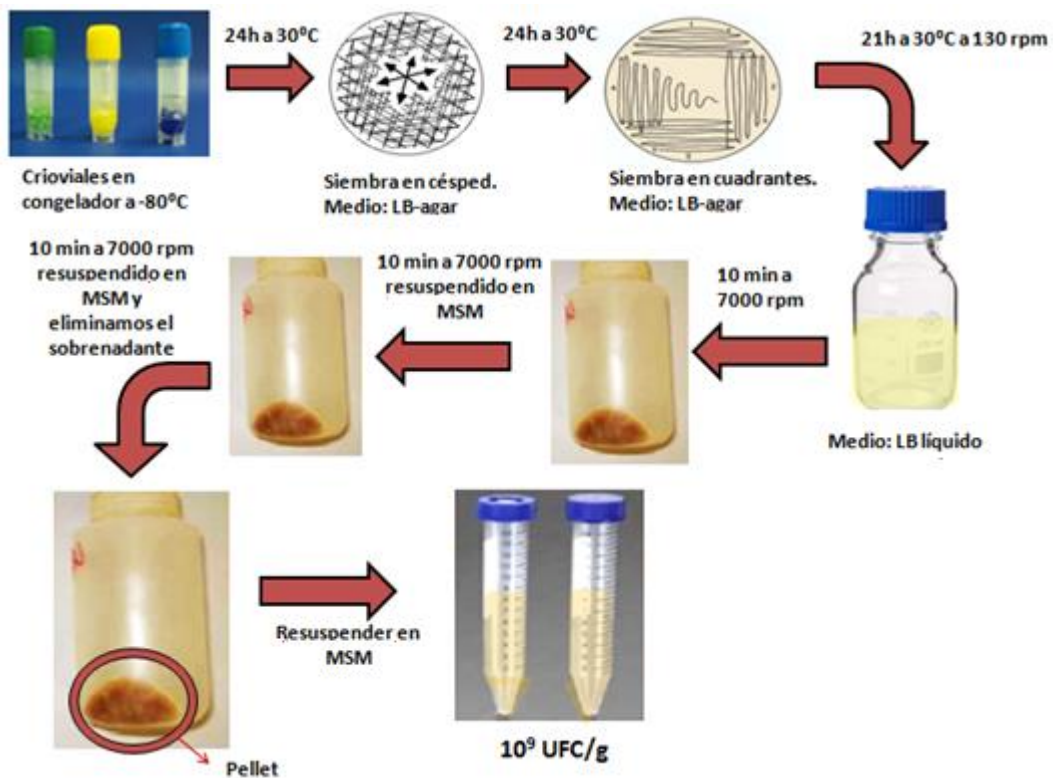


Figura 11. Esquema del proceso de preparación del inóculo de cada cepa bacteriana.

3.2.4. Demanda biológica de oxígeno

El ensayo de la demanda biológica de oxígeno, respirometría, o DBO, concierne la determinación de la degradación de sustancias orgánicas por microorganismos. La DBO es un parámetro que mide la cantidad de oxígeno consumido por una población microbiana al degradarse la materia orgánica de una muestra líquida. Las bacterias, debido al proceso de respiración, emitirán dióxido de carbono, que va a reaccionar con lentejas de sosa (hidróxido de sodio) ubicadas en el tapón de la botella, formando carbonato de sodio y agua (figura 12). De esta manera el dióxido de carbono producido por las cepas bacterianas que se encuentra en fase gaseosa, al ser convertido en carbonato de sodio provoca un descenso de esta fase y por lo tanto un descenso de presión que será medido por el cabezal oxitop. La determinación de la DBO será posible al medir indirectamente dióxido de carbono y el cambio indirecto de presión.

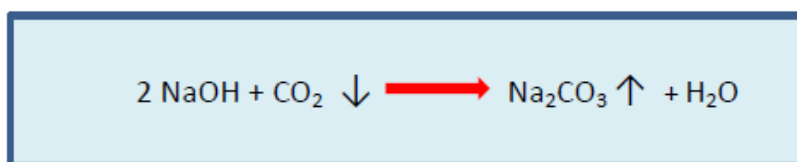


Figura 12. Reacción química en el oxitop.

Para ello se emplearon botellas oxitop de vidrio color topacio, previamente esterilizadas en estufa, especiales para el experimento. Para cada experimento se dispuso de dos ensayos controles y un inoculado. El ensayo control se prepara igual que el inoculado a excepción del inóculo bacteriano.

En el caso de paracetamol y ofloxacino, se añade 10 mg de fármaco en polvo en una botella estéril de 1L que contiene 900 ml de H₂O mili Q, 99 ml de MSM y 1000μl de SNs para que la solución alcance una concentración final de 10 mg L⁻¹, ya que presentan una solubilidad en agua de 12,8 g/L y 28,3 g/L, respectivamente. Finalmente, cuando se prepara el ensayo a la botella oxitop se le añade 163 mL de la solución que contiene el fármaco y 1 mL del inóculo bacteriano. Todo este proceso se observa de forma esquematizada en la figura 13. En el caso del control se añade 164 mL de la solución con el fármaco sin añadir inóculo bacteriano.

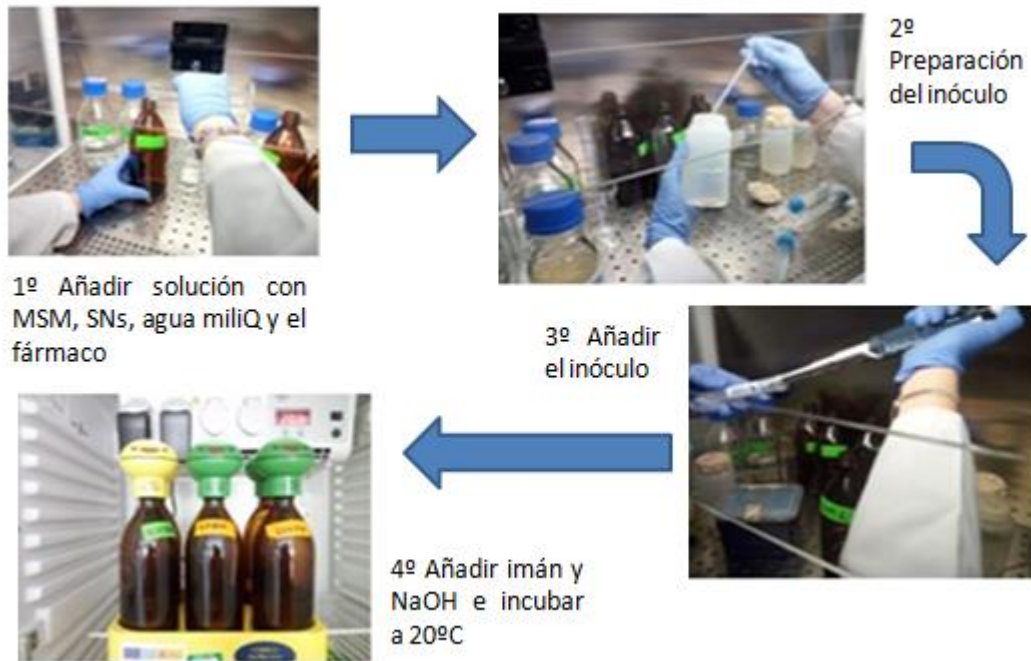


Figura 13. Esquema de la preparación del ensayo de DBO con paracetamol y ofloxacino.

En el caso de ibuprofeno y carbamazepina, debido a su baja solubilidad en agua, 21mg/L y 17,7 mg/L, respectivamente, se parte de una solución fármaco:metanol 500 mg L⁻¹ de la que se depositan 3,28 mL en la botella oxitop, y se deja evaporar el metanol bajo campana de flujo laminar para posteriormente añadir el resto de componentes, con el objetivo de que ambos fármacos estuvieran como polvo muy fino y por tanto más fácil de disolver. Finalmente, cuando se prepara el ensayo en la botella oxitop con el fármaco se añaden 146,6 mL de agua miliQ previamente esterilizada en autoclave, 16,4 mL de MSM, 164 µL de SNs y 1 mL del inóculo bacteriano, cuya obtención se explica en el apartado 3.2.2. de esta memoria. Todo este proceso se observa de forma esquematizada en la figura 14. En el caso del control se añadió 147,7 mL de agua miliQ, 16,4 mL de MSM y 164µL de SNs sin añadir inóculo bacteriano.

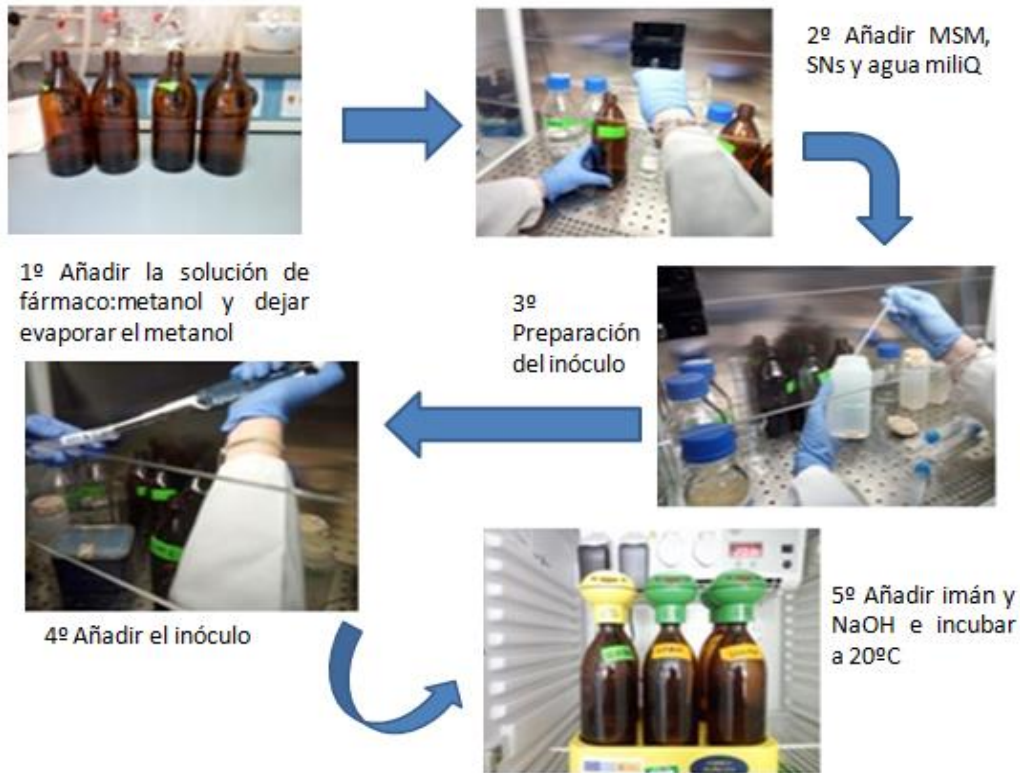


Figura 14. Esquema de la preparación del ensayo de DBO con ibuprofeno y carbamazepina.

En ambos casos se depositó la mezcla de los componentes mencionados en la botella, en la cual se introdujo un imán para mantener la solución en agitación continua. Se cerraron las botellas con el cabezal oxitop (figura 15), dónde se introdujo la sosa en lentejas.



Figura 15. Cabezal oxitop y cabina termostática.

En dichos cabezales quedaron registrados automáticamente los valores de mg de oxígeno consumidos (L^{-1}). Las botellas se mantuvieron durante 20 días en unas cabinas termostáticas (figura 15), con agitación a una temperatura constante de 20°C.

Los valores obtenidos en el cabezal oxitop, deben ser multiplicados por un factor de conversión para obtener los valores reales de DBO, estos factores están sujetos al volumen del ensayo (tabla 5). En nuestro caso, al haber utilizado un total de 164 mL de muestra, debemos

multiplicar los resultados obtenidos por el factor 10.

Tabla 5. Factor de conversión de valores obtenidos en el experimento de DBO según el volumen de muestra usado.

Cantidad de muestra usada [mL]	Factor
432	1
365	2
250	5
164*	10*
97	20
43,5	50
22,7	100

*La cantidad de muestra usada es de 164 mL, por tanto el factor a utilizar es 10.

Es muy importante mantener las condiciones de esterilidad para asegurarnos de que la muestra no se contamina con otro microorganismo durante el proceso el cual pueda degradar el contaminante. Es por ello que se trabajará bajo campana de flujo laminar y con el material estéril en los apartados 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3 y 3.2.4.

3.2.5. Análisis de los fármacos

Tras estos 20 días de duración del ensayo, se midió la concentración remanente de cada fármaco en la botella oxitop mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El líquido acuoso remanente en la botella se trasladó previamente a viales para HPLC. Los cromatogramas se obtuvieron en un equipo de HPLC compacto (Shimadzu LC-2010^a HT Liquid chromatograph) con un detector ultravioleta visible, empleando una columna Kromasil C18 de fase reversa 15 x 0,4 (cm x cm) suministrada por Teknokroma (España). Para la adquisición y manejo de los datos se empleó el programa informático LC Solution Analysis. A través de una curva de calibrado de los diferentes fármacos, se convirtió el área obtenida en unidades de concentración. Dichas curvas de calibrado contaban con 6 puntos con las siguientes concentraciones: 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm y 10 ppm. Para medir dichas muestras en HPLC-UV se emplean diferentes métodos según el fármaco con las condiciones que se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Características de los métodos utilizados en HPLC-UV para cada fármaco.

Fármaco	Temperatura (°C)	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (nm)	Fase móvil
Paracetamol	25	1,60	244	900 mL agua miliQ, 100 mL metanol y 1 mL ácido fosfórico
Carbamazepina	25	1,90	210	700 mL acetonitrilo y 300 mL agua miliQ con 0,952 g fosfato potásico y pH ajustado a 2,5 con ácido fosfórico al 85%
Ofloxacino	30	3,25	290	900 mL agua miliQ, 100 mL metanol y 1 mL ácido fosfórico
Ibuprofeno	33	3,60	220	620 mL agua miliQ, 380 mL metanol y 0,5 mL ácido trifluoroacético
Flujo isocrático (mL/min): 1.000				

3.2.6. Ensayos de biodegradación de fármacos en solución en presencia de cepas bacterianas

La biodegradación del fármaco en solución se realiza con el objetivo de comprobar la capacidad degradadora de las cepas bacterianas aisladas que han mostrado los resultados más prometedores en los ensayos preliminares de DBO, pero a tiempos más largos de tratamiento (90 días). A continuación, se expondrá el procedimiento a seguir para la puesta en marcha de los ensayos de biodegradación en solución. La primera etapa del experimento radica en la

obtención de biomasa de las cepas bacterianas que se van a emplear, tal y como se explica previamente en el apartado 3.2.3. "Preparación del inóculo de las cepas bacterianas". Tras esto, se procederá de diferente manera según la solubilidad del fármaco.

Uno de los ensayos de biodegradación en solución se realizará con las cepas aisladas de carbamazepina, concretamente C3 y C5, ya que son las que mejores resultados han dado en la DBO. Las cepas bacterianas C3, C5 y un control no inoculado de bacterias constituyeron los 3 tratamientos que se realizaron en esta biodegradación en solución. Tanto el control como los tratamientos C3 y C5 se realizarán por triplicado. Este ensayo se llevará a cabo en tubos de vidrio esterilizados con tapón, los cuales contendrán: 20 μL del inóculo bacteriano preparado (excepto el ensayo control), 3 mL de MSM, 3 μL de SNs y 600 μL de una solución de carbamazepina en metanol de 50 ppm, para poder tener una concentración final de carbamazepina de 10 ppm en 3 mL. El fármaco en metanol será el primer componente en añadirse para que se evapore el metanol bajo campana de flujo laminar. Finalmente, tras ser añadidos los diferentes compuestos, los viales se someterán a agitación continua bajo unas condiciones de 150 rpm y 20°C hasta la toma de muestras. En lo que se refiere a la toma de las muestras, éstas tienen lugar dependiendo de los tiempos establecidos para el ensayo (0, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días). El proceso de preparación de este experimento se encuentra esquematizado en la figura 16. La metodología para la toma de muestras y medida de la concentración del fármaco por HPLC es la misma citada anteriormente en el apartado 3.2.5 de esta memoria.

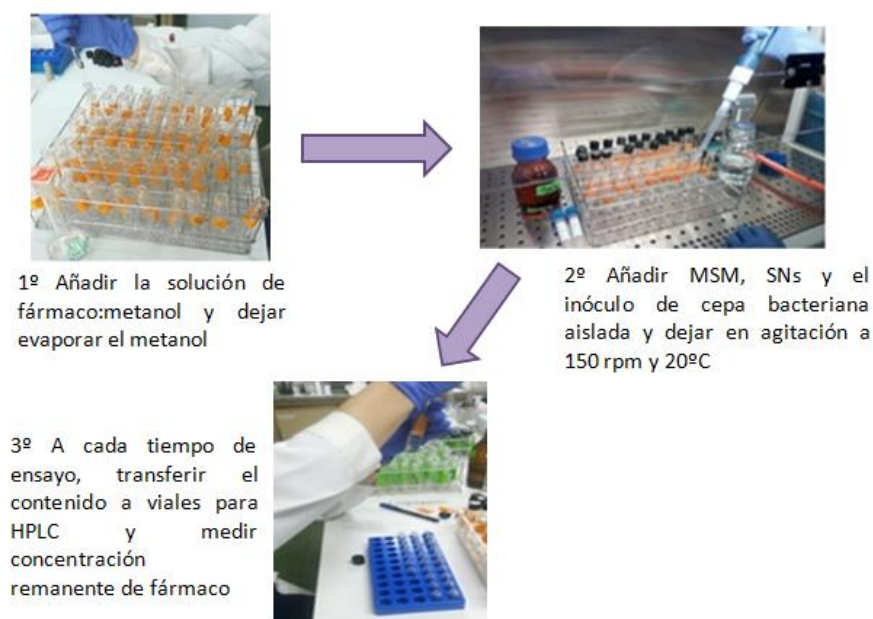


Figura 16. Esquema de la preparación ensayo de biodegradación de carbamazepina en solución.

También se realizará un ensayo de biodegradación en solución con paracetamol en el cual se utilizaron tres cepas aisladas en el enriquecimiento con paracetamol, concretamente P1, P2 y P3. Además, se utilizarán 2 cepas bacterianas exógenas, concretamente, *Pseudomonas putida* (figura 17) y *Stenotrophomonas maltophilia* (figura 18). Ya que ambas, de acuerdo a la bibliografía, degradan paracetamol (Zur et al., 2018; Zhang et al., 2013). Estas dos cepas bacterianas se habían obtenido anteriormente en el grupo de investigación mediante la técnica del enriquecimiento utilizada en esta misma memoria y descrita en el apartado 3.2.1 pero utilizando otros contaminantes orgánicos diferentes. Concretamente, *Stenotrophomonas maltophilia* se obtuvo del enriquecimiento con pireno de un lodo, diferente al utilizado en este trabajo, procedente de la EDAR de EMASESA Tablada (Sevilla). Del mismo lodo citado pero enriquecido con nonilfenol se obtuvo *Pseudomonas putida*.



Figura 17. *Pseudomonas putida*.

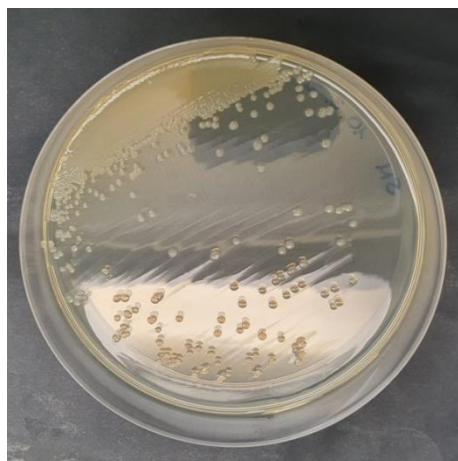


Figura 18. *Stenotrophomonas maltophilia*.

Las cepas bacterianas P1, P2, P3, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* y un control no inoculado de bacterias constituyen los 6 tratamientos que se realizarán en esta biodegradación de paracetamol en solución. El tratamiento P1, P2, P3, *Pseudomonas putida* y

Stenotrophomonas maltophilia se realizarán por triplicado. Cada tubo de vidrio con tapón utilizado contendrá: 20 μ L del inóculo bacteriano preparado (excepto el ensayo control), 3 mL de una solución de 10 ppm de paracetamol en MSM y 3 μ L de SNs. Finalmente, tras ser añadidos los diferentes compuestos, los viales se someterán a agitación continua bajo unas condiciones de 150 rpm y 20°C hasta la toma de muestras. En lo que se refiere a la toma de las muestras, éstas tienen lugar dependiendo de los tiempos establecidos para el ensayo (0, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días). El esquema de este proceso se encuentra esquematizado en la figura 19. La metodología para la toma de muestras y la medida de la concentración de paracetamol remanente por HPLC es la misma citada anteriormente en el apartado 3.2.5 de esta memoria. En este ensayo también es fundamental mantener las condiciones de esterilidad.



1º Añadir MSM, paracetamol, SNs y el inóculo de cepa bacteriana aislada y dejar en agitación a 150 rpm y 20°C



2º A cada tiempo de ensayo, transferir el contenido a viales para HPLC y medir la concentración remanente de fármaco

Figura 19. Esquema de la preparación del ensayo de biodegradación de paracetamol en solución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de los distintos fármacos

Se obtuvieron diferentes cepas bacterianas presentes en el lodo empleado (endógenas) identificadas visualmente y aisladas atendiendo a su distinta morfología, tamaño, color, elevación, etc. Las distintas bacterias fueron obtenidas gracias a la técnica de enriquecimiento del lodo que se realizó utilizando los diferentes fármacos por separado como únicas fuentes de carbono y energía, la cual se encuentra explicada en el apartado 3.2.1 de esta memoria. A continuación, se detallan las distintas cepas bacterianas obtenidas con cada fármaco empleado:

Paracetamol. Se obtuvieron 4 cepas bacterianas con diferente morfología para paracetamol: P1, P2, P3 y P4, las cuales se muestran sembradas en medio LB-agar en la figura 20.

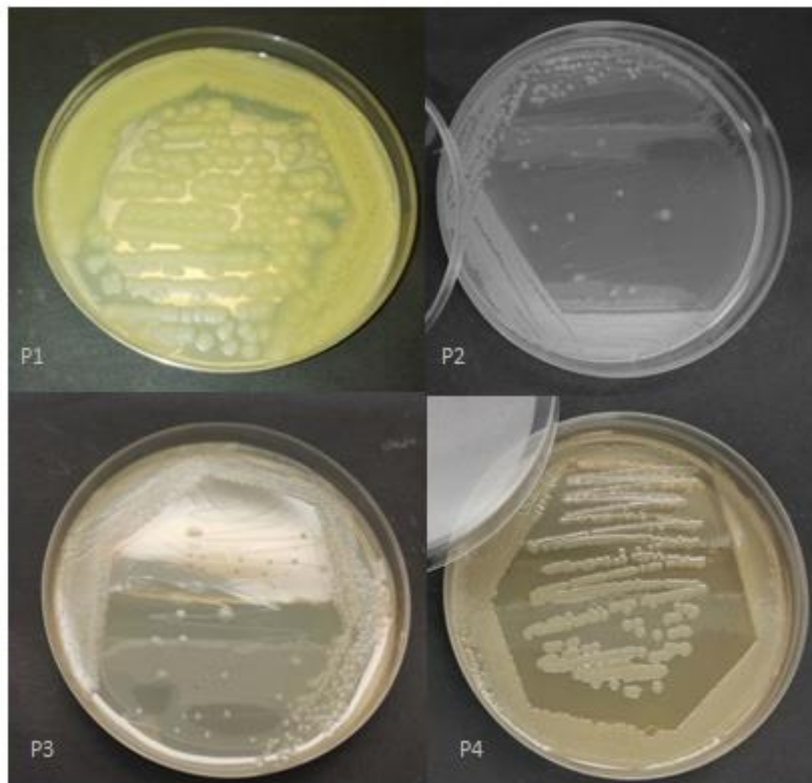


Figura 20. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con paracetamol.

Ibuprofeno. Se obtuvieron 3 cepas bacterianas para ibuprofeno: I1, I2 e I3, las cuales se muestran sembradas en medio LB-agar en la figura 21.

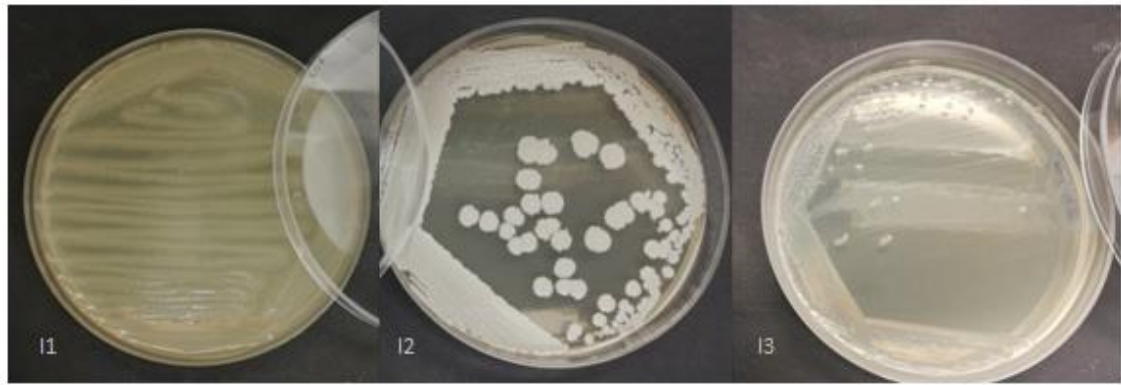


Figura 21. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con ibuprofeno.

Carbamazepina. Se obtuvieron 5 cepas bacterianas para carbamazepina: C1, C2, C3, C4 y C5, las cuales se muestran sembradas en medio LB-agar en la figura 22.

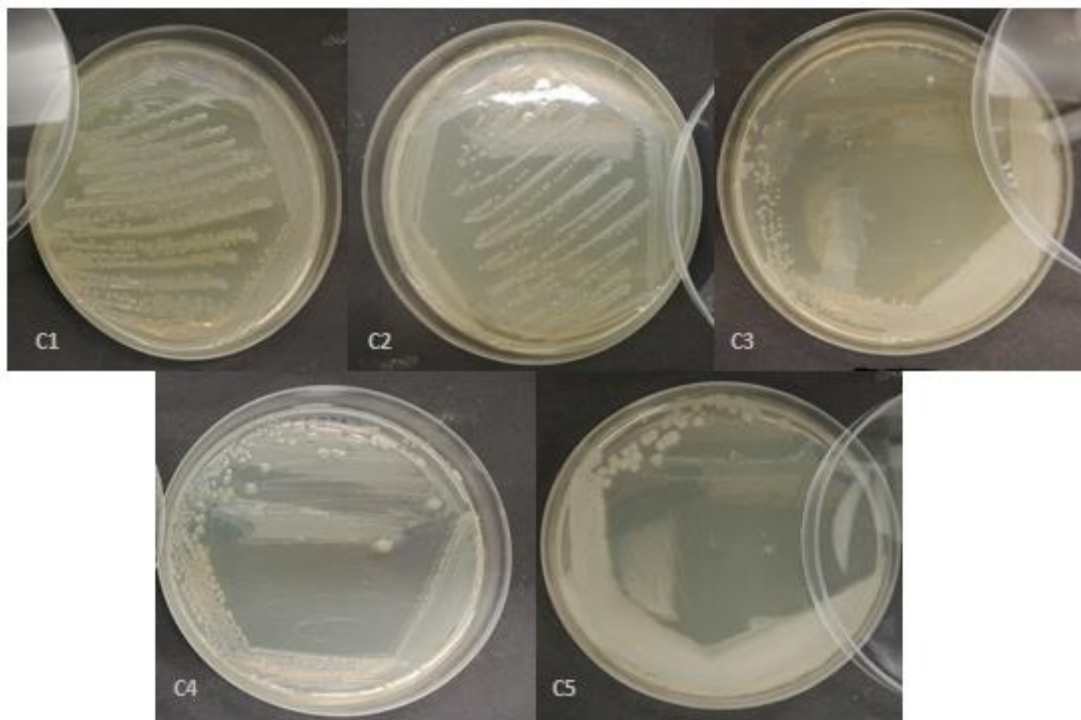


Figura 22. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con carbamazepina.

Ofloxacino. Se obtuvieron 5 cepas bacterianas para ofloxacino: O1, O2, O3, O4 y O5, las cuales se muestran sembradas en medio LB-agar en la figura 23.

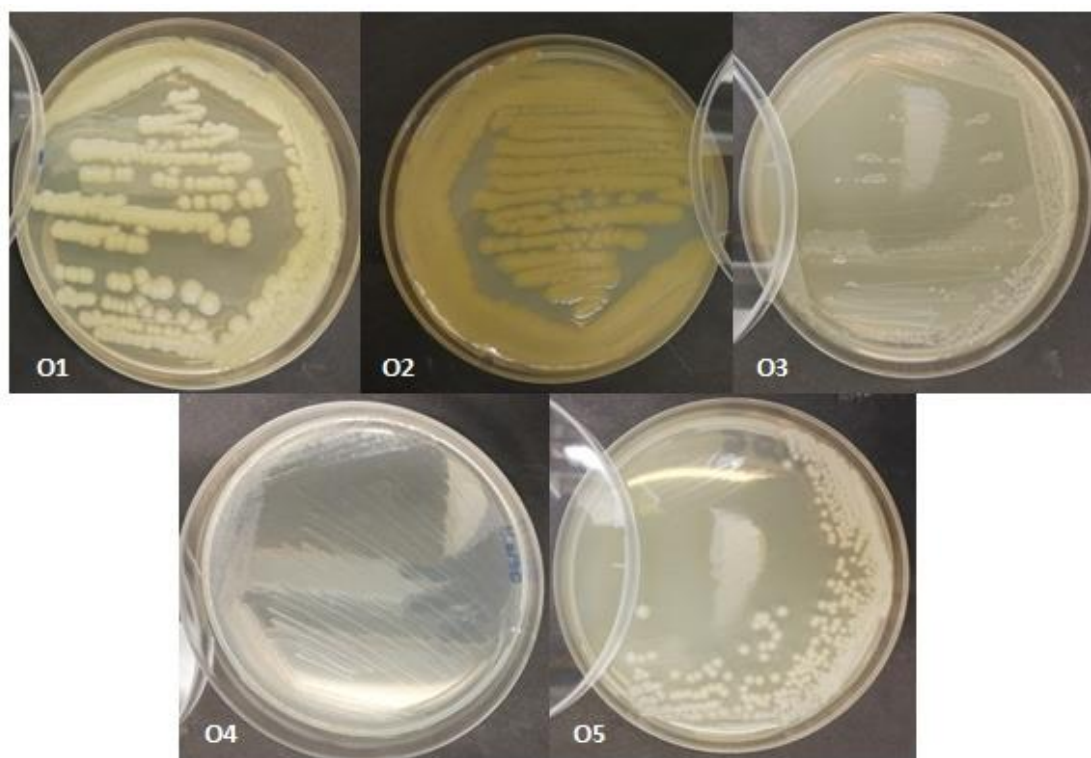


Figura 23. Cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con ofloxacino.

4.2. Demanda biológica de oxígeno

Se realizó un experimento preliminar, llamado DBO, el cual da una idea previa de la capacidad degradadora de las distintas cepas previamente aisladas con su respectivo contaminante. Para ello se comprobó que las cepas bacterianas I1, I2 e I3 aisladas del lodo, llevaban a cabo la degradación del contaminante ibuprofeno. Al igual con las cepas bacterianas P1, P2, P3 y P4 con paracetamol; C1, C2, C3, C4 y C5 con carbamazepina y O1, O2, O3, O4 y O5 con ofloxacino.

Los contaminantes constituyen la única fuente de carbono y energía para las cepas bacterianas, las cuales fueron inoculadas justo antes de alcanzar la fase estacionaria de su crecimiento, ya que durante la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas.

En los experimentos de DBO, al aumentar la masa bacteriana, se produce un mayor consumo de oxígeno, que se traduce en una mayor producción de CO_2 , que reacciona con el hidróxido de sodio produciendo un aumento en la producción de carbonato de sodio, dando un ligero descenso de la fase gaseosa y una presión negativa que quedará registrada en el cabezal oxitop, por lo que las bacterias han llevado a cabo la biodegradación del contaminante puesto

que era el único aporte de carbono y fuente de energía.

En primer lugar, las figuras 24, 25, 26 y 27, muestran las curvas donde se representan los mg de oxígeno consumidos en la solución frente al tiempo. Tras los resultados obtenidos en los que se comparan el ensayo control (sin bacterias) y las muestras inoculadas con las distintas bacterias aisladas, se observa que todas las cepas bacterianas, comparadas con su control aumentan el consumo de oxígeno, por lo que éstas se multiplican y aumentan su masa bacteriana. Esto significa que todas las bacterias son capaces de usar el fármaco ensayado en cada caso como fuente de carbono, aunque algunas bacterias presentan mayor capacidad de degradación que otras.

Observando la gráfica de las cepas bacterianas obtenidas a partir del enriquecimiento con ibuprofeno (figura 24) comentar que prácticamente la bacteria I3 tiene un resultado muy parecido al control, con lo cual la degradación del fármaco por esta cepa bacteriana es insignificante. En cambio, las bacterias I1 e I2, con las que se obtienen un 50 y 40 mg de oxígeno/L, respectivamente, pueden ser potencialmente capaces de degradar el fármaco.

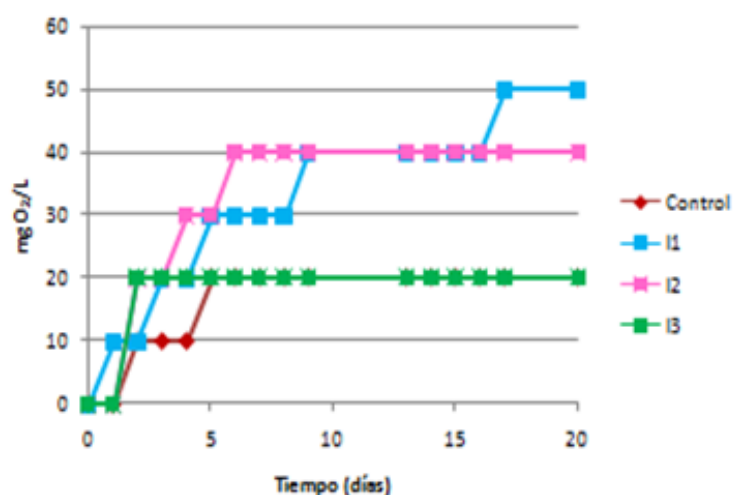


Figura 24. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con ibuprofeno.

Respecto a paracetamol (figura 25), las cepas bacterianas P3 y P4 son las más parecidas al control, aunque muestran perfiles de consumo de oxígeno algo superiores a éste, siendo las cepas P1 y P2 las que alcanzan valores de oxígeno consumido más altos, llegando a alcanzarse 60 mg de oxígeno/L en la cepa bacteriana P1.

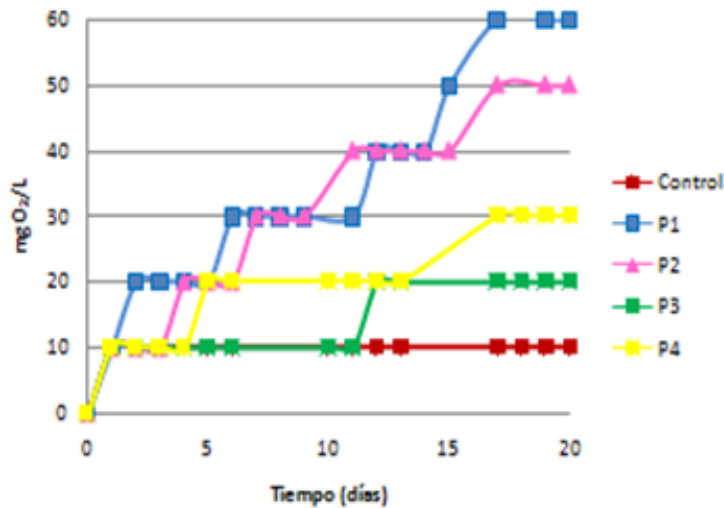


Figura 25. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con paracetamol.

Asimismo, observando la gráfica de carbamazepina (figura 26), se observa que todas las cepas bacterianas son muy similares respecto al valor final de mg de oxígeno/L alcanzado, llegando a alcanzarse el valor 60 mg de oxígeno/L por la mayoría de ellas, aunque diferenciándose en el tiempo en el que se alcanza este valor.

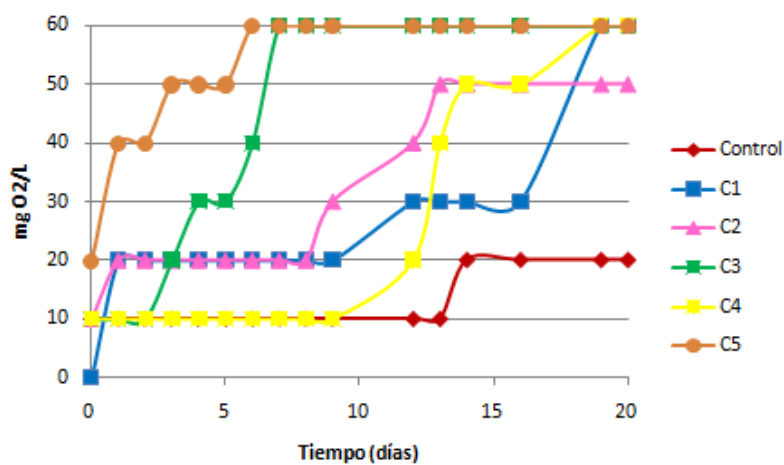


Figura 26. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con carbamazepina.

Por último, con las cepas bacterianas obtenidas de ofloxacino (figura 27), se observa que O3 es la única cepa bacteriana con la que se obtienen valores muy similares al grupo control, pero que las demás cepas bacterianas alcanzan todas ellas el valor de 60 mg de oxígeno/L en un periodo corto de tiempo, presentando una cinética de consumo de oxígeno muy alta, mucho mayor que las bacterias correspondientes a los otros fármacos.

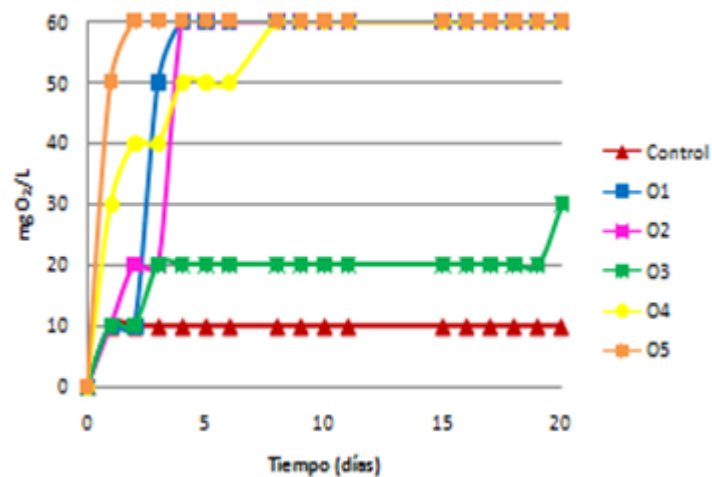


Figura 27. Oxígeno consumido (mg/L) a los distintos tiempos del experimento de DBO con ofloxacino.

4.3. Análisis de los fármacos tras los experimentos de DBO

Tras los 20 días de duración de la DBO, se midió la concentración de fármaco remanente en las botellas de oxitop para comprobar el potencial biodegradador de cada cepa bacteriana aislada. Las figuras 28, 29, 30 y 31, muestran las gráficas donde se representa el porcentaje de cada fármaco remanente en cada botella según la cepa bacteriana utilizada.

Tras estos resultados obtenidos en los que se comparan el ensayo control (sin bacterias) y las muestras inoculadas, se observa que, aunque en los resultados de DBO las bacterias mostraban que eran capaces de usar cada fármaco como fuente de carbono, ninguna de las cepas bacterianas obtenidas del enriquecimiento con ibuprofeno logra degradar una concentración importante de ibuprofeno (figura 28).

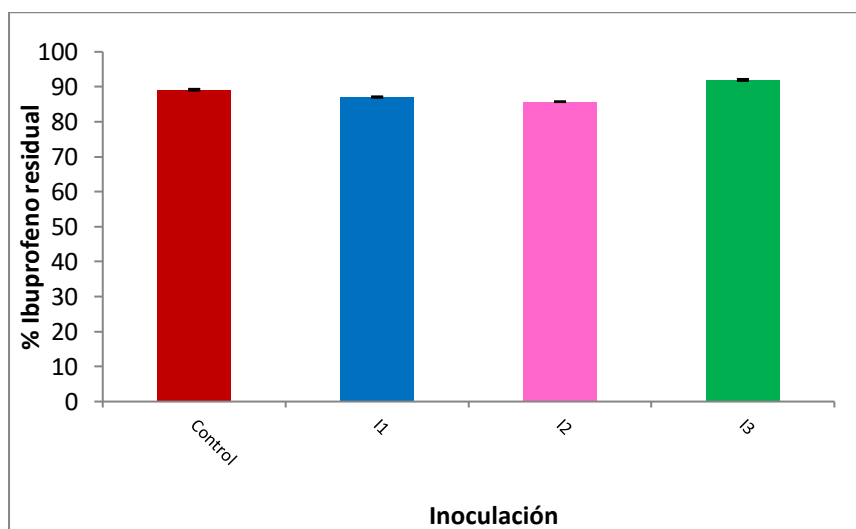


Figura 28. Gráfica de porcentaje remanente de ibuprofeno a los 20 días.

Asimismo, ocurre similar con las cepas obtenidas del enriquecimiento con ofloxacino, ya que ninguna biodegrada el fármaco en cantidades apreciables (figura 29).

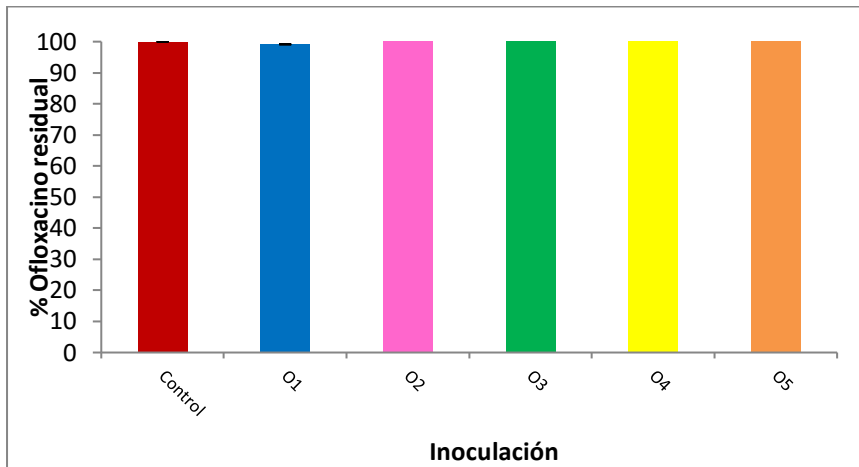


Figura 29. Gráfica de porcentaje remanente de ofloxacino a los 20 días.

Sin embargo, en las cepas bacterianas obtenidas a partir del enriquecimiento con paracetamol (figura 30) sí se observa cierta degradación del fármaco, concretamente con P1, P2 y P3, siendo P1 y P2 las cepas con las que mejores resultados se obtienen, llegando a degradarse la mitad de la cantidad de fármaco añadida (10 mg/L).

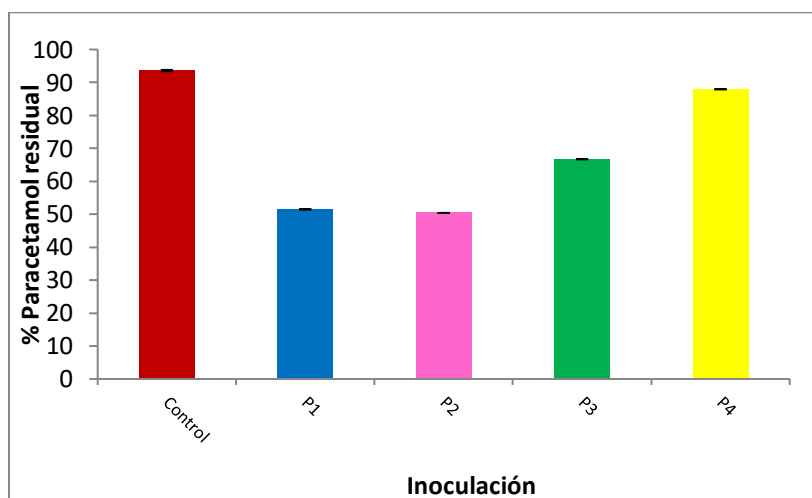


Figura 30. Gráfica de porcentaje remanente de paracetamol a los 20 días.

Respecto a carbamazepina (figura 31) también se observa la degradación del fármaco con dos cepas bacterianas, C3 y C5, llegando a biodegradar C3 un 85% de la cantidad de fármaco añadida.

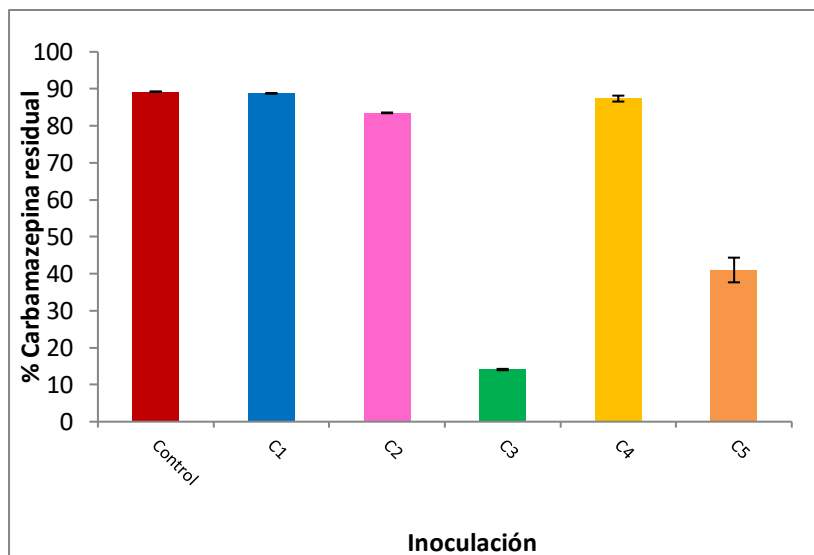


Figura 31. Gráfica de porcentaje remanente de carbamazepina a los 20 días.

4.4. Biodegradación de los fármacos en solución en presencia de cepas bacterianas

Tras la determinación de la DBO de cada cepa bacteriana aislada, se decidió realizar, en base a los resultados obtenidos previamente, un ensayo de biodegradación en solución explicado anteriormente, para así poder confirmar la capacidad degradadora de cada cepa bacteriana. Como se ha comentado, este ensayo se realizó en solución, por lo que el fármaco se encontraba totalmente biodisponible para su utilización por las cepas bacterianas. Este tipo de ensayo es el más adecuado para comprobar si la bacteria utilizada incorpora el compuesto a su metabolismo y lo degrada, así como la cinética de dicha degradación a lo largo plazo de tiempo (90 días) ya que el fármaco es la única fuente de carbono presente en el medio y, además, no existen otros elementos que puedan evitar la utilización del fármaco por los microorganismos, ya que si el fármaco se hubiera añadido junto con el lodo, éste podría adsorber el fármaco encontrándose, por tanto, menos biodisponible para su biodegradación.

Sin embargo, lamentablemente, debido a circunstancias excepcionales de la pandemia del virus COVID-19, tras preparar el experimento no ha sido posible la recogida de muestras de este ensayo a los tiempos previstos y no han podido obtenerse resultados. Lo esperado hubiera sido que la concentración remanente de fármaco en los tubos hubiera disminuido siendo degradado por las cepas bacterianas presentes en el ensayo. Asimismo, tras la realización del ensayo de biodegradación en solución, las cepas bacterianas que confirmen su capacidad degradadora, deberían haber sido identificadas mediante la secuenciación del ARNr 16s gracias al laboratorio Stab Vida.

5. CONCLUSIONES

Las EDARs no poseen métodos eficaces a la hora de eliminar ciertos fármacos, quedando por tanto gran parte de ellos presentes en lodos de depuradora. Algunos fármacos son considerados contaminantes emergentes cuyo efecto en el medioambiente, y por tanto en la salud humana, es muy negativo. Se quiere explorar la posibilidad de eliminar ciertos fármacos de lodos de depuradora mediante el bioaumentación, que consiste en añadir al lodo contaminado microorganismos que posean la capacidad catabólica de degradar parcial o totalmente dichos fármacos. El primer paso es poder aislar microorganismos degradadores específicos de los mismos, y esto es lo que se ha llevado a cabo en el presente estudio para los fármacos paracetamol, ofloxacino, ibuprofeno y carbamazepina, y las conclusiones alcanzadas son:

1. En los experimentos de obtención de cepas bacterianas degradadoras específicas de los fármacos seleccionados, se han conseguido aislar del lodo tres cepas bacterianas capaces de crecer con ibuprofeno como única fuente de carbono (I1, I2, I3), cinco con carbamazepina (C1, C2, C3, C4, C5), cuatro con paracetamol (P1, P2, P3, P4), y cinco con ofloxacina (O1, O2, O3, O4 y O5) mediante la técnica de cultivos de enriquecimiento del lodo con dichos fármacos.
2. El consumo de oxígeno debido al aumento de la masa bacteriana durante la degradación de los fármacos mediante inoculación de las distintas cepas bacterianas aisladas fue medido por DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), y aportó una idea preliminar de que las cepas bacterianas I1, I2, C3, C5, P1, P2, O4 y O5 son las que tienen mayor potencial para degradar su respectivo fármaco.
3. La concentración residual de cada fármaco medida al finalizar los ensayos de DBO indicó que las cepas C3 y C5 para carbamazepina, y P1, P2 y P3 para paracetamol son las cepas bacterianas que presentaron los mayores porcentajes de degradación de dichos fármacos. Con las restantes cepas investigadas, la degradación de los fármacos en medio acuoso no fue significativa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [en línea]. [Consultado en febrero de 2020]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/>.
- Alexander M. Biodegradation and bioremediation. 2º ed. USA: Elsevier; 1999.
- Asif MB, Hai FI, Singh L, Price WE, Nghiem LD. Evaluation of sediment contamination by heavy metals, organochlorinated pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Berre coastal lagoon (southeast France). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2017; 65(3): 396-406.
- Bot Plus [en línea]. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <https://www.portalfarma.com/inicio/botplus20/Paginas/Bot-PLUS-2-0.aspx>.
- Ali AM, Thorsen H, Sydnes LK, Alarif WM, Kallenborn R, Al-lihaibi SS. Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea. *Sci. Total. Environ.* 2018; 621: 654–662.
- Aydin S. Enhanced biodegradation of antibiotic combinations via the sequential treatment of the sludge resulting from pharmaceutical wastewater treatment using white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 100: 6491-6499.
- Ben-Mordechay E, Tarchitzky J, Chen Y, Shenker M, Chefetz B. Composted biosolids and treated wastewater as sources of pharmaceuticals and personal care products for plant uptake: A case study with carbamazepine. *Environ. Pollut.* 2018; 232: 164-172.
- Biel-Maeso M, Corada-Fernández C, Lara-Martín PA. Removal of personal care products (PCPs) in wastewater and sludge treatment and their occurrence in receiving soils. *Water. Res.* 2019; 150: 129-139.
- Boon N, Goris J, De Vos P, Verstraete W, Top EM. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* Strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66 (7): 2906-2913.
- Brausch JM, Rand GM. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere.* 2011; 82: 1518–1532.
- Briones RM, Zhuang WQ, Sarmah AK. Biodegradation of metformin and guanlylurea by aerobic cultures enriched from sludge. *Environ. Pollut.* 2018; 243: 255-262.
- Burkhardt-Holm P, Segner H, Burki R, Peter A, Schubert S, Suter MJF, et al. Estrogenic endocrine disruption in Switzerland: assessment of fish exposure and effects. *Chimia.* 2008; 62: 376–382.
- Cantarero R, Richter P, Brown S, Ascar L, Ahumada I. Effects of applying biosolids to soils on the adsorption and bioavailability of 17 α -ethinylestradiol and triclosan in wheat plants.

Environ. Sci. Pollut. Res. 2017; 24: 12847-12859.

-Carballa M, Omil F, Lema JM. Calculation methods to perform mass balances of micropollutants in sewage treatment plants. Application to pharmaceutical and personal care products (PPCPs). Environ. Sci. Technol. 2007; 41: 884–890.

-Chen J, Zhou X, Nie X, Jiang T. Fate of Ciprofloxacin in a simulated micro-cosmos system by different exposure ways. Acta. Ecol. Sin. 2001; 27: 5300–5307.

-Chen Y, Yu G, Cao Q. Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge. Chemosphere. 2013; 93: 1765-1772.

-Citulski JA, Farahbakhsh K. Fate of endocrine-active compounds during municipal biosolids treatment: a review. Environ. Sci. Technol. 2010; 44: 8367–8376.

-Clara M, Strenn B, Kreuzinger N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. Water. Res. 2004; 38: 947–954.

-Clarke BO, Smith SR. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. Environ. Int. 2011; 37: 226–247.

-Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (2018). Orden de 6 de agosto de 2018 por la que se regula la utilización de lodos tratados de depuradora en el sector agrario. BOJA 156, 10-24.

-Consejo de Europa. 1986. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Diario Oficial n° L 181 de 04/07/1986, 6-12.

-Coogan MA, Edziyie RE, La Point TW, Venables BJ. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater, treatment plant receiving stream. Chemosphere. 2007; 67: 1911–1918.

-Dalgic G, Turkdogan FI, Yetilmezsoy K, Kocak E. Treatment of real paracetamol wastewater by fenton process. Chem. Ind. Chem, Eng. Q. 2017; 23(2): 177-186.

-Daughton CG. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Oversarching Issues and Overview. ACS Publications. 2001.

-Eggen T, Moeder M, Arukwe A. Municipal landfill leachates: a significant source for new and emerging pollutants. Sci. Total. Environ. 2010; 408 (21): 5147–5157.

-Faigle J, Feldmann K. Pharmacokinetic Data of Carbamazepine and Its Major Metabolites in Man; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1975; 159–165.

-Fair PA, Lee H, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alaei M, et al. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment.

Environ. Pollut. 2009; 157: 2248–2254.

-Fraker SL, Smith GR. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. Environ. Toxicol. 2004; 19: 250–256.

-García-Astillero, A. Tipos de tratamiento de aguas residuales [en línea]. 2008. [Consultado en febrero 2020]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/tipos-de-tratamiento-de-aguas-residuales-1448.html>

-González-Granados IC. Generación, caracterización y tratamiento de lodos de EDAR. 2015. Universidad de Córdoba. Departamento de química inorgánica e ingeniería química.

-Hai FI, Yang S, Asif MB, Sencadas V, Shawkat S, Sanderson-Smith M, et al. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in water: occurrences, toxicological effects, regulations and removal by wastewater treatment technologies. Water. 2018; 10: 107.

-Herrero M, Stuckey DC. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. Chemosphere. 2015. 140: 119-128.

-ISO 17402:2011. Calidad del suelo. Requisitos y directrices para la selección y aplicación de métodos de evaluación de la biodisponibilidad de contaminantes en suelo y en materiales del suelo (ISO 17402:2008) (Ratificada por AENOR en agosto de 2011).

-Jefatura del Estado. 2011. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminado. Texto Consolidado. BOE 181, referencia BOE-A-2011-13046.

-Jelic A, Gross M, Ginebreda A. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. Water. Res. 2011; 45: 1165-76.

-Jia Y, Yin L, Khanal SK, Zhang H, Oberoi AS, Lu H. Biotransformation of ibuprofen in biological sludge systems: Investigation of performance and mechanisms. Water. Res. 2020; 170: 115303.

-Jones V, Gardner M, Ellor B. Concentrations of trace substances in sewage sludge from 28 wastewater treatment works in the UK. Chemosphere. 2014; 111: 478-484.

-Kabak H. Cukurova University, Institute of Natural and Applied Sciences, Adana, 2008.

-Kagle J, Porter AW, Murdoch RW, Rivera-Cancel, Hay AG. Biodegradation of pharmaceutical and personal care products. Adv. Appl. Microbiol. 2009; 67: 65-108.

-Kipper K, Lillenberg M, Herodes K, Nel L, Haiba E. Simultaneous determination of fluoroquinolones and sulfonamides originating from sewage sludge compost. Sci. World. J. 2017; Volume 2017, Article ID 9254072, 8 p.

-Leng L, Wei L, Xiong Q, Xu S, Wenting L, Lv S et al. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. Chemosphere. 2020; 238: 124680.

-Li J, Ye Q, Gan J. Degradation and transformation products of acetaminophen in soil. Water.

Res. 2014; 49: 44-52.

-Li W, Shi Y, Gao L, Liu J, Cai Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*. 2012; 89: 1307–1315.

-Lillenberg M, Yurchenko S, Kipper K. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2009; 1216 (32): 5949–5954.

-Liu J, Dan X, Lu G, Shen J, Wu D, Yan Z. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018; 15 (154): 214-220.

-Liu J, Wang R, Huang B, Lin C, Wang Y, Pan, X. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environ. Pollut.* 2011; 159: 2815–2822.

-Mailler R, Gasperi J, Patureau D. Fate of emerging and priority micropollutants during the sewage sludge treatment: Case study of Paris conurbation. Part 1: Contamination of the different types of sewage sludge. *Waste. Manag. Res.* 2017; 59: 379-393.

-Martín J, Santos JL, Aparicio I. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. *Sci. Total. Environ.* 2015; 503 (504): 97-104.

-Martínez-Hernández V, Meffe R, Herrera-López S, Bustamante I. The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: A kinetics study. *Sci. Total. Environ.* 2016; 559: 232-241.

-Melvin, S.D., Cameron, M.C., Lanctôt, C.M. 2014. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 77(6): 337-345.

-Metcalf CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes BJ, et al. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2001; 20: 297–308.

-Michelini L, Reichel R, Werner W, Ghisi R, Thiele-Bruhn S. Sulfadiazine uptake and effects on *Salix fragilis* L. and *Zea mays* L. plants. *Water. Air. Soil. Pollut.* 2012; 223 (8): 5243–5257.

-Migliore L, Brambilla G, Cozzolino S, Gaudio L. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agr.Ecosyst. Environ.* 1995; 52 (2-3): 103–110.

-Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2013. Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. BOE 142, 44966-44973.

-Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. BOE 262, 32339-32340.

-Ministerio para la Transición Ecológica y el reto Demográfico. Lodos de depuración de aguas

- residuales [en línea]. [Consultado en febrero 2020]. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>
- Nislund J, Hedman JE, Agestrand C. Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquat. Toxicol.* 2008; 90 (3): 223–227.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature.* 2004. 427: 630.
- Organización Mundial de la Salud. Model List of Essential Medicines [en línea]. 2015. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf
- Quintelas C, Mesquita DP, Torres AM, Costa I, Ferreira EC. Degradation of widespread pharmaceuticals by activated sludge: kinetic study, toxicity assessment, and comparison with adsorption processes. *J. Water. Process. Eng.* 2020; 33: 101061.
- Radjenovic J, Petrovic M, Barceló D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* 2009; 43: 831–841.
- Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology.* 2009; 17 (6): 275-342.
- Ramirez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, Chambliss CK. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007; 79: 3155–3163.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Marco-Urrea E, Caminal G. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresour. Technol.* 2010; 101: 2259–2266.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Jelic A, Llorca M, Farré M, Caminal G, Petrovic M, et al. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 2011; 102: 5602–5608.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Barón E, Gago-Ferrero P, Jelic A, Llorca M, Farré M, et al. Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. *J. Hazard. Mater.* 2012^a; 30: 235–243.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Jelic A, Pereira MA, Sousa DZ, Petrovic M, Alves MM, et al. Bioaugmentation of sewage sludge with *Trametes versicolor* in solid-phase biopiles produces degradation of pharmaceuticals and affects microbial communities. *Environ. Sci. Technol.* 2012^b; 46: 12012–12020.

- Rodríguez-Rodríguez CE, Lucas D, Barón E. Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 2014; 168: 180–189.
- Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters and an update. *Toxicology.* 2004; 205: 113-122.
- Semblante GU, Hai FI, Huang X. Trace organic contaminants in biosolids: Impact of conventional wastewater and sludge processing technologies and emerging alternatives. *J. Hazard. Mat.* 2015; 300: 1-17.
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 2004; 38: 228A-231A.
- Semple KT, Morriss AW, Paton GI. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil. Sci.* 2003; 54: 809-818.
- Shahzad-ul-Hussan S, Cai M, Bewley CA. Unprecedented glycosidase activity at a lectin carbohydrate-binding site exemplified by the cyanobacterial lectin MVL. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131 (45): 16500-16508.
- Sorensen SR, Juhler RK, Aamand J. Degradation and mineralization of Diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic μgL^{-1} Diuron concentration. *Pest. Manag. Sci.* 2013; 69 (11): 1239-1244.
- Stasinakis AS, Thomaidis NS, Arvaniti OS. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. *Sci. Total. Environ.* 2013; 463-464, 1067-1075.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Contaminants (POPs). The New POPs under the Stockholm Convention. 2011. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/%20TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>
- Strauch G, Möder M, Wennrich R, Mohrlok EU, Osenbrück K, Gläser H, et al. Urban Impact on Soils and Groundwater (Guest Editors—Ulf Mohrlok and Thomas Schiedek) Indicators for Assessing Anthropogenic Impact on Urban Surface and Groundwater. *J. Soil Sci.* 2008; 8: 23–33.
- Subedi B, Lee S, Moon HB. Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea. *Environ. Int.* 2014; 68: 33-40.
- Sumpter JC. Pharmaceuticals in the environment: Moving from a problem to a solution. Kummerer H and Hempel M. *Green and Sustainable Pharmacy.* 2010; 11–22. Springer, Berlin,

Germany.

-Thomsen A, Gobel A, Mc.Ardell C. Determination of sulfonamide and macrolide antibiotics in sewage sludge using accelerated solvent extraction and LC-MS/MS. 2003. Proceedings of the Poseidon Symposium. Braunschweig, Germany.

-Toth JD, Feng Y, Dou Z. Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification. *Soil. Biol. Biochem.* 2011; 43 (12): 2470–2472.

-Usyskin A, Bukhanovsky N, Borisover M. Interactions of triclosan, gemfibrozil and galaxolide with biosolid-amended soils: effects of the level and nature of soil organic matter. *Chemosphere.* 2015; 138 (Supplement C): 272–280.

-Verlicchi P, Zambello E. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review. *Sci. Total. Environ.* 2015; 538: 750-767.

-Wang K, Larkin T, Singhal N. Mobility of pharmaceutical and personal care products in lime amended wastewater biosolids. *Sci. Total. Environ.* 2018; 624: 1263-1273.

-Wilson BA, Smith VH, Denoyelles F, Larive CK. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environ. Sci. Technol.* 2003; 37: 1713–1719.

-Wolf L, Zwiener C, Zemmann M. Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks. *Sci. Total. Environ.* 2012; 430: 8–19.

-Wu X, Dodgen LK, Conkle JL, Gan J. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. *Sci. Total. Environ.* 2015; 536: 655-666.

-Zembruska J, Ginter-Kramarczyk D, Zajac A, Kruszelnicka I, Michalkiewicz M, Dymaczewski Z et al. The influence of temperature changes in activated sludge processes on ibuprofen removal efficiency. *Ecol. Chem. Eng. S.* 2019; 26(2): 357-366.

-Zhang L, Hu J, Zhu R, Zhou Q, Chen J. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97: 3687-3698.

-Zhenhua Y, Guanghua L, Qiuxia Y, Jianchao L. Long-term effects of antibiotics, norfloxacin, and sulfamethoxazole, in a partial life-cycle study with zebrafish (*Danio rerio*): Effects on growth, development, and reproduction. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016; 23: 18222–18228.

-Zhou NA, Lutovsky AC, Andaker GL, Gough HL, Ferguson JF. Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. *Biodegradation.* 2013; 24: 813-827.

-Zhou NA, Lutovsky AC, Andaker GL, Ferguson JF, Gough HL. Kinetics modeling predicts bioaugmentation with *Sphingomonas* cultures as a viable technology for enhanced

pharmaceutical and personal care products removal during wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 2014; 166: 158-167.

-Zur J, Pinski A, Marchlewicz A, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D, Guzik U. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen –toxicity, biodegradation and genetic background of their utilization by bacteria. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2018; 25: 21498-21524.

-Zuriaga E, Lomba L, German B, Lanuza PM, Aldea L, Ribate MP, et al. *Chem. Ecol.* 2019; 35 (2): 102-114.